



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Estudio toxicológico preliminar
en *Artemia salina* L. de
Persea americana Mill.**

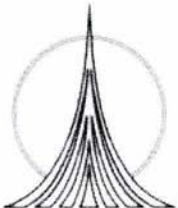
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :

BLANCA ROSA JIMÉNEZ PÉREZ

DIRECTOR: QFB JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE DEL 2004





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Estudio toxicológico preliminar
en *Artemia salina* L. de
Persea americana Mill.**

Este trabajo se desarrolló en el
Laboratorio ET-PA-10
de la Planta Piloto
y forma parte de los proyectos
de investigación derivados de la
Línea de Investigación en
Química Farmacéutica de Productos Naturales
A cargo de
QFB José Luis Balderas López
M. en C. José Luis Trejo Miranda



El Éxito

Si piensas que estás vencido,
lo estás;
si piensas que no te atreves,
no lo harás;
si piensas que te gustaría ganar;
pero no puedes; no lo lograrás,
si piensas que perderás,
ya lo has perdido;
porque en el mundo encontrarás
que el éxito comienza
con la voluntad ...



Dedicatoria

A Dios porque en todo momento ha guiado mis pasos y me ha dado la oportunidad de caer y tener la fuerza para levantarme nuevamente.

A mi madre Ma. Luisa porque sembró en mí la inquietud de estudiar y por darme dos veces la oportunidad de vivir.

A mi abuelita Lupita por todo su amor y consejos.

A mi papá José quien fomentó por algún tiempo este sueño y a mis hermanos Tere y Pepe por el tiempo que no les he dedicado.

A Dalí por ser mi fuente de inspiración.

En especial a Cori por todas las buenas razones que pueda mencionar, por toda su comprensión y cariño, así como su infinita paciencia.

A mi maestro y amigo QFB José Luis Balderas por todos sus consejos, apoyo y orientación.

A mis tíos Julio y Esperanza por el apoyo brindado.

Con cariño a toda mi familia y amigos.



Agradecimientos

Agradezco a mis sinodales Q. Miki Otani, Q. Teresa Mendoza, QFB José Luis Balderas, M. en C. José Luis Trejo y Dr. Juan Carlos Vázquez, por su valiosa aportación para mejorar este trabajo y toda la atención recibida.

Se agradece al QFB Enrique Escalera por el apoyo brindado en la colecta del material vegetal.

Se agradece al M. en C. Carlos Castillejos Cruz por su participación en la identificación de los ejemplares depositados en el Herbario FEZA de la FES Zaragoza.

Se agradece al Dr. Adelfo Reyes, QFB Ángeles Fernández y QFI Estela Valencia por todas las facilidades brindadas, por su apoyo y comprensión en la realización de este trabajo.



Tabla de Contenido

I. Introducción	2
II. Marco Teórico	3
1. Aguacate	3
2. Características botánicas del aguacate	5
3. Usos y aplicaciones del aguacate	6
4. Variedades de <i>Persea americana</i>	7
5. Importancia de los productos naturales aislados de plantas	8
6. Estudios realizados a <i>Persea americana</i> Mill.	10
7. Bioensayo en <i>Artemia salina</i> L.	15
III. Planteamiento del problema	17
IV. Objetivos	18
V. Hipótesis	19
VI. Material y procedimiento	20
A) Materiales	20
B) Procedimiento	21
VII. Resultados	27
VIII. Discusión de resultados	42
IX. Conclusiones	48
X. Sugerencias	49
XI. Apéndice I. <i>Artemia salina</i> Leach	50
XII. Referencias	52



I. Introducción

México es el decimocuarto país más grande del mundo y el tercero en mega diversidad vegetal. Su posición geográfica lo sitúa en la interfase del reino tropical con elementos florísticos tropicales cálidos y del reino neotropical con elementos florísticos tropicales cálidos y del reino holoártico con componentes florísticos de temperatura fría. Esto hace que nuestro país sea vasto y diverso en recursos vegetales, donde las plantas de uso medicinal tienen gran importancia¹.

Dicha importancia de las plantas medicinales¹, pueden ser evaluadas por su frecuencia de uso, debido a que es un recurso terapéutico para muchos mexicanos, y cuya riqueza es estimada por el número de especies (alrededor de 2000) utilizadas en las prácticas médicas populares¹⁻².

El conocimiento empírico que posee la población mexicana acerca de las propiedades curativas de las plantas medicinales, es un patrimonio cultural legado desde épocas ancestrales y aún cuándo se ha empleado desde entonces, no fue sino hasta principios del siglo XIX cuando nació la inquietud de estudiarlas³.

Una de estas plantas es *Persea americana* Mill. conocida comúnmente como *aguacate*, de la familia de las Lauráceas, de esta planta se han utilizado las partes aéreas, semillas y el fruto para el alivio de diversos padecimientos. Sin embargo, existen pocos estudios sobre dichas actividades⁴.

En este trabajo, se realizará un *screening*^a sobre la actividad en *Artemia salina* L. de las diversas partes que componen a la planta, para determinar cuál de ellas es adecuada para un posterior estudio químico.

^a *Screening* o *screening farmacológico* es un proceso selectivo que exige probar un gran número de plantas medicinales o partes de la misma, con el objetivo de determinar si tienen o no una actividad farmacológica aprovechable⁵.



II. Marco Teórico

1. Aguacate

Ahuacatl (en náhuatl)

Persea americana Miller

Familia: *Lauraceae*

El aguacate (*Persea gratissima*, *Persea americana* Mill.) es el fruto del árbol del mismo nombre originario de Mesoamérica, que abarca las regiones de México y Guatemala, y la palabra “aguacate” deriva de la lengua náhuatl “*aoacatl*” o “*ahuacatl*”⁶⁻⁷. Los arqueólogos han demostrado que desde hace unos 12 000 años, los antiguos mexicanos ya tenían en su dieta cotidiana esta fruta, y era muy apreciada por su fino aceite, mismo que en la actualidad los químicos de nuestro siglo han demostrado que el aguacate es rico en aceites monoinsaturados y contenido en proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, así como un bajo contenido de sodio y calcio. Las propiedades del aguacate le confieren un alto valor nutritivo como fruta fresca; aunque, desde hace unos años se procesa para fabricar un fino aceite, con características semejantes al aceite de oliva, muy apreciado para el consumo humano y como materia prima en la industria farmacéutica y de cosméticos⁷⁻⁸.

Esta planta se cultiva en climas cálidos o templados y con frecuencia se usa la cáscara de la semilla, la cáscara del fruto o las hojas en un preparado que se toma en ayunas durante tres o cuatro días para expulsar parásitos intestinales⁷.

En problemas ginecológicos, cólicos menstruales, para facilitar el parto y aumentar la cantidad de leche materna, se recomienda el cocimiento de las hojas. Para la diarrea, dolores estomacales y bilis, un preparado de hojas hervidas con manzanilla, hierbabuena, caña y un poco de bicarbonato como agua de uso⁹.

También es eficaz a través de un machacado de hojas o semillas mezclado con aceite de ricino o comestible para evitar la caída del cabello, salpullido o tiña y el



cocimiento de las hojas se utiliza contra la inflamación de estómago, hígado, matriz, ovarios y vientre, algunos otros usos se muestran en la tabla 1⁹⁻¹⁰.

Tabla 1. Usos del aguacate en diferentes padecimientos

• Abortivo	• Alopecia	• Hematoma
• Ansiedad	• Alzheimer	• Hemorroides
• Antibacterial	• Amebas	• Hepatitis
• Antiinfertilidad	• Anemia	• Presión sanguínea alta
• Antiinflamatorio	• Aterosclerosis	• Colesterol elevado
• Anticonceptivo	• Bacterias	• Triglicéridos elevados
• Afrodisíaco	• Hemorragia	• Ictericia
• Astringente	• Golpes (moretones)	• Impotencia
• Inhibidor de COX2	• Cálculos renales	• Infección
• Diurético	• Cáncer	• Inflamación
• Emoliente	• Cáncer labial	• Presión sanguínea baja
• Hematoprotector	• Gripe	• Malaria
• Hipertensivo	• Resfriado	• Menopausia
• Hipocolestemiante	• Tos	• Mucosas
• Hipotensivo	• Caspa	• Neuralgia
• Hipotriglicémico	• Dermatitis	• Parasitosis
• Laxante	• Diabetes	• Baja producción de leche
• Parasitocida	• Diarrea	• Reumatismo
• Veneno	• Disentería	• Sarna
• Rodenticida	• Antihelmíntico	• Dolor de garganta
• Rubefaciente (enrojecimiento de la piel)	• Amenorrea	• Torcedura
• Uterotónico	• Dispepsia	• Dolor de muelas
• Uricosúrico	• Enteritis	• Retención de líquidos
• Bajo peso	• Fertilidad	
• Lombrices	• Fiebre	
• Heridas	• Frigidez	
	• Gota	
	• Dolor de cabeza	

La producción de aceite de aguacate en México se incrementa en respuesta a una demanda centrada en el mercado de la producción farmacéutica, cosmetológica y nutracéuticos, con un incremento en la industria alimenticia y como aceite para cocinar⁷.

México es el mayor productor de aguacate en el mundo, gracias al fomento de este cultivo que se inició en Michoacán desde 1932, con fines de explotación extensiva,



perspectivas comerciales y de mercado, se fue extendiendo por todas las regiones tropicales y semi-tropicales del país en forma de huertos familiares y comerciales, de tal manera, en la actualidad, Michoacán es la región que mayor cantidad de aguacate produce en el país¹¹, siendo también otras regiones productoras los Estados de Puebla y Veracruz^{6,11}.

Antes de 1963, la variedad de aguacate que predominaba en los campos de cultivo mexicanos era el criollo selecto; sin embargo, a partir de entonces la propagación de esta variedad dejó de ser importante y fue desplazada por algunas variedades mejoradas⁶.

2. Características botánicas del aguacate

Es una planta originaria de Mesoamérica; es decir que aquí se encuentra el banco genético natural de su población fundamental, importantes también para la elaboración de los planes de mejoramiento fitogenético de esta especie. El aguacate es una dicotiledónea perteneciente al orden de las Ranales y la familia de las Lauráceas^{6,11}.

El árbol alcanza 20 m de altura, de tronco grueso y con hojas alargadas que terminan en punta. Las flores son pequeñas y sus frutos son ovalados, con semilla grande rodeada, por pulpa carnosa. Se cultiva por sus frutos y crece asociado con la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, perennifolia, matorral xerófilo; bosques mesófilo de montaña, de encino y pino^{6-7,11-12}.

El hábitat del árbol corresponde a las características ecológicas de las especies subtropicales – tropicales. La mayoría de las variedades comerciales en los países productores, como México, Estados Unidos, Nueva Zelanda y las Islas Canarias se han clasificado comercialmente en tres razas básicas: la mexicana, la guatemalteca y la antillana. Esta clasificación difiere de la clasificación botánica^{6-7,11-13}.



3. Usos y aplicaciones del aguacate.

La industria alimenticia utiliza el aceite de aguacate para preparar alimentos enlatados y en aderezos para ensaladas⁷.

La industria de los cosméticos lo emplea en la formulación de lociones, cremas y jabones para el tratamiento de la piel y cuidado del cabello⁷.

La industria farmacéutica lo usa como base para pomadas, ungüentos y bálsamos. En la actualidad se estudian otras formas de utilizar el aceite de aguacate en medicamentos y nutraceuticos⁷.

El aguacate es un alimento rico en potasio y pobre en sodio, relación favorable para el descenso de la presión arterial y la disminución de la susceptibilidad a ciertas enfermedades cardiovasculares y vásculo-cerebrales que no dependen de la presión arterial^{7,9}.

El contenido en cobre es significativo, integrando el grupo de alimentos fuente de este mineral; 100 g de porción comestible aportan aproximadamente el 21% de los requerimientos diarios promedio para adultos. Cabe recordar que el cobre es indispensable en el metabolismo del hierro en la síntesis de hemoglobina, pigmento melanina y proteínas del tejido conectivo. La deficiencia de cobre se asocia con trastornos neurológicos y cardiacos^{7,12}.

El aguacate también es fuente de manganeso, micronutriente esencial para el normal funcionamiento del encéfalo y el metabolismo de los carbohidratos. Aporta una apreciable cantidad de magnesio: catión intracelular que participa en el metabolismo de glúcidos, lípidos, proteínas y calcio, en el equilibrio ácido-base y procesos de oxidorreducción; la deficiencia de manganeso esta asociada a trastornos clínicos, algunos de ellos muy frecuentes, como los gastrointestinales^{7,12}.



Si bien posee escaso contenido de calcio, su absorción es óptima por la presencia de vitamina D y ausencia de ácido oxálico, en cuanto al hierro se ve favorecida su absorción porque el aguacate contiene vitamina C. El valor nutricional del aguacate se muestra en la tabla 2^{7,12}.

Vitaminas	Contenido en 100 g	RDA	% de RDA cubiertas por 100 g
Vitamina A	85.00 µg	900.0µg	9.4
Vitamina D	10.00 µg	5.0 µg	200.0
Vitamina E	3.00 µg	9.0 mg	33.0
Vitamina K	8.00 µg	110.0µg	7.3
Vitamina B1	0.11 µg	1.4 mg	7.8
Vitamina B2	0.20 µg	1.6 mg	12.5
Vitamina B6	0.45 µg	2.1 mg	21.4
Niacina	1.60 µg	16.0mg	10.0
Acido pantoténico	1.00 µg	5.5mg	18.2
Biotina	10.00 µg	100.0µg	10.0
Ácido fólico	32.00 µg	200.0µg	16.0
Vitamina C	14.00	60.0mg	23.3

RDA = Recomendación Diaria para Adultos

4. Variedades de *Persea americana* Mill.

El aguacate es clasificado botánicamente en tres grupos: La raza Mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* (*Persea drymifolia*), la raza Guatemala, *Persea americana* var. *guatemalensis* (*Persea schiedeana*) y la del este de la India o raza Colombiana *Persea americana* var. *americana* (*Persea americana*). En la tabla 3, se muestran algunas variedades de las tres diferentes razas^{6,12,14}.

**Tabla 3. Variedades de aguacate (*Persea americana*)**

Raza mexicana (<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	Raza guatemala (<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>)		Raza del este de la India (<i>P. americana</i> var. <i>americana</i>)
grande	hass	<i>sharpless</i>	Zutano
puebla	sharwil	<i>solano</i>	Velvick
fuerte	redd(2)	<i>spinks</i>	Maoz
murrieta green	plowman	<i>taft</i>	Butler
pinkerton	red(1)	<i>taylor</i>	Fuchs
fuerte	fuerte	<i>tonnage</i>	Pollock
hess	wurtz	<i>wagner</i>	Ruchle
zutano	gwen (1)	<i>wurtz</i>	Rusell
edranol	gwen (2)	<i>schmidt</i>	Simonds
duke	<i>anaehim</i>	<i>pinkerton</i>	Trapp
ganter	<i>benik</i>	<i>reed</i>	Waldin
gottfred	<i>dickinson</i>	<i>panchoy</i>	Maoz
mexicola	<i>edranol</i>		
northrop	<i>hazzard</i>		
gottfred	<i>itzamna</i>		
lula	<i>linda</i>		
rincon	<i>lyon</i>		
ryan	<i>macarthur</i>		
sharwil	<i>nabal</i>		
susan	<i>nimlioh</i>		

5. Importancia de los productos naturales aislados de plantas

El reino vegetal representa un extraordinario reservorio de nuevas moléculas. Se estima que alrededor de 250,000 - 500,000 especies de planta en la tierra, sólo un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente y las fracciones sujetas a un *screening* farmacológico es aún reducido. Algunas plantas pueden tener miles o millones de metabolitos, actualmente resurge el interés en el reino vegetal como un posible camino a nuevos compuestos para la introducción dentro de programas de *screening* terapéutico¹⁵⁻¹⁶.



La rápida desaparición de bosques tropicales y otras importantes áreas de vegetación han hecho pensar lo esencial que es tener acceso a métodos que lleven a un rápido aislamiento e identificación de productos naturales bioactivos¹⁵⁻¹⁶.

El obtener un elemento puro explotable de una planta involucra un trabajo interdisciplinario de trabajo en botánica, farmacognosia, farmacología, química y toxicología y se puede formular de la manera siguiente:

- 1) Selección, colección identificación botánica y preparación del material vegetal.
- 2) Extracción con disolventes adecuados y un análisis preeliminar.
- 3) Screening biológico y farmacológico del extracto crudo.
- 4) Separación cromatográfica de los elementos bioactivos puros, guiados por un bioensayo (fracción guiada por actividad).
- 5) Determinación de la estructura.
- 6) Análisis y perfil farmacológico de los compuestos puros.
- 7) Pruebas toxicológicas.
- 8) Síntesis parcial o total.

Las plantas han sido usadas como extracto puro y alimentos para humanos desde la prehistoria. Las plantas son usadas de esta manera en diferentes partes del mundo, pero algunos científicos se dan a la tarea de aislar compuestos activos de las plantas, o realizar derivados de ellos, para usarlos como fármacos¹⁶.

Las moléculas bioactivas pueden ser producidas a partir de elementos químicos encontrados en las plantas, mediante la modificación química usando síntesis química, o el uso de microorganismos para la producción de esteroides¹⁷.

Muchos de los fármacos encontrados con actividad e innovación farmacéutica han sido aislados de plantas de uso medicinal.



Se espera que en un futuro, el descubrimiento de nuevos compuestos a partir de plantas sea un gran avance para nuevas tecnologías de manipulación de genes, cultivos de tejido y la química^b, es muy importante el papel que juega en la lucha contra las enfermedades, el descubrir un nuevo fármaco de origen vegetal¹⁶.

6. Estudios realizados a *Persea americana* Mill.

Persea americana Mill. ha sido objeto de algunos estudios cuyos objetivos han sido determinar algunas de las propiedades farmacológicas, principalmente antifúngicas, antiinflamatorias y citotóxicas, de sus extractos y/o metabolitos, así como el aislamiento y determinación de los componentes químicos de la misma^{4,14,18-19}.

a) Sustancias aisladas de *Persea americana* Mill.

Los componentes químicos principales de *Persea americana* Mill. corresponden a alquenos y alquinos alifáticos de cadena larga, y carotenoides. Los primeros son responsables de algunas de las actividades determinadas en ella y se encuentran principalmente en las hojas, semilla y fruto, mientras que los caratenoides son responsables del color característico del fruto^{4,18,20-21}.

En la tabla 4 se resumen las sustancias químicas aisladas de *Persea americana* Mill., indicando la variedad en la cual fueron obtenidas, y en la figura 1, se muestran las estructuras químicas de las mismas.

^b La química combinatoria se basa en el empleo de variados materiales de partida sencillos y en su unión sistemática en todas la combinaciones posibles, usando procedimientos químicos, biológicos o biosintéticos, con lo que se crean rápidamente un gran número de compuestos químicos estructuralmente relacionados entre si.

**Tabla 4. Sustancias aisladas de *Persea americana* Mill.**

Sustancia	Variiedad	Estructura	Referencias
1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadeca-16-ino	green, zutano	1	4,19,22
1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadeca-16-eno	zutano	2	4,22
(E,Z,Z)-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trieno	nm	3	4
(Z,Z)-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa12,15-dieno	green	4	4,19
1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-ino	green, lulu, zutano	5	18-19,22
1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-eno	green, lulu, zutano	6	18-19,22
Persina	reed, gwen, hass	7	4,14
Tetrahidropersina	reed, gwen, hass	8	14
5,8-epoxy-5,8-dihidro-10'-apo-β-caroten-3,10'-diol	nm	9	25
2-(13-Hidroxi-1,5,10-trimetil-trideca-1,3,5,7,9,11-hexaenil)-4,4,7a-trimetil-2,4,5,6,7,7a-hexahidro-benzofuran-6-ol	nm	10	25
1,2,4-trihidroxinonadecano	lulu	11	18
Acetato de 2-hidroxi-4-oxo-heptadec-16-enilo	zutano	12	22
Acetato de 2-hidroxi-4-oxo-heptadec-16-inilo	zutano	13	22
1-Hidroxi-2-metoxi-heptadec-6-en-4-ona	zutano	14	22
1-Hidroxi-2-metoxi-heptadec-16-ino-4-ona	zutano	15	22
2-Hidroxi-1-metoxi-heptadec-16-en-4-ona	zutano	16	22
2-Hidroxi-1-metoxi-heptadec-16-ino-4-ona	zutano	17	22

nm ≡ variedad no mencionada

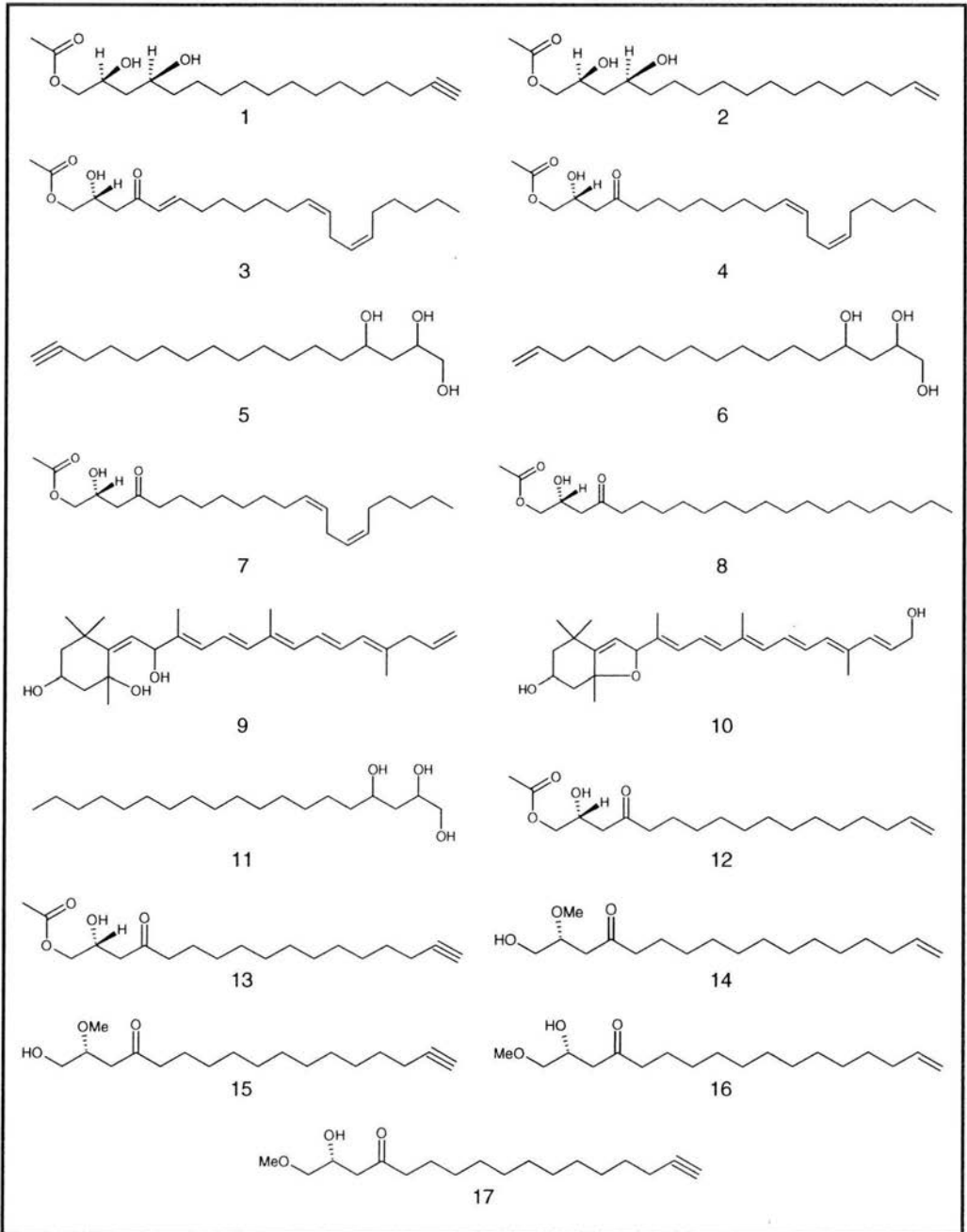


Figura 1. Estructuras de sustancias aisladas de *Persea americana* Mill.



Los carotenoides son terpenoides formados por ocho cadenas de isopreno (40 carbonos) con un sistema de dobles enlaces conjugados. Esta característica es la responsable del color de los mismos y por lo tanto de las plantas que los contienen. En la tabla 5, se enumeran algunos -----de los carotenoides presentes en *Persea americana* Mill. y en la figura 2, las estructuras de las sustancias²⁴⁻²⁵.

α -caroteno (18)	Isoluteína	Neocromona
β -caroteno (19)	Violaxantina (20)	Neoxantina a (21)
ζ -caroteno	Carbonil 446	Mimulaxantina
γ -caroteno	Crisantemaxantina	Neoxantina b
Hidroxi- α -caroteno	Crisantemaxantina b	3-hidroxisintaxantina
Cryptoxantina (22)	Crisantemaxantina c	5,8-epoxi-5,8-dihidro-10'-apo- β -caroten-3,10'-diol
α -citraurina	Zeaxantina (23)	Auroxantina
Luteína (24)	Luteoxantina	
cis-Luteína		

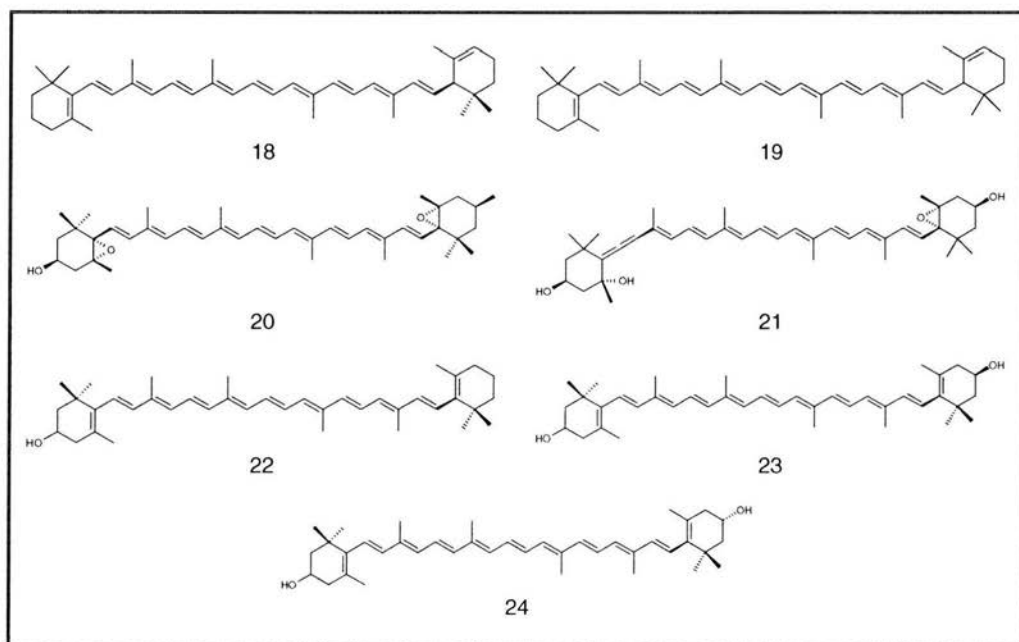


Figura 2. Estructuras de algunos carotenoides aislados de *Persea americana* Mill.

**b) Actividades biológicas determinadas a *Persea americana* Mill.**

De los muchos usos informados de *Persea americana* Mill. (aguacate), pocos de ellos han sido demostrados por pruebas biológicas o de *screening*, limitándose principalmente a las actividades citotóxica, insecticida y antifúngica. En la tabla 6, se muestran las actividades biológicas que se le han determinado, así como la fuente responsable de la actividad.

Variedad	Actividad	Extracto o sustancia	Estructura	Referencias
nm	Antifúngica	Persina	7	4
nm	Antifúngica	(E,Z,Z)-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicososa-5,12,15-trieno	3	4
Green	Antifúngica	1-acetoxi-2,4-dihidroxi-1-n-heptadeca-16-ino	1	4,19
Green	Antifúngica	1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-ino	5	19
Green	Antifúngica	1,2,4-trihidroxiheptadec-16-eno	6	19
Reed, Gwen, Hass	Antifúngica	Persina	7	14
Reed, Gwen, Hass	Antifúngica	Persina	7	14
Lulu	Citotóxica insecticida ^e	1,2,4-trihidroxinonadecano	11	18
Lulu	Citotóxica insecticida ^e	1,2,4-trihidroxiheptadeca-16-eno	6	18
Lulu	Citotóxica insecticida ^e	1,2,4-trihidroxiheptadec-16-ino	5	18
Lulu	Citotóxica	Extracto etanólico de fruto	enm	18
nm	Analgésica y antiinflamatoria	Extracto acuoso de hojas	enm	21
nm	Inhibidor de acetilCoA carboxilasa	Extracto metabólico de fruto	enm	25
nm	Larvicida	Extracto acuoso de hojas	enm	40
nm	Giardicida	Extracto acuoso de hojas	enm	27
nm	Eritro-aglutinante	Extracto de semillas	enm	28
nm	hipotensiva	Extracto acuoso y metanólico	enm	20

nm ≡ variedad no mencionada, enm ≡ estructura no mostrada.



7. Bioensayo en *Artemia salina* L.

Muchos productos naturales novedosos son aislados, caracterizados, y publicados sin haberseles realizado alguna prueba biológica. De esta manera, las actividades biológicas de los productos naturales pueden permanecer desconocidas por muchos años²⁹. Sin el informe de su evaluación biológica, el descubrimiento de nuevos constituyentes de plantas medicinales es nada más que pura fitoquímica. Por esta razón, existe la necesidad de realizar bioensayos generales, que permitan detectar un amplio espectro de actividades farmacológicas³⁰⁻³¹.

Un ensayo biológico o *bioensayo* es un experimento para estimar la naturaleza, constitución o potencia de un material o sustancia³².

La mayoría de los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos a dosis altas. Entonces, la letalidad *in vivo* en un simple organismo zoológico puede ser usada como un simple y rápido monitoreo durante la separación cromatográfica de extractos bioactivos de plantas. Una vez que se han aislado las sustancias bioactivas, una serie de bioensayos más específicos y sofisticados pueden ser empleados³⁰.

Dentro de los bioensayos de toxicidad, los organismos invertebrados en especial los artrópodos acuáticos, han adquirido gran interés como organismos utilizados en pruebas de toxicidad. En los últimos años, la *Artemia salina* L. ha sido ampliamente utilizada en las pruebas de toxicidad a corto plazo³⁰.

Con *Artemia salina* L., se ha desarrollado un método simple, donde los extractos de plantas, fracciones o compuestos puros pueden probarse para determinar su toxicidad^{30,33}.



Como ejemplos de la utilidad de este bioensayo, se menciona el estudio de *Artemisia borealis*; donde su extracto diclorometánico mostró una fuerte toxicidad en *Artemia salina* ($CL_{50} = 49 \mu\text{g/mL}$) y posteriormente, se determinaron al mismo propiedades fungicidas frente a *Cladosporium cocumerinum* y larvicidas frente a *Aedes aegypti*³⁰. Asimismo, un número de compuestos bioactivos conocidos fueron probados con este método (tabla 7) y los resultados demostraron la gran utilidad general del bioensayo con compuestos de diversa estructura y mecanismo de acción^{33,35-37}.

Producto natural	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Podofilotoxina	2.4
Cloruro de berberina	22.5
Sulfato de estircnina	77.2
Digitalina	215
Sulfato de quinidina	215
Sulfato de efedrina	215
Estrofantina	215
Arbutina	275
Cafeína	306
Sulfato de atropina	686
α -Santonina	> 1000
Timol	514

Se considera a un extracto o a una sustancia pura potencialmente activa cuando su valor de CL_{50} es menor a $1000 \mu\text{g/mL}$, por lo tanto, la información anterior apoya fuertemente el uso de dicho bioensayo para detectar un amplio espectro de actividades biológicas en sustancias o en extractos de plantas.



III. Planteamiento del Problema

En México, así como en diversos países, aún en nuestros días se hace uso de tratamientos de medicina tradicional con plantas que muchas veces son utilizadas en infusiones, té o como agua de uso, en dosis inadecuadas y que causan un efecto terapéutico deseado pero debido a que no se han separado de un vegetal todas las sustancias que se encuentran en él, se pueden hallar sustancias que produzcan efectos tóxicos y causen otros padecimientos.

El estudio de sustancias de origen vegetal, permite demostrar el por qué de algunos usos medicinales de los cuales se emplean empíricamente. La necesidad de encontrar posibles fármacos con actividad terapéutica de origen vegetal es un reto al cual, la ciencia se enfrenta día a día.

Las distintas variedades de *Persea americana* Mill. conocida comúnmente como aguacate se han utilizado tradicionalmente para el alivio de algunos padecimientos, sin embargo, pocas de estas actividades han sido comprobadas en algunas variedades y en muy pocos casos, se ha encontrado la sustancia responsable de dicho efecto. Por ello, es necesario realizar el estudio de las diversas actividades farmacológicas para comprobarlas o refutarlas, de las variedades de *P. americana* existentes en nuestro país.



IV. Objetivos

Objetivo general

Realizar el estudio toxicológico preliminar de las partes aéreas y fruto de *Persea americana* Mill. var. *mexicana* y *Persea americana* Mill. var. *fuerte* mediante el ensayo de toxicidad con *Artemia salina* L. para detectar los extractos con posible actividad citotóxica.

Objetivos particulares

1. Realizar la colecta de las partes aéreas y fruto de *Persea americana* Mill. var. *mexicana* y *Persea americana* Mill. var. *fuerte* en el municipio de Tancítaro, Michoacán.
2. Realizar la separación de partes, secado, molienda y extracción sólido-líquido de cada una de las partes de la planta para obtener los extractos de polaridad creciente que se utilizarán para los bioensayos.
3. Adaptar y mejorar el bioensayo de *Artemia salina* L. a las condiciones del laboratorio para la optimización de recursos y la realización de las pruebas de toxicidad a los extractos.
4. Identificar, de acuerdo con los resultados obtenidos, los extractos potenciales para el aislamiento, mediante métodos cromatográficos, de los metabolitos secundarios.



V. Hipótesis

Estudios recientes realizados a *Persea americana* var. *lulu* demuestran que sus extractos, así como algunas de las sustancias aisladas de éstos, tienen propiedades citotóxicas, por lo que es muy probable que los extractos hexánico, diclorometánico y de acetato de etilo, así como las sustancias aisladas de *Persea americana* var. *mexicana* y *Persea americana* var. *fuerte* muestren actividad similar.



VI. Material y procedimiento

A) Materiales:

Material vegetal

- Partes aéreas y fruto de *Persea americana* Mill. var *mexicana*
- Partes aéreas y fruto de *Persea americana* Mill. var *fuerte*

Material biológico de prueba

- Huevecillos liofilizados de *Artemia salina* L.

Disolventes (grado, proveedor)

- Hexano (técnico, Adydsa)
- Diclorometano (analítico, Adydsa)
- Acetato de etilo (técnico, Adydsa)

Sustancias y reactivos (grado, proveedor)

- Acido sulfúrico (analítico, Baker)
- Sulfato de cerio (IV) y amonio (reactivo, Baker)
- Sal para agua de mar artificial
- Cloruro de calcio (reactivo, Baker)
- Bisulfito de sodio (reactivo, Baker)

Cristalería:

- Equipo de destilación fraccionada
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL
- Matraces bola de 50, y 500 mL
- Frascos de tapón esmerilado de 3000 mL
- Tubos de ensayo de 13x100 mm
- Microjeringas de 25 y 50 μ L



- Pipetas Pasteur
- Columnas de fraccionamiento de 9x60 cm y 3x30 cm
- Frascos de vidrio de 50 mL
- Peceras de vidrio de 3 L y 200 mL
- Aspersor de reactivos de revelado
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL

Equipo (marca)

- Rotavapor (Buchi)
- Molino de plantas manual
- Lámpara de luz UV (Spectroline)
- Balanza analítica (Ohaus)
- Balanza semianalítica (Ohaus)

Otro material

- Placas de sílica gel con revelador 60FG (Aldrich)
- Sílica gel para columna 60G (Merck)
- Lámparas de 60 W (luz roja) y 5 W (luz blanca)
- Termómetro de -10 a 120°C
- Termómetro para pecera
- Tijeras para plantas
- Cuchillos
- Gradilla para tubos de ensaye



B) Procedimiento:

1. Colecta del material vegetal

Las partes aéreas y el fruto de *Persea americana* Mill. var. *mexicana* y *Persea americana* var. *fuerte* fueron colectadas el 20 de julio del 2003 en el kilómetro 1 de la carretera Tancítaro–Los Reyes en el municipio de Tancítaro, Michoacán, México, por el QFB Enrique Escalera Zúñiga y QFB José Luis Balderas López. Ejemplares prensados de estas variedades fueron depositados en el Herbario FEZA de la FES Zaragoza e identificados por el M. en C. Carlos Castillejos Cruz.

2. Preparación, secado y molienda

Las partes aéreas de la variedad mexicana y variedad fuerte fueron separadas en hojas y tallos por medio de tijeras y, secadas a temperatura ambiente y a la sombra durante una semana. Posteriormente se molieron hasta obtener un polvo grueso. Estos polvos fueron almacenados a temperatura ambiente, a la sombra y alejados de la humedad hasta la preparación de los extractos.

Los frutos se separaron en cáscara, pulpa y semilla, utilizando un cuchillo. Posteriormente se colocaron en una cámara forrada de aluminio provista con una lámpara de luz roja que suministro calor constante y conservó la temperatura alrededor de 30°C. Una vez que se secaron se molieron hasta obtener un polvo grueso. Estos al igual que las partes aéreas se conservaron a temperatura ambiente, a la sombra y alejados de la humedad hasta la preparación de los extractos.

3. Preparación de los extractos

Los extractos fueron obtenidos colocando aproximadamente 30-80 g en un matraz Erlenmeyer, de cada parte de la planta seca y molida de la variedad mexicana y



variedad fuerte mediante una extracción sólido-líquido por maceración con disolventes a temperatura ambiente, en un periodo de 72 h.

La extracción se realizó con hexano, diclorometano y acetato de etilo sucesivamente, concentrando los extractos por medio de un rotavapor. Los extractos obtenidos fueron conservados en frascos de vidrio a temperatura ambiente, a la sombra, evitando al mínimo el contacto con la humedad y el aire.

Los extractos del fruto se realizaron con 517 g de fruto seco y molido en una columna de vidrio empleando una extracción sólido-líquido mediante percolación con hexano y diclorometano sucesivamente a temperatura ambiente, concentrando los extractos por medio de un rotavapor³⁸.

4. Cromatografía en Capa Fina

A cada uno de los extractos obtenidos se les realizó cromatografía en capa fina para realizar una comparación preliminar de la composición de cada una de ellas. Las placas fueron eluidas con mezclas de polaridad creciente de hexano y acetato de etilo. Las placas cromatográficas fueron reveladas con luz UV, con sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico, y con cloruro de hierro (III) en etanol al 1%³⁹.

5. Pruebas de *Artemia salina*

A cada uno de los extractos obtenidos se les realizó el bioensayo de toxicidad con *Artemia salina* L. por medio de la adaptación y mejoramiento del procedimiento descrito por Jerry L. McLaughlin; como se describe a continuación:



i) Preparación de la pecera de incubación

Se armó el dispositivo de incubación como se muestra en la figura 3.

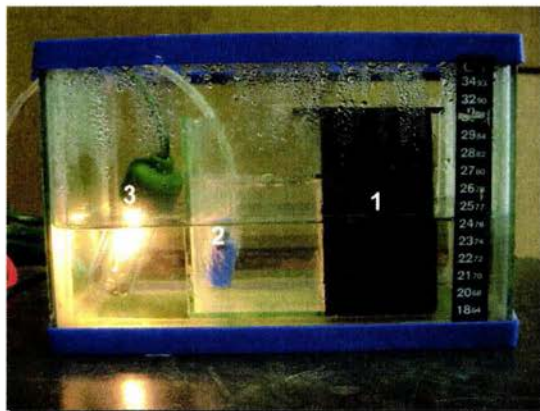


Figura 3. Pecera con dispositivos de 1) cámara de incubación, 2) sistema de aereación y 3) fuente de luz.

Se preparó el agua de mar artificial, pesando 16.5 g de sal para agua de mar artificial y fueron disueltos en 500 mL de agua purificada. Se adicionó una gota de *anticloro* y se dejó reposar durante 1 minuto. De la disolución anterior se colocaron 300 mL en la cámara de incubación (ver figura 3, inciso 1).

En la pecera que contiene la cámara de incubación se agregó una cantidad de agua corriente aproximadamente de 2.5 L a una temperatura de 26-28°C y se dejó alcanzar el equilibrio térmico.

Se conectaron los sistemas de aereación y luz.

ii) Preparación de las larvas de *Artemia salina* L.

Aproximadamente 10 µg de huevecillos de *Artemia salina* L. se colocaron con una espátula limpia y seca en la parte oscura de la pecera para tal propósito (figura 3, inciso 1), que contenía 300 mL de agua de mar artificial con aereación ligera



continua. Después de 48 horas las larvas fototrópicas^c fueron colectadas y empleadas para el desarrollo del bioensayo.

iii) Preparación de las muestras

Las muestras fueron preparadas disolviendo 20 mg del extracto en 2 mL de disolvente^d. De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500 μL a viales de 20 mL, utilizando 3 viales por dilución. Además, se agregaron 500 μL del disolvente utilizado a un vial que funcionó como blanco. Las muestras se dejaron evaporar antes de iniciar el bioensayo. Las concentraciones finales de cada dilución fueron 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$.

iv) Bioensayo

A los tubos que contenían las muestras y el blanco, se colocaron 0.5 mL de agua de mar artificial. Posteriormente, se adicionaron 10 larvas a cada tubo y se llevaron a un volumen de 2 mL con agua de mar artificial. Los tubos fueron mantenidos bajo iluminación y las larvas sobrevivientes fueron contadas después de 24 horas. Se determinaron los porcentajes de larvas muertas para cada dosis y blanco^e y se calculó la CL_{50} mediante un complemento para Microsoft Excel desarrollado por la *Rikkio University* de Japón, que utiliza el análisis Probit descrito por Finney³⁰.

El bioensayo se realizó por triplicado utilizando concentraciones logarítmicas³⁷.

^c Las larvas fototrópicas son todas aquellas que se dirigen a la fuente de luz, es decir, pasaron de la zona oscura a la zona iluminada de la cámara de incubación.

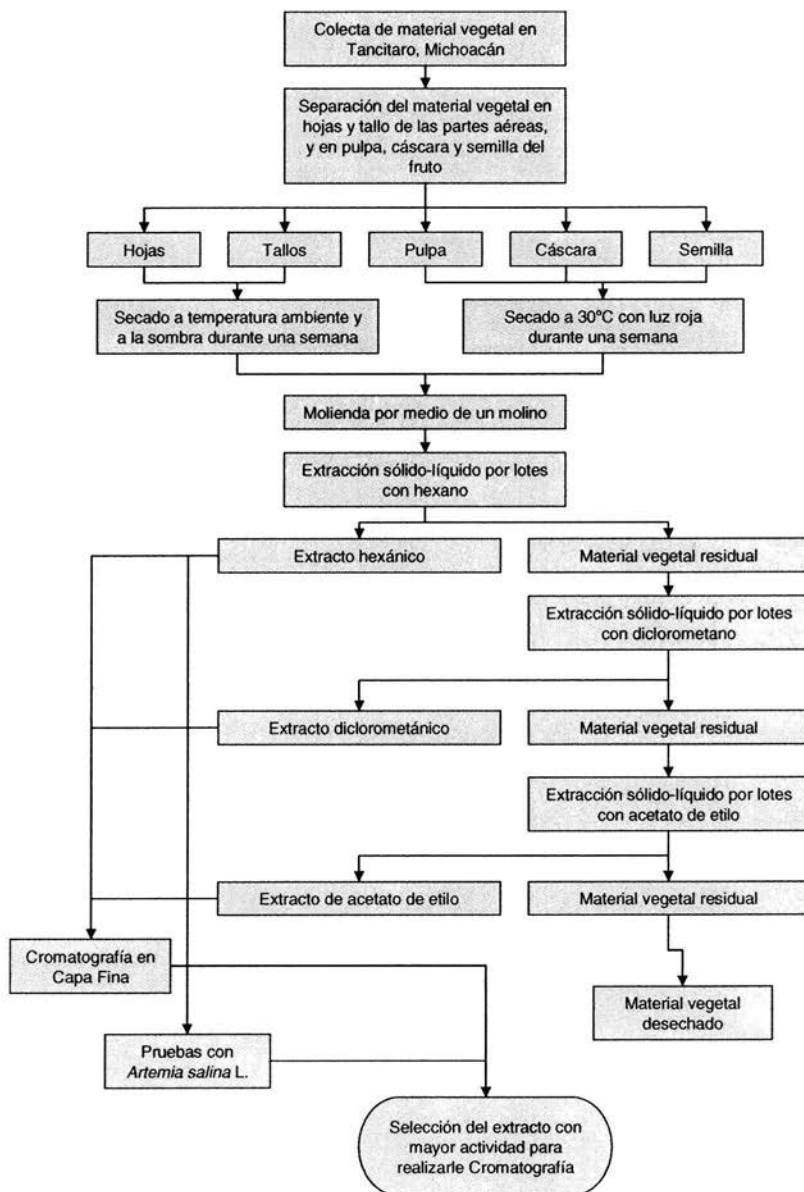
^d En cada extracto se utilizó el disolvente con el que fue preparado.

^e En los casos donde hubo muertes en el control, los datos fueron corregidos utilizando la fórmula de Abbott: %muertes = [(prueba - control) / control] x 100 (Meyer, 1982).



6. Diagrama de flujo del procedimiento general

En el siguiente diagrama de flujo se ilustra el procedimiento general realizado tanto a la variedad mexicana como a la variedad fuerte de forma independiente.








VII. Resultados

I. Características de los vegetales colectados



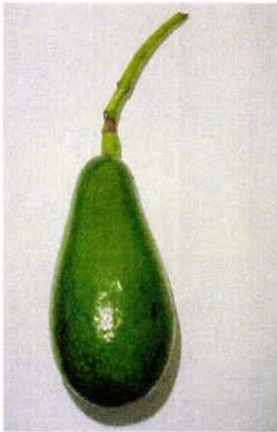
a) *Persea americana* Mill var. *mexicana*

Tabla 8. Características de <i>P. americana</i> Mill var. <i>mexicana</i>		
Árbol	Hoja	Fruto
		
Árbol frondoso, corteza delgada y verdosa, de una altura de 8-9 m con ramas de hojas compuestas imparipinadas alternas.	Hojas pecioladas pinnatinervadas de color verde de forma ovalada, tamaño de 15 a 25 cm, con borde sinuado y ápice redondeado.	Fruto pequeño con la corteza delgada, lisa y de color oscuro.



b) *Persea americana* Mill var *fuerte*

Tabla 9. Características de *P. americana* Mill var. *fuerte*

Árbol	Hoja	Fruto
		
<p>Árbol frondoso, corteza delgada y verdosa, de una altura de 8-9 m con ramas de hojas compuestas imparipinadas alternas.</p>	<p>Hojas pecioladas pinnatinervadas de color verde oscuro de forma ovalada, tamaño de 12 a 20 cm, con borde entero y ápice acuminado.</p>	<p>Fruto grande con corteza gruesa, rugosa y de color verde.</p>

**II. Preparación de extractos**

Tabla 10. Extractos obtenidos de <i>P. americana</i> Mill var. <i>fuerte</i>				
Parte	Disolvente	Peso de la muestra (g)	Peso del extracto (g)	% Rendimiento de extracto
Partes aéreas				
Hojas	Hexano	61.6	1.1648	1.9
	Diclorometano	61.6	0.8423	1.4
	Acetato de etilo	61.6	1.4457	2.3
Tallos	Hexano	85.6	0.1388	0.2
	Diclorometano	85.6	0.1311	0.2
	Acetato de etilo	85.6	0.7548	0.9
Fruto maduro				
Cáscara	Hexano	27.2	6.15	22.6
	Diclorometano	27.2	0.6927	2.5
	Acetato de etilo	27.2	0.6466	2.4
Pulpa	Hexano	181.1	52.804	29.2
	Diclorometano	181.1	18.2309	10.1
	Acetato de etilo	181.1	32.3353	17.9
Semilla	Hexano	165.7	0.441	0.3
	Diclorometano	165.7	0.6488	0.4
	Acetato de etilo	165.7	3.5933	2.2
Cáscara de semilla	Hexano	18.4	0.7281	4.0
	Diclorometano	18.4	0.1801	1.0
	Acetato de etilo	18.4	0.0113	0.1
Fruto inmaduro				
Cáscara	Hexano	49.7	10.5127	21.1
	Diclorometano	49.7	2.3682	4.8
	Acetato de etilo	49.7	5.6364	11.3
Pulpa	Hexano	120.0	35.4555	29.5
	Diclorometano	120.0	7.6403	6.4
	Acetato de etilo	120.0	16.7963	14.0
Semilla	Hexano	170.8	0.2263	0.1
	Diclorometano	170.8	1.2428	0.7
	Acetato de etilo	170.8	1.8237	1.1
Cáscara de semilla	Hexano	49.7	10.5127	21.1
	Diclorometano	49.7	2.3682	4.8
	Acetato de etilo	49.7	5.6364	11.3



Tabla 11. Extractos obtenidos de <i>P. americana</i> Mill var. <i>mexicana</i>				
Parte	Disolvente	Peso de la muestra (g)	Peso del extracto (g)	% Rendimiento de extracto
Partes aéreas				
Hojas	Hexano	592.5	56.9	9.6
	Diclorometano	59.2	1.2468	2.1
	Acetato de etilo	59.2	0.9904	1.7
Tallos	Hexano	595.8	4.9039	0.8
	Diclorometano	595.8	0.0756	0.01
	Acetato de etilo	129.8	52.3268	40.3
Fruto maduro				
Cáscara	Hexano	46.8	13.8677	29.6
	Diclorometano	46.8	2.7115	5.8
	Acetato de etilo	46.8	1.8433	3.9
Pulpa	Hexano	108.6	27.352	25.2
	Diclorometano	108.6	15.5116	14.3
	Acetato de etilo	108.6	15.8163	14.6
Semilla	Hexano	46.8	13.8677	29.6
	Diclorometano	46.8	2.7115	5.8
	Acetato de etilo	46.8	1.8433	3.9
Cáscara de semilla	Hexano	108.6	27.352	25.2
	Diclorometano	108.6	15.5116	14.3
	Acetato de etilo	108.6	15.8163	14.6
Fruto inmaduro				
Cáscara	Hexano	48.5	7.103	14.6
	Diclorometano	48.5	1.8518	3.8
	Acetato de etilo	48.5	5.3865	11.1
Pulpa	Hexano	517.0	122	23.6
	Diclorometano	517.0	11.507	2.2
	Acetato de etilo	43.6	0.3191	0.7
Semilla	Hexano	36.6	0.0557	0.2
	Diclorometano	36.6	0.441	1.2
	Acetato de etilo	36.6	3.5522	9.7
Cáscara de semilla	Hexano	23.5	0.9152	3.9
	Diclorometano	23.5	0.1178	0.5
	Acetato de etilo	23.5	0.0119	0.1

III. Ensayo de toxicidad en *Artemia salina* L.

Tabla 12. Resultados de toxicidad de las partes aéreas de <i>P. americana</i> var. <i>mexicana</i>				
Parte	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	LIC (µg/mL)	LSC (µg/mL)
	Disolvente			
Hojas	Hexano	81.956	54.764	108.28
	Diclorometano	438.24	257.41	877.27
	Acetato de etilo	891.97	372.75	5082.0
Tallos	Hexano	28.661	9.4989	32.303
	Diclorometano	373.56	263.73	518.80
	Acetato de etilo	320.90	159.04	830.35

CL₅₀ = Concentración letal media, LIC = Límite inferior confiable,
LSC = Límite superior confiable (estadígrafo: χ_1^2 con $\alpha=0.05$)

Tabla 13. Resultados de toxicidad de las partes del fruto inmaduro de <i>P. americana</i> var. <i>mexicana</i>				
Parte	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	LIC (µg/mL)	LSC (µg/mL)
	Disolvente			
Pulpa	Hexano	36.372	25.088	52.582
	Diclorometano	26.651	17.207	39.102
	Acetato de etilo	504.54	288.50	1120.6
Semilla	Hexano	304.59	243.75	1015.4
	Diclorometano	5.6856	0.0049	25.634
	Acetato de etilo	30.076	18.619	47.030
Cáscara de semilla	Hexano	1396.4	valor muy pequeño	valor muy grande
	Diclorometano	2.4932	0.1007	8.0546
	Acetato de etilo	101.57	59.115	174.68
Cáscara del fruto	Hexano	Sin actividad ^e		
	Diclorometano	119.92	77.234	187.03
	Acetato de etilo	1009.8	421.75	5886.16

CL₅₀ = Concentración letal media, LIC = Límite inferior confiable,
LSC = Límite superior confiable (estadígrafo: χ_1^2 con $\alpha=0.05$)

^e Los extractos indicadas como "Sin actividad", indican que no hubo muertes de nauplios de artemia o el valor calculado fue demasiado grande (>100000 µg/mL)



Parte	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	LIC (µg/mL)	LSC (µg/mL)
	Disolvente			
Pulpa	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	Sin actividad		
	Acetato de etilo	0.5679	0.0001	5.0871
Cáscara de fruto	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	103.65	48.720	152.82
	Acetato de etilo	509.14	220.82	2254.8

CL₅₀ = Concentración letal media, LIC = Límite inferior confiable,
LSC = Límite superior confiable (estadígrafo: χ_1^2 con $\alpha=0.05$)

Parte	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	LIC (µg/mL)	LSC (µg/mL)
	Disolvente			
Hojas	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	217.40	146.60	367.25
	Acetato de etilo	Sin actividad		
Tallos	Hexano	39.722	28.920	28.920
	Diclorometano	85.9225	valor muy pequeño	valor muy grande
	Acetato de etilo	268.43	201.22	911.38

CL₅₀ = Concentración letal media, LIC = Límite inferior confiable,
LSC = Límite superior confiable (estadígrafo: χ_1^2 con $\alpha=0.05$)

**Tabla 16. Resultados de toxicidad de las partes del fruto inmaduro de *P. americana* var. *fuerte***

Parte	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	LIC (µg/mL)	LSC (µg/mL)
	Disolvente			
Pulpa	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	Sin actividad		
	Acetato de etilo	142.65	59.522	408.98
Semilla	Hexano	330.50	212.90	524.72
	Diclorometano	2.4932	0.1007	8.0546
	Acetato de etilo	1.0640	0.0027	5.5066
Cáscara de fruto	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	658.34	434.62	1134.5
	Acetato de etilo	441.53	271.55	841.51

CL₅₀ = Concentración letal media, LIC = Límite inferior confiable,

LSC = Límite superior confiable (estadígrafo: χ_1^2 con $\alpha=0.05$)

Tabla 17. Resultados de toxicidad de las partes del fruto maduro de *P. americana* var. *fuerte*

Parte	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	LIC (µg/mL)	LSC (µg/mL)
	Disolvente			
Pulpa	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	Sin actividad		
	Acetato de etilo	142.65	59.522	408.98
Semilla	Hexano	123.65	81.812	219.85
	Diclorometano	1049.6	226.33	valor muy grande
	Acetato de etilo	4.8470	0.9208	10.759
Cáscara de semilla	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	133.96	90.385	197.60
	Acetato de etilo	Sin actividad		
Cáscara de fruto	Hexano	Sin actividad		
	Diclorometano	922.40	459.40	3031.15
	Acetato de etilo	Sin actividad		

CL₅₀ = Concentración letal media, LIC = Límite inferior confiable,

LSC = Límite superior confiable (estadígrafo: χ_1^2 con $\alpha=0.05$)

**Tabla 18. Resultados de toxicidad de fracciones cromatográficas del extracto hexánico de pulpa del fruto inmaduro de *P. americana* var. *mexicana***

Fracciones		CL ₅₀ (µg/mL)	LIC (µg/mL)	LSC (µg/mL)
Núm.	Polaridad			
1	Hexano	221.04	148.82	383.93
2	Hexano	Sin actividad		
3	Hexano:acetato de etilo (7:3)	Sin actividad		
4	Hexano:acetato de etilo (7:3)	Sin actividad		
5	Hexano:acetato de etilo (7:3)	Sin actividad		
6	Hexano:acetato de etilo (7:3)	Sin actividad		
7	Hexano:acetato de etilo (7:3)	0.1715	valor muy pequeño	2.8752
8	Hexano:acetato de etilo (7:3)	0.0084	valor muy pequeño	valor muy grande
9	Hexano:acetato de etilo (7:3)	0.2083	valor muy pequeño	2.459
10	Hexano:acetato de etilo (7:3)	Sin actividad		
11	Acetato de etilo	Sin actividad		

CL₅₀ = Concentración letal media, LIC = Límite inferior confiable,
LSC = Límite superior confiable (estadígrafo: χ^2 con $\alpha=0.05$)



III. Cromatografía en capa fina.

a) *Persea americana* var. *mexicana*

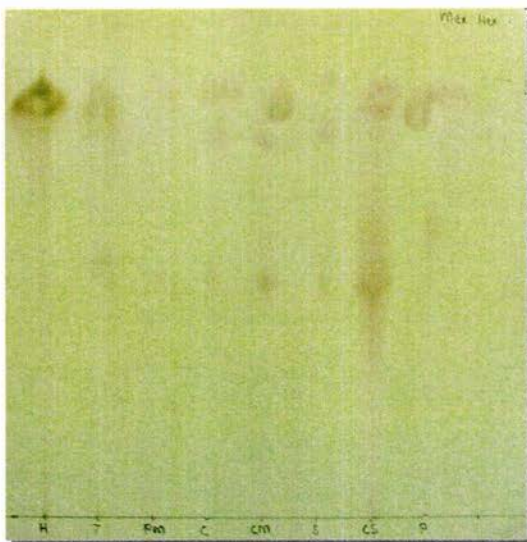


Figura 4. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de *P. americana* var. *mexicana*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa madura, cáscara, de fruto, cáscara de fruto maduro, semilla, cáscara de semilla y pulpa inmadura. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.



Figura 5. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de *P. americana* var. *mexicana*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa inmadura y pulpa madura. Mezcla de elución: hexano 100%. Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.

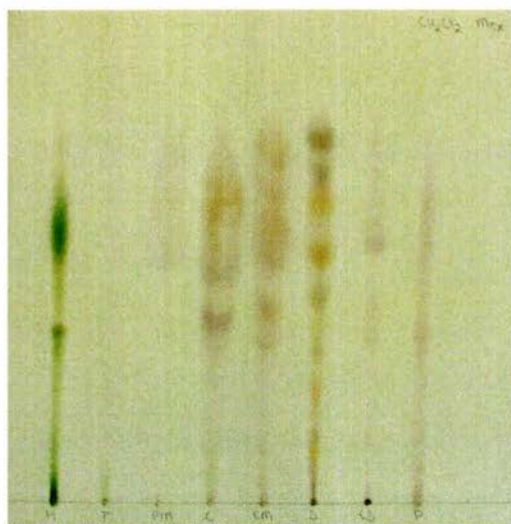


Figura 6. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos diclorometánicos de *P. americana* var. *mexicana*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa madura, cáscara de fruto, cáscara de fruto maduro, semilla, cáscara de semilla y pulpa inmadura. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.



Figura 7. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos diclorometánicos de *P. americana* var. *mexicana*. De izquierda a derecha: pulpa inmadura, pulpa madura, semilla inmadura, y cáscara de semilla madura. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: cloruro de hierro (III) al 2% en alcohol.

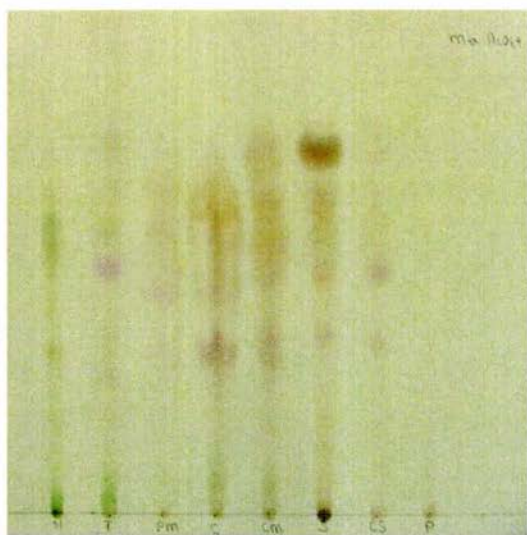


Figura 8. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos de acetato de etilo de *P. americana* var. *mexicana*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa madura, cáscara de fruto, cáscara de fruto maduro, semilla, cáscara de semilla y pulpa inmadura. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.



Figura 9. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos de acetato de etilo de *P. americana* var. *mexicana*. De izquierda a derecha: pulpa inmadura, pulpa madura, semilla inmadura, y cáscara de semilla madura. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: cloruro de hierro (III) al 2% en alcohol.



b) *Persea americana* var. *fuerte*

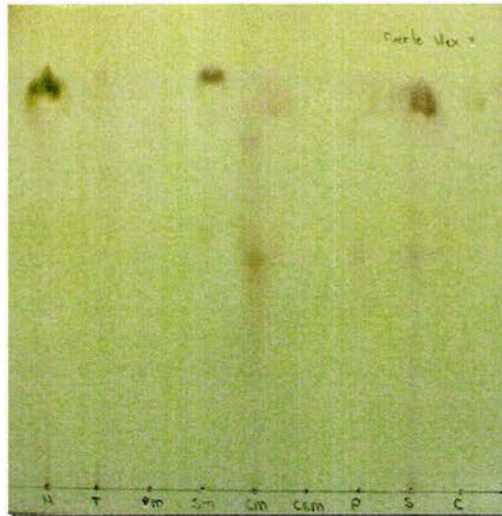


Figura 10. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de *P. americana* var. *fuerte*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa madura, semilla madura, cáscara de fruto maduro, cáscara de semilla madura, pulpa inmadura, semilla inmadura y cáscara de fruto inmaduro. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.



Figura 11. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos hexánicos de *P. americana* var. *fuerte*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa inmadura y pulpa madura. Mezcla de elución: hexano 100%. Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.

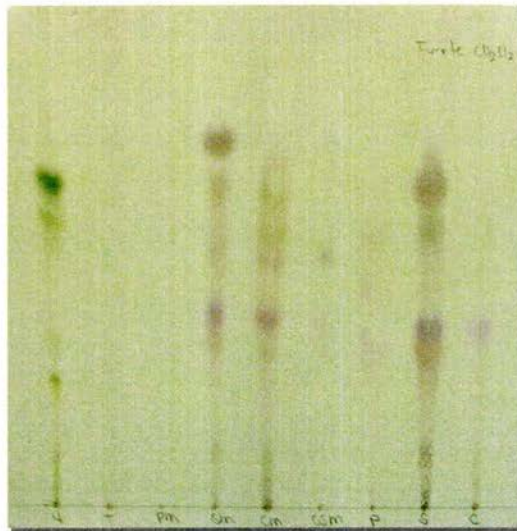


Figura 12. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos diclorometánicos de *P. americana* var. *fuerte*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa madura, semilla madura, cáscara de fruto maduro, cáscara de semilla madura, pulpa inmadura, semilla inmadura y cáscara de fruto inmaduro. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.



Figura 13. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos diclorometánicos de *P. americana* var. *fuerte*. De izquierda a derecha: pulpa inmadura, pulpa madura, semilla inmadura, y semilla madura. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: cloruro de hierro (III) al 2% en alcohol.

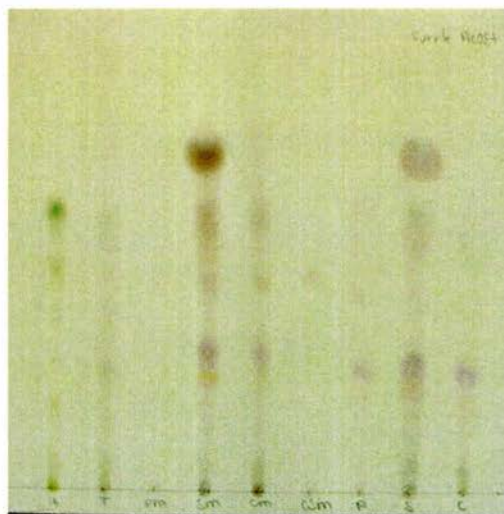


Figura 14. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos de acetato de etilo de *P. americana* var. *fuerte*. De izquierda a derecha: hojas, tallos, pulpa madura, semilla madura, cáscara de fruto maduro, cáscara de semilla madura, pulpa inmadura, semilla inmadura y cáscara de fruto inmaduro. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: sulfato de cerio (IV) y amonio en ácido sulfúrico.



Figura 15. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos de acetato de etilo de *P. americana* var. *fuerte*. De izquierda a derecha: pulpa inmadura, pulpa madura, semilla inmadura, y semilla madura. Mezcla de elución: hexano:acetato de etilo (7:3). Revelador: cloruro de hierro (III) al 2% en alcohol.



VIII. Discusión de resultados

i) Rendimiento de extractos.

Los extractos obtenidos de las partes aéreas de *P. americana* var. *fuerte* permiten deducir lo siguiente: se obtiene un mayor rendimiento con hojas en comparación con los tallos, de ello se puede considerar que se tiene una mayor cantidad de sustancias en hojas ya que de los tallos la porcentage extraído es muy pequeño.

El mayor rendimiento obtenido de extracto de hojas de la variedad fuerte se obtuvo con hexano, esto coincide con algunas investigaciones realizadas con otras especies de *P. americana* de las cuales se ha encontrado que la mayoría de las sustancias identificadas son de baja polaridad (ver figura 1).

El mayor rendimiento de extracto obtenido del fruto de la variedad fuerte fue en la pulpa en comparación con la cáscara, cáscara de semilla y semilla. El mayor rendimiento de extracto en fruto se obtiene con hexano.

Los extractos del fruto de la variedad fuerte obtenidos de acetato de etilo y diclorometano presentan una coloración verde que sugiere la presencia de carotenoides^{4,14,18,21}, mientras que en el de hexano muestra una tenue coloración ámbar que indica la presencia de compuestos menos polares que los carotenoides; estos pueden ser del grupo de los encontrados en otras variedades de *P. americana* (ver tabla 4) como los aceites y polienos. De éstos, los extractos con mayor posibilidad de ser estudiados químicamente son los de hoja y pulpa considerando las razones antes mencionadas.

El rendimiento obtenido de los tallos de la variedad fuerte es muy pequeño por lo cual no se consideran adecuados para realizar un estudio químico convencional debido a que se requiere una mayor cantidad de material vegetal para aislar las



sustancias presentes en una proporción suficiente para elucidar su estructura, identificarla y realizarle pruebas farmacológicas.

Realizando la comparación de las dos variedades de *P. americana* var. *fuerte* y *P. americana* var. *mexicana*, el comportamiento es similar con respecto al rendimiento de los extractos, ya que en ambos el más alto rendimiento se encuentra en hojas y pulpa, sin embargo, en la variedad mexicana el rendimiento es menor en el extracto de pulpa en comparación con la encontrada para la variedad fuerte.

Asimismo, no se encontró una diferencia importante en los rendimientos de los extractos de las partes del fruto maduro con los presentados del fruto inmaduro.

ii) Bioensayo en *Artemia salina* L.

En tabla 12, correspondiente a los ensayos de toxicidad de las partes aéreas de la variedad mexicana, permite observar que todos los extractos presentan una $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$, lo cual significa que todos los extractos son activos³⁰, por lo tanto, se deduce que a menor polaridad mayor actividad del extracto y las sustancias con mayor actividad son sustancias de baja polaridad.

En la tabla 13, se muestran los ensayos de toxicidad de las partes del fruto inmaduro, donde se observa una mayor actividad en la pulpa comparada con los otros extractos contenidos en la tabla e inclusive una actividad mayor a la mostrada por las hojas. Las semillas tienen una actividad moderada comparada con la de extractos de pulpa, hojas y tallos; mientras que la cáscara de semilla y la cáscara de fruto se consideran sin actividad por tener una $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.

Al madurar el fruto su actividad se ve disminuida ya que el $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Esto puede deberse a que al madurar el fruto, los procesos bioquímicos que se efectúan en el fruto transforman las sustancias responsables de su actividad (ver tabla 14).



Los resultados de toxicidad en *P. americana* var. *fuerte* se muestran en la tabla 15 donde se observa que el extracto diclorometánico de hojas es el único que presenta actividad, mientras que los extractos de tallos presenta actividad semejante a la que se presenta en la variedad mexicana.

Comparando los resultados obtenidos en ambas variedades, con respecto a las hojas se puede indicar que es posible que la composición química de las hojas sea diferente.

De los resultados de toxicidad mostrados en las tablas 16 y 17 del fruto maduro e inmaduro de la variedad fuerte, se encontró que no se observa actividad en la pulpa, mientras que las otras partes muestran una actividad moderada y en algunos casos la ausencia de toxicidad como en el extracto hexánico de la cáscara de fruto y cáscara de semilla. Por lo tanto, al realizar la comparación con la variedad mexicana se puede deducir que la composición química de los frutos es diferente, o que las sustancias con actividad se encuentran en una cantidad mínima, así mismo la ausencia de toxicidad en la pulpa muestra que las sustancias de ésta no tienen actividad sobre *Artemia salina* L, sin embargo, éstas podrían mostrar alguna otra actividad en otras pruebas farmacológicas.

Las fracciones de la columna cromatográfica del fruto inmaduro mostraron que de las 11 fracciones obtenidas solo cuatro presentan actividad, de éstas, las fracciones 7,8 y 9 presentaron una actividad mayor a la obtenida para todos los demás extractos (menor a 1µg/mL). Mientras que la actividad de la fracción 1 es de 221.1µg/mL.

Con lo anterior, se puede deducir que el fraccionamiento de este extracto permitió separar las sustancias activas de las inactivas las cuales se concentran en las fracciones 7, 8 y 9 por lo que deben ser consideradas para seguir un estudio biodirigido.



iii) Cromatografía en capa fina (CCF).

a) *Persea americana* var. *mexicana*

En las figuras 4 y 5 se muestran las placas de CCF realizadas a los extractos hexánicos con dos diferentes sistemas de elución, en ellas se presentan pocas sustancias definidas y prácticamente todos los extractos parecen tener la misma composición con excepción del extracto de hojas que presenta manchas verdosas características de los carotenoides. Las sustancias poco polares que revelaron con sulfato de cerio (IV) y amonio indican que éstas contienen grupos funcionales oxidables con dobles o triples enlaces. El extracto de la pulpa, el cual fue muy activo, parece tener una sustancia común con los otros extractos y además contiene sustancias menos polares que interaccionan entre ellas y por lo tanto no se observan manchas definidas (figura 5). Estas sustancias podrían ser las responsables de la diferencia de actividades entre estos extractos.

Con respecto a los extractos diclorometánicos, en la figura 6 se observan que al ser revelados con sulfato de cerio (IV) y amonio, los extractos de cáscara y semilla son los más ricos en composición con sustancias de mediana polaridad, mientras que las hojas son ricas en carotenoides. También puede observarse que la madurez del fruto no afecta en la composición de la cáscara, pero sí tiene efecto en la composición del fruto, en la cual las sustancias más polares se degradan, lo cual tiene efecto en la actividad.

En la placa de la figura 7 revelada con cloruro de hierro (III), se observa que en la semilla se encuentran compuestos fenólicos del tipo de los flavonoides, los cuales pueden ser los responsables de la alta actividad presentada en las semillas en comparación de los demás extractos diclorometánicos ($CL_{50} = 5.6856 \mu\text{g/mL}$). El cloruro de hierro (III) forma un complejo café con los flavonoides debido a la disposición de los hidroxilos como se observa en la figura 16.

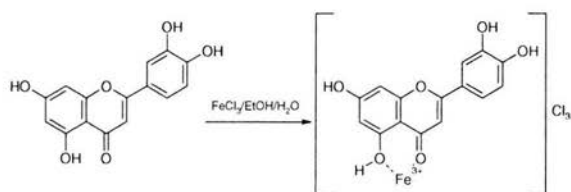


Figura 16. Complejo formado por cloruro de hierro (III) con flavonoides⁴¹.

En la placa de la figura 8 se observa que los extractos de acetato de etilo presentan una composición semejante a los extractos diclorometánicos, excepto por la presencia de algunas sustancias menos polares como se observa en la placa, esto explica la baja de actividad encontrada en las pruebas de artemia salina. En la figura 9, se observan estos extractos revelados con cloruro de hierro (III) no presentan flavonoides en la semilla y por lo tanto explica la disminución de la actividad en *Artemia salina* L. (tabla 13).

b) *Persea americana* var. *fuerte*

En las figuras 10 y 11 se muestran los extractos hexánicos de *P. americana* var. *fuerte*, los cuales parecen tener una composición semejante a los de la variedad mexicana, excepto por los compuestos que se observan por las manchas a la mitad de la placa de la figura 4. Con ello se puede asegurar que la composición de los extractos de ambas variedades es diferente y que esta composición se vio reflejada en la diferencia de actividad mostrada en *Artemia salina*.

En la placa de la figura 12 se muestran los extractos diclorometánicos de la variedad fuerte y al compararla con la placa de la figura 6 se observa la diferencia en composición entre ellos y entre los extractos de la variedad mexicana, diferencia reflejada en la actividad frente *Artemia salina*. En general, la actividad de los extractos de la variedad fuerte son menos activos que los de la variedad mexicana. Al tener una gran variedad de sustancias no se puede indicar si alguna o algunas de



éstas son las responsables de la actividad o falta de la misma, ya sea por ellas mismas o por un tipo de sinergismo.

En la placa de la figura 14, se encuentran los extractos obtenidos con acetato de etilo, en la cual se observa el mismo comportamiento: la composición es diferente entre los extractos, aunque existen algunas sustancias en común, y con los extractos de la variedad mexicana. Por lo tanto, la actividad fue muy diferente entre las variedades, observándose inclusive una pérdida de actividad en los extractos de la variedad fuerte. Sin embargo, no se descarta que algunas de las sustancias de estos extractos presente alguna actividad y que ésta sea antagonizada por el mismo extracto.

Por último, en las placas de las figuras 13 y 15 no se observa la presencia de flavonoides como en la variedad mexicana. Sin embargo los extractos de semillas mantienen aún una actividad alta, por lo que se puede suponer que existen otros compuestos que son los responsables de la misma, diferentes a los flavonoides. Asimismo, se puede suponer que los flavonoides de los extractos de la variedad mexicana no son los responsables de la misma.



IX. Conclusiones

Se concluye que *Persea americana* Mill. var. *mexicana* presenta una mayor actividad en la matriz biológica *Artemia salina* L. que *Persea americana* Mill. var. *fuerte* en la mayoría de sus extractos probados. Así mismo, en la variedad mexicana se concentra dicha actividad principalmente en los extractos de la pulpa del fruto inmaduro y en las semillas. El extracto hexánico de la pulpa y todos los extractos de la semilla no contienen carotenoides los cuales dificultan la separación cromatográfica de las sustancias. Por ello los extractos de pulpa hexánico y diclorometánico así como el extracto de semillas de acetato de etilo de la variedad mexicana son los más adecuados para realizar un estudio químico biodirigido



X. Sugerencias

Se sugiere realizar estudios de los extractos obtenidos de *P. americana* con hexano, diclorometano y acetato de etilo, que resultaron activos, realizando un estudio químico convencional para aislar, purificar, caracterizar e identificar a las sustancias responsables de la actividad en *Artemia salina* L., la cual indica la posibilidad de que estas mismas sustancias presenten actividad citotóxica y antitumoral.

A los extractos que presentan actividad y de los cuales se obtiene un rendimiento pequeño se recomienda realizar cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) o de gases (CG), preferentemente acoplada a masas (EM) para determinar la composición y compararla con los demás extractos obtenidos y entre ellos.



XI. Apéndice I

***Artemia Salina* Leach**

Artemia salina Leach es un crustáceo que habita en lagos salinos, lagunas y otras aguas hipersalinas. Puede ser utilizada para pruebas de actividad farmacológica de extractos de plantas así como teratología ecotoxicología para evaluar toxicidad y dosis letal, es útil para evaluar insecticidas, micotoxinas y algunas otras sustancias químicas como por ejemplo el plomo y algunos otros metabolitos.

Tiene la característica de poder suspender su metabolismo cuando se encuentran en huevecillos los cuales son muy duros y pueden permanecer guardados por muchos años si permanecen secos. Los quistes permanecen metabólicamente inactivos hasta que se colocan en un medio salino. El sistema metabólico puede resistir un amplio rango de temperatura 100 a 250 °C.

El rango optimo de temperatura para *Artemia salina* es entre 25 y 30 °C, también toleran un mínimo de temperatura de 6 °C y un máximo entre 35 y 40 °C.

Los huevecillos son altamente disponibles a un bajo costo con una pequeña cantidad se pueden obtener muchos y después de un periodo de incubación de 24 h en un medio salino en condiciones de luz y aeración se obtienen los organismos para probar diferentes sustancias.

Después de casi 20 h la membrana del quiste se rompe y el embrión se rompe rodeado por una membrana (figura 17).

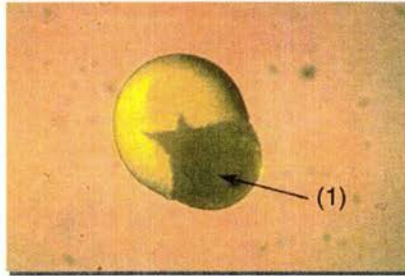


Figura 17. Quiste en el estado de rompimiento (1) ojo del nauplio.

El desarrollo del nauplio es completado en un corto periodo de tiempo y la membrana es rota y el nauplio nace.

En su primer estado larvario presenta una coloración café naranja un ojo rojo en la región de la cabeza y tres pares de apéndices (figura 18).

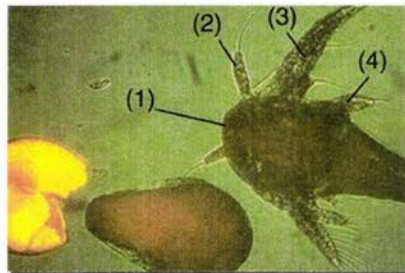


Figura 18. Embrión en forma de sombrilla (izquierdo) (1) ojo del nauplio; (2) antenuela; (3) antena (4) mandíbula.

En este momento la larva no puede comer y su sistema digestivo es disfuncional. Después de 8 h llega a su segundo estado larvario y come pequeñas partículas de comida, por ejemplo, células de algas bacterias o detritos^{23,42}.



XII. Referencias

1. Bye R, Linares E and Estrada E.1994. Biological diversity of Medicinal Plants in Mexico. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. 1994 Phytochemical society of North America. *Annual Meeting, Simposium*. Mexico.
2. Lozoya X, Aguilar A y Camacho J.1987. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev Med IMSS*, 25:283.
3. Pérez M. 1994. Plantas Medicinales, etnobotánica y fitoquímica: importancia de la investigación interdisciplinaria. *Folium (Instituto de Química)*, 7, 2-3.
4. Domerge F, Helms G, Prusky D y Browse J. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado. *Phytochemistry*, 54:183-189.
5. Navarrete A. 1992. Evaluación farmacológica de las plantas medicinales. En: *Plantas medicinales de México. 4ª ed.* (Estrada E, editor), UACH: 255-267.
6. APROAM, 2003. Historia del aguacate en México. (artículo en línea) Fecha de acceso: 6 de febrero del 2003. URL disponible en: www.aproam.com/Contenido/aguacate/Historia.htm
7. ANIAME. 2002. El aceite del aguacate en México. *Revista ANIAME*. (Revista electrónica) Fecha de acceso: 6 de febrero del 2003. URL disponible en: www.aniname.com.mx
8. Gómez V. 1999. Characterization of Avocado (*Persea americana* Mil.) varieties of low oil Content. *J Agric Food Chem*, 47:2707-2710.
9. México desconocido. 1996. Plantas mexicanas al mundo. (En: *Plantas que curan*. Colección: *Guía México desconocido*) Núm. 29:22.
10. Duke J, Bogenschutz-Godwin M, duCellier J y Duke P. 2002. *CRC Handbook of medicinal plants*. CRC Press, Estados Unidos, 47.
11. Mijares P y López L. 1998. Variedades de aguacate y su producción en México. *Memoria Sánchez Colín CITAMEX. SC*, México, 22-31.
12. Morton J. 1987. Avocado. (En: *Fruits of warm climates*. Morton J F, editora) Florida, 91-102.



13. CRFG. 1996. Avocado fruit facts. (Artículo en línea) California Rare Friut Growers. Fecha de acceso: 20 de enero del 2003. URL disponible en: www.cfr.org/pub/ff/avocado.html
14. Carman R y Handley P. 1999. Antifungal diene in leaves of various avocado cultivars. *Phytochemistry*, 50:1329-1331.
15. Hostettman K, Marston A y Wolfender J. 1995. Strategy in search for new biologically active plant constituents. (En: *Phytochemistry of plants used in tradicional medicine*, Hostettman K, editor) Oxford Science Pub, Oxford: 17-45.
16. Houghton P. 2001. Old yet new - Pharmaceuticals from plants. *J Chem Educ*, 78:175.
17. López M y Molina J. 1997. Productos naturales. *Avance y perspectiva*. Enero-febrero: 1-7.
18. Oberlies N, Rogers L, Martin J y McLaughlin. 1998. Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. *J Nat Prod*, 61:781-785.
19. Adikaram N, Ewing D, Karunaratne M y Wijeratne E. 1992. Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. *Phytochemistry*, 31:93-96.
20. Adeboye J, Fajonyomi M, Makinde J y Taiwo O. 1999. A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats. *Fitoterapia*, 70:15-20.
21. Adeyemi O, Okpo S y Ogunti O. 2002. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (*Lauraceae*). *Fitoterapia*, 73:375-380.
22. Brown B. 1973. Qualitative and quantitative estimation by thin-layer and gas chromatography of a series of C₁₇ oxygenated aliphatic compounds in the avocado (*Persea americana*). *J Chromatogr*, 86:239-245.
23. Calleja M, Persoone G y Geladi P. 1994. Human acute toxicity prediction of the first 50 MEIC chemicals by a battery of ecotoxicological test and physicochemical properties. *Food Chemical Toxicol*, 32:173-187.
24. Gross J, Babai M y Lifshitz A. Carotenoids in pulp, peel and leaves of *Persea americana*. *Phytochemistry*, 12:2259-2263.



25. Gross J, Gabai M y Lifshitz A. 1974. Structures of some carotenoids from the pulp of *Persea americana*. *Phytochemistry*, 13:1917-1921.
26. Hashimura H, Ueda C, Kawabata J y Kasai T. 2001. Acetyl-CoA carboxilase inhibitors from avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. *Biosc Biotechnol Biochem*, 65:1656-1658.
27. Ponce-Macotela M, Navarro-Alegria I, Martinez-Gordillo M y Alvarez-Chacon R. 1994. *In vitro* effect against Giardia of 14 plant extracts. *Rev Inv Clín*, 46:343-347.
28. Meade N, Staat R, Langley S y Doyle R. 1980. Lectin-like activity of *Persea americana*. *Carbohydr Res*, 78:349-363.
29. Rojas R, Bustamente B, Bauer J, Fernández I, Albán J y Lock O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 88:199-204.
30. Meyer B, Ferrigni N, Putman J, Jacobson L, Nichols D and McLaughlin J. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. 1982. *Planta Med*, 45:31-34.
31. Itharat A, Houghton P, Eno-Amooquaye E, Burke P, Sampson J y Raman A. 2004. *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol*, 90:33-38.
32. Finney D. 1978. *Statistical method in biological assay*. Third edition. McMillan Ub. Co., USA, 349-403.
33. McLaughlin J. 1991. Crow gall tumours on potato disc and Brine Shrimp lethality; Two simple bioassay for higher plant screening and fractionation. *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 6. Assay for bioactivity. Academic Press Limited, Estados Unidos, 1-30.
34. Wang Y, Toyota M, Krause F, Hamurger M and Hostettman. 1990. Polyacetylenes from *Artemisia borealis* and their biological activities. *Phytochemistry*, 29, 3101-3105.
35. Abreu J, Miranda M, Toledo G y Castillo O. 2001. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). *Rev Cubana Farm*, 35:56-60.



36. Toussaint M, Shedd T, Van der Schalie W y Leather G. 1995. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity test. *Environ Toxicol Chem*, 14:907-915.
37. Carballo J, Hernández-Inda Z, Pérez P y García-Gravalos M. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol*, 2:17-21.
38. Moreno A, Dorantes L Galindez J y Guzmán R. 2003. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *J Agric Food Chem*, 51:2216-2221.
39. Alltech. 1999. *TLC spray reagents. Data sheet 18200D*. Alltech Associates, Inc. Deerfield, IL.
40. Koua H, Han S y d'Almeida M. 1998. Histopatology of *Anopheles gambiae* s.l. Giles (*Diptera, Culicidae*) subjected to the larvicidal activity of the aqueous extract of *Persea americana* Miller (*Lauraceae*). *Bull Soc Pathol Exot*, 91:252-256.
41. Mira L, Fernandez T, Santos M, Rocha R, Florencio H y Jennings K. 2002. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A mechanism for their Antioxidant Activity. *Taylor & Francis Health Sciences part of the Taylor & Francis Group*. 36,(11):1199-1208.
42. Persoone, G y Sorgeloos P. 1980. General aspects of ecology and biogeography of *Artemia*. En: *The Brine shrimp Artemia. Vol 3:(G. Persoone P , Sorgeloos , O. Roels y E. Jaspers)*. Universal Press. Wetteren, Bélgica: 8-23