UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Cuantificación de metabolitos y evaluación del efecto citotóxico de extractos de semilla y cáscara de dos variedades de *Persea americana* (Hass y criollo) sobre líneas celulares malignas de mama y cérvix”.

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

L.N. BELINDA PATRICIA VELÁZQUEZ MORALES

Director(a) de Tesis

DRA. MARÍA DEL CARMEN VALADEZ VEGA

Codirector(a) de Tesis

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Mayo de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine

18/febrero/2022
AAM/MCBS/031/2022
Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Belinda Patricia Velázquez Morales
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Cuantificación de metabolitos y evaluación del efecto citotóxico de extractos de semilla y cáscara de dos variedades de *Persea americana* (Hass y criollo) sobre líneas celulares malignas de mama y cérvix" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
PRIMER VOCAL	Dra. María del Carmen Valadez Vega
SECRETARIO	Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
SUPLENTE	Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez
SUPLENTE	Dr. Luis Delgado Olivares

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,
México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308,2361,4346,4310
medicina@uaeh.edu.mx

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 1006205.

Agradezco de corazón a la Dra. María del Carmen Valadez Vega por su dirección, apoyo y paciencia durante todo el proceso de elaboración de este proyecto de investigación. Asimismo, al Dr. Alejandro Manuel García Carrancá, por brindarme su valioso tiempo y confianza, porque sin conocerme me otorgó la oportunidad de co-dirigir mi tesis. Así como también al Dr. José Roberto Villagómez Ibarra por su apoyo y conocimiento sobre los estudios fitoquímicos, al Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez y al Dr. Luis Delgado Olivares por ser mis asesores metodológicos.

A su vez, me encuentro muy agradecida con el CONACyT por el apoyo brindado con la beca de manutención durante los 24 meses que duró el posgrado. Así como también con la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por permitirme continuar con mi formación académica, puesto que era uno de mis grandes sueños.

Resumen

El cáncer de mama y de cérvix son los dos tipos de cáncer más comunes en las mujeres a nivel mundial, los cuales son tratados tradicionalmente por quimioterapia y radioterapia; sin embargo, algunas personas deciden hacer uso de la medicina alternativa, incluyendo el empleo de plantas medicinales, tal es el caso de *Persea americana*, conocido comúnmente como aguacate. Algunos autores han reportado que los extractos y metabolitos secundarios de sus diferentes partes poseen actividad citotóxica y apoptótica sobre diversos tipos de cáncer, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto citotóxico de los extractos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo sobre líneas celulares malignas de mama (MDA-MB-231) y cérvix (SiHa); para lo cual se prepararon extractos en metanol y acetato de etilo de la cáscara y semilla de ambas variedades de aguacate.

Se determinó el contenido de fenoles, antocianinas, betalaínas, taninos, saponinas e hidratos de carbono y se identificó la presencia de alcaloides, antraquinonas, chalconas, auronas, esteroides, triterpenos y cumarinas en los extractos; así como también se evaluó la actividad antioxidante por el método $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$. Por otro lado, se analizó el efecto citotóxico sobre eritrocitos humanos por el método de hemólisis, y el efecto sobre la viabilidad celular en los dos tipos de células malignas empleando el método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio (MTT) a 24, 48 y 72 h.

Los resultados mostraron que todos los extractos contenían altas concentraciones de fenoles y taninos, destacándose SHM con 90.18 mg EAG/g y 360.73 mg EC/100g, respectivamente; también presentaron hidratos de carbono, siendo SCM el de mayor contenido, con 232.39 µg/g; únicamente cuatro extractos mostraron actividad hemolítica causada por saponinas (10-20 UH/mg), todas las muestras presentaron betalaínas en baja concentración y ningún extracto contenía antocianinas. En seis extractos se detectaron alcaloides, en dos esteroides y triterpenos, y en ningún extracto se identificaron antraquinonas, chalconas, auronas o cumarinas. Por otra parte, en todos los extractos se detectó alta actividad antioxidante, sobresaliendo SHM con 323.61 mg ET/g por el método $ABTS^{\cdot+}$ y 1623.53 mg ET/g por $DPPH^{\cdot+}$.

En relación a la actividad biológica, todos los extractos presentaron actividad hemolítica dosis-dependiente, siendo menor a dosis bajas; el extracto SHM fue el que exhibió el menor efecto, en un rango de 1.41 – 11.81 % de hemólisis. Los ensayos en células malignas mostraron que los extractos CHA, SHA, CCA, SCA y CCM tuvieron actividad citotóxica dosis-tiempo dependiente en los dos tipos de células; mientras que CHM y SCM disminuyeron la viabilidad celular a dosis bajas, sin embargo, a dosis más altas presentaron recuperación de la viabilidad; por otra parte, SHM incrementó la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis y el tiempo. La mayor actividad citotóxica sobre las células MDA-MB-231 a 24, 48 y 72 h fue mostrada por el extracto CHM con valores de DI_{50} de 78.88, 62.47 y 36.5 µg/mL, respectivamente, mientras que en la línea celular SiHa fue la muestra SCA en los tres tiempos de exposición con DI_{50} de 132.44, 54.70 y 31.12 µg/mL. En conclusión, los extractos presentaron alto contenido de compuestos fenólicos y taninos y elevada actividad antioxidante, sin embargo, los extractos con menores cantidades de compuestos fenólicos y menor capacidad antioxidante presentaron la mayor actividad citotóxica; por el contrario, el extracto con el más alto contenido fenoles y el mayor efecto antioxidante elevó la viabilidad celular.

Palabras clave: Cáncer de mama, cáncer de cérvix, aguacate Hass, aguacate criollo y efecto citotóxico.

Abstract

Breast and cervical cancer are the two most common types of cancer in women worldwide, which are traditionally treated by chemotherapy and radiotherapy; however, some people decide to make use of alternative medicine, including the use of medicinal plants, such as *Persea americana*, commonly known as avocado. Some authors have reported that extracts and secondary metabolites from different parts of the avocado have cytotoxic and apoptotic activity on various types of cancer, so the aim of this study was to evaluate the cytotoxic and antiproliferative effect of Hass and creole avocado peel and seed extracts on malignant breast (MDA-MB-231) and cervical (SiHa) cell lines; therefore, extracts were prepared in methanol and ethyl acetate from the peel and seed of both avocado varieties using the sequential maceration method, obtaining eight extracts.

The content of phenols, anthocyanins, betalains, tannins, saponins and carbohydrates was determined and the presence of alkaloids, anthraquinones, chalcones, aurones, steroids, triterpenes, and coumarins in the extracts was identified; the antioxidant activity was also evaluated by the $ABTS^{\cdot+}$ and $DPPH^{\cdot}$ methods. On the other hand, the cytotoxic effect on human erythrocytes was analyzed by the hemolysis method, and the effect on cell viability in the two types of malignant cells using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium (MTT) method at 24, 48 and 72 h.

The results showed that all extracts contained high concentrations of phenols and tannins, with SHM standing out with 90.18 mg GAE/g and 360.73 mg CE/100g, respectively; they also contained carbohydrates, with SCM being the one with the highest content, with 232.39 µg/g; only four extracts showed hemolytic activity caused by saponins (10-20 HU/mg), all the samples contained betalains in low concentration and none of the extracts contained anthocyanins. Alkaloids were detected in six extracts, steroids and triterpenes in two, and no anthraquinones, chalcones, aurones, or coumarins were identified in any extract. On the other hand, high antioxidant activity was detected in all extracts, with SHM standing out with 323.61 mg TEAC/g by the $ABTS^{\cdot+}$ method and 1623.53 mg TEAC/g by $DPPH^{\cdot}$.

All extracts exhibited dose-dependent hemolytic activity, being lower at reduced doses; the SHM extract exhibited the less effect, ranging from 1.41 - 11.81 % hemolysis. Assays on malignant cells showed that CHA, SHA, CCA, SCA, and CCM extracts had dose-time dependent cytotoxic activity on both cell types; while CHM and SCM decreased cell viability at low doses, however, at higher doses they showed recovery of viability; on the other hand, SHM increased cell viability in a dose-dependent manner. The highest cytotoxic activity on MDA-MB-231 cells at 24, 48 and 72 h was shown by CHM extract with DI50 values of 78.88, 62.47 y 36.5 µg/mL, respectively, while on SiHa cell line it was the SCA extract at all the three exposure times with DI50 results of 132.44, 54.70 y 31.12 µg/mL. In conclusion, the extracts showed high content of phenolic compounds and tannins and high antioxidant activity; however, the extracts with lower amounts of phenolic compounds and lower antioxidant capacity showed the highest cytotoxic activity; on the contrary, the extract with the greatest content of phenols and the highest antioxidant effect elevated cell viability.

Key words: Breast cancer, cervical cancer, Hass avocado, creole avocado and cytotoxic effect.

Agradecimientos

A mi mami, que siempre has cuidado de mí, incluso siendo un adulto, que has hecho hasta lo imposible por verme bien y me has apoyado en todo lo que he deseado. Por tus regaños, por tu nobleza, por todo tu amor, por ser la mejor mamá del mundo. Te amo, Patricia Estrella.

A mi hermana, por ser la mejor del universo, por estar ahí en las buenas, pero más en las malas, por aconsejarme y guiarme aún desde la lejanía. Por llamarme y platicar conmigo cuando estoy triste. Eres mi persona favorita en todo mundo. Te adoro infinitamente, Karito Chicken, no sé qué sería de mí sin ti.

A mi papá, que siempre me inculcaste que debía estudiar para salir adelante. ¿Te acuerdas de la vez que te conté que quería estudiar la maestría? ¡Pues lo logré! Ojalá pudieras estar aquí para verlo, pero sé que festejas conmigo desde el cielo. Te extraño, pa, me gustaría poder reparar todo lo que se nos rompió.

A los angelitos que cuidan de mí: Abuela Lola, por amarme como sólo tú sabías hacerlo. Abuelo Raúl, por haber sido tan buen padre y esposo. Abuela Aida, por ser tan amorosa conmigo, aunque sólo fuera en mis sueños. Abuelo Gelacio, por enseñarme de la manera más dulce que los monstruos existen. Tía Gina, por ser la mariposa blanca que guía mi camino.

A Lisandra, por ser esa lucecita que ilumina mi vida, por ser tan dulce, tierna, inteligente y hermosa. Te amo con el corazón, mi amor.

A July, por convertirte en mi amiga-hermana, por todo el apoyo, las risas y las confidencias, por verme reflejada en ti e impulsarme a lograr más cosas. Las cosas malas nos marcaron, pero las cosas buenas nos unieron. Love you.

A mis perritos, gatitos y ratitas, por darme tanto amor y por acompañarme en todas las noches de desvelo. Ustedes no lo saben, pero son el motivo por el que me levanto todos los días. Los amo con toda mi alma, amores míos.

“La vida se vive hacia adelante, pero se entiende hacia atrás”.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 1

II. ANTECEDENTES 2

2.1. Generalidades 2

2.1.1. Cáncer 2

2.1.1.1. Etiología y fisiopatología 2

2.1.1.2. Medicina tradicional contra el cáncer 4

2.1.1.3. Uso de la medicina alternativa o complementaria contra el cáncer 5

2.1.2. Plantas medicinales 6

2.1.3. Características de la especie Persea americana 9

2.1.3.1. Compuestos bioactivos y propiedades medicinales del aguacate 11

***2.2. Antecedentes del Problema* 16**

2.2.1. Cáncer de mama 16

2.2.2. Cáncer de cérvix 17

2.2.3. Efecto de la semilla y la cáscara de diferentes variedades de P. americana sobre el cáncer 18

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 20

IV. JUSTIFICACIÓN 21

V. HIPÓTESIS 22

VI. OBJETIVOS 22

6.1. Objetivo general 22

6.2. Objetivos específicos 22

VII. MATERIALES Y MÉTODOS 23

7.1. Contexto de la investigación 23

7.2. Diseño y tipo de estudio 23

7.3. Estudios fitoquímicos 23

7.3.1. Material vegetal 23

7.3.2. Obtención de los extractos 23

7.3.3. Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos 24

7.3.3.1. Fenoles totales 24

7.3.3.2. Antocianinas 24
7.3.3.3. Betalaínas 25
7.3.3.4. Taninos 25
7.3.3.5. Saponinas 25
7.3.3.6. Hidratos de carbono 26
7.3.4. Determinación cualitativa de compuestos 26
7.3.4.1. Alcaloides 26
7.3.4.1.1.Método de Mayer 26
7.3.4.1.2.Método de Dragendorff 27
7.3.4.2. Antraquinonas 27
7.3.4.3. Chalconas y auronas 27
7.3.4.4. Esteroides y triterpenos 27
7.3.4.5. Cumarinas 27
7.3.5. Actividad antioxidante de los extractos 28
7.3.5.1. Método ABTS·⁺ 28
7.3.5.2. Método DPPH· 28
7.4. Estudios biológicos 29
7.4.1. Actividad hemolítica 29
7.4.2. Líneas celulares 29
7.4.3. Cultivo celular 30
7.4.4. Actividad citotóxica 30
7.5. Análisis estadístico 30
7.6. Aspectos éticos 31
VIII. RESULTADOS 32
8.1. Estudios fitoquímicos 32
8.1.1. Preparación de los extractos 32
8.1.2. Determinación cuantitativa de metabolitos de los extractos 32
8.1.2.1. Fenoles totales 32
8.1.2.3. Betalaínas 33
8.1.2.4. Taninos 33
8.1.2.5. Saponinas 33

8.1.2.6. Hidratos de carbono 34
8.1.3. Determinación cualitativa de compuestos 35
8.1.4. Actividad antioxidante 36
8.2. Estudios biológicos 36
8.2.1. Actividad hemolítica 36
8.2.2. Actividad citotóxica 39
IX. DISCUSIÓN 48
9.1. Análisis fitoquímico de los extractos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo. 48
9.1.1. Determinación cuantitativa de compuestos 48
9.1.2. Determinación cualitativa de compuestos 51
9.1.3. Actividad antioxidante 52
9.2. Estudios biológicos 55
9.2.1. Actividad hemolítica 55
9.2.2. Actividad citotóxica 56
X. CONCLUSIONES 60
XI. RECOMENDACIONES 61
XII. REFERENCIAS 62
XIII. ANEXOS 81
13.1. Dictamen del Comité de Ética 81
13.2. Consentimientos informados firmados 82
13.3. Análisis estadísticos de los ensayos biológicos 84

Índice de Figuras

Figura 1. Alteraciones moleculares que conducen al desarrollo del cáncer de mama…….. 17
Figura 2. Efecto hemolítico causado por los extractos de aguacate……..…… 38
Figura 3. Efecto de los extractos de aguacate Hass sobre la viabilidad de la línea celular SiHa…….. 40
Figura 4. Efecto de los extractos de aguacate criollo sobre la viabilidad de la línea celular SiHa…….. 42
Figura 5. Efecto de los extractos de aguacate Hass sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 ……. 44
Figura 6. Efecto de los extractos de aguacate criollo sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231…….. 45

Índice de Tablas

Tabla 1. Efectos benéficos de algunas plantas medicinales sobre la salud humana……..….. 7
Tabla 2. Compuestos identificados en la semilla y cáscara de aguacate Hass…….…. 12
Tabla 3. Compuestos identificados en la cáscara de aguacate criollo……..….. 15
Tabla 4. Concentraciones empleadas en los ensayos de citotoxicidad…….…. 31
Tabla 5. Rendimiento en la obtención de los extractos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo……. 32
Tabla 6. Composición cuantitativa de metabolitos en los extractos de aguacate Hass y criollo…… 34
Tabla 7. Composición cualitativa de metabolitos en los extractos de aguacate Hass y criollo…… 35
Tabla 8. Actividad antioxidante de los extractos de aguacate Hass y criollo…… 37
Tabla 9. DI_{50} de los extractos de aguacate Hass y criollo sobre ambas líneas celulares en los ensayos de citotoxicidad……... 47

Abreviaturas

- ABTS$^{\cdot+}$: Ácido 2,2’ azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- BE: Betalaínas.
- CCA: Extracto de cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo.
- CCM: Extracto de cáscara de aguacate criollo en metanol.
- CHA: Extracto de cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo.
- CHM: Extracto de cáscara de aguacate Hass en metanol.
- DE: Desviación estándar.
- DI_{50}: Dosis inhibitoria media.
- DMEM: Medio eagle modificado de Dulbecco.
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- DPPH$^{\cdot}$: Radical 2,2 difenil-1-picrihidracilo.
- EAG: Equivalentes de ácido gálico.
- EC: Equivalentes de catequina.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- ERO: Especies reactivas de oxígeno.
- ET: Equivalentes de trolox.
- FBS: Suero bovino fetal.
- FITC: Tinte verde fluorescente.
- Keap1: Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch.
- MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio.
- NC: No calculado.
- ND: No detectado.
- NRF2: Factor nuclear eritroide 2.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.

- PI: Ioduro de propidio.
- SCA: Extracto de semilla de aguacate criollo en acetato de etilo.
- SCM: Extracto de semilla de aguacate criollo en metanol.
- SHA: Extracto de semilla de aguacate Hass en acetato de etilo.
- SHM: Extracto de semilla de aguacate Hass en metanol.
- UH: Unidades hemolíticas.
- VPH: Virus del papiloma humano.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades de las de mayor prevalencia a nivel mundial (1); en mujeres, el cáncer de mama es el más común y la principal causa de muerte (2), mientras que el cáncer de cérvix ocupa el segundo lugar, sobre todo en los países de bajo desarrollo, y su principal causa es la infección por el virus del papiloma humano (VPH), el cual es considerado un virus de transmisión sexual (3).

Los tratamientos contra el cáncer más comúnmente utilizados son la quimioterapia (4) y la radioterapia (5), sin embargo, las plantas también han sido ampliamente usadas en la medicina alternativa (6), tal es el caso de *Persea americana* (aguacate), pues se sabe que sus diferentes partes poseen actividad anticáncer y se cree que es gracias a su contenido de compuestos bioactivos, asimismo, tienen actividad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antiplaquetaria, antitrombótica, cicatrizante, neuroprotectora, inmunomoduladora, vasodilatadora, hipolipemiante e hipoglicemiante (7–26). México es el principal productor de aguacate a nivel mundial (27), las entidades federativas con mayor producción de las variedades Hass, Fuerte y criollo durante el 2020 fueron Michoacán, Jalisco y Estado de México (28).

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la preparación de ocho extractos de semilla y cáscara de aguacate Hass y criollo en metanol y acetato de etilo, de los cuales se calculó la actividad antioxidante por el método de $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$; se cuantificó el contenido de fenoles totales, antocianinas, betalaínas, taninos, saponinas e hidratos de carbono; se determinó cualitativamente la presencia de alcaloides, antraquinonas, chalconas, auronas, esteroides, triterpenos y cumarinas; se analizó la actividad hemolítica; y se evaluó la actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cérvix (SiHa).

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

2.1.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que mayor afecta a la población a nivel mundial (1); según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se caracteriza por el crecimiento y diseminación de las células de manera descontrolada, esto provoca la formación de tumores que invaden los tejidos adyacentes y se propagan a otros órganos, lo cual se denomina como metástasis (29). Según las cifras que reportó el Observatorio Mundial del Cáncer en el 2020, el número de casos prevalentes en ambos sexos a nivel mundial fue de 50,550,287, mientras que en México fue de 530,602 (30).

2.1.1.1. Etiología y fisiopatología

Se sabe que la etiología del cáncer es multifactorial: Puede ser iniciada por exposición a radiaciones como la iónica o la ultravioleta, por contacto con ciertos compuestos químicos carcinogénicos como el benzopireno y el asbesto (31) que son capaces de provocar mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (32), por infecciones biológicas como virus (31) los cuales poseen secuencias genéticas que pueden modificar el material genético de la célula infectada (32), por el aumento de radicales libres que dañan al ADN de las células (33) o por herencia de mutaciones genéticas donde los portadores se encuentran más predispuestos al desarrollo del cáncer (32), estos defectos heredados se presentan en todas las células desde el nacimiento (34).

Sin importar el tipo de cáncer, el fundamento más aceptado sobre la fisiopatología de esta enfermedad es el daño genético de las células (31). Las células normales se convierten en células cancerosas gracias a mutaciones del material genético (1) que pueden presentarse en dos grandes grupos de genes: Los *oncogenes* y los *genes supresores de tumores*, ambos grupos de genes se encargan del buen funcionamiento, crecimiento, diferenciación y muerte celular (32).

Los *oncogenes* se encuentran de manera dominante y se conocen más de 100, sin embargo, sólo algunos se encuentran alterados en los tumores, como lo son *ABL, AKT1, BCR, CBL,*

CDK4, CKR, DBL, MYC, RAS, REL y *RET*, donde la familia de los oncogenes *RAS* son los que se encuentran alterados con mayor frecuencia en los tumores. Los *genes supresores de tumores* se encuentran de manera recesiva, dando lugar a la formación de tumores, entre ellos se encuentran *APC, BRCA1, BRCA2, DCC, DPC, DPC4, E-caderina, INK/MTS/CDK41, INK4B/MTS2, MCC, MLH1, MLH2, NF1, NF2, P53, PHB, PTC, RB1, TGFBR1, TGFBR2, VHL, WAF1* y *WT1* (32). Los oncogenes promueven la división celular y suelen ser receptores de membrana; los genes supresores tumorales se encargan de detener la división celular y provocar muerte celular, éstos suelen ser factores de transcripción (34).

Al encontrarse dañado el material genético, las células cancerosas tienen la capacidad de inhibir la muerte celular (apoptosis) y de dividirse de manera descontrolada, lo que da lugar a la formación de un tumor (tumorogénesis) (1). También son capaces de producir nuevos vasos sanguíneos alrededor del tumor (angiogénesis), estos nutren a las células tumorales y favorecen su crecimiento y proliferación (34) estimulando la invasión hacia otros tejidos (metástasis) (1), además, el sistema inmune actúa provocando un estado de inflamación crónico que promueve el crecimiento tumoral (1).

Las etapas de la tumorogénesis son: *Iniciación* (daño en el material genético), *promoción* (las células con material genético dañado crecen) y *progresión* (células con muchos daños en el material genético que conllevan a la formación de un tumor). Los tumores se pueden clasificar según su origen en carcinomas (células epiteliales), sarcomas (células el tejido conectivo y musculares) y los que no se ajustan a las categorías mencionadas (leucemia y tumores en el sistema nervioso) (32).

El estadio del cáncer es un indicador importante de la progresión de la enfermedad y se usa para determinar el plan de tratamiento; los principales estadios son I, II, III y IV de acuerdo al tamaño y propagación del tumor, siendo el estadio I cuando el tumor es relativamente pequeño y está contenido dentro del órgano, mientras que el estadio IV es considerado como enfermedad avanzada o metastásica, donde el cáncer se ha diseminado hacia otros órganos a través del torrente sanguíneo y del sistema linfático (35).

2.1.1.2. Medicina tradicional contra el cáncer

La quimioterapia es el tratamiento más comúnmente utilizado para la inhibición del crecimiento tumoral gracias al arresto del ciclo celular y/o de la apoptosis celular (4); existen diferentes tipos de medicamentos de quimioterapia, entre ellos se encuentran: La *ciclofosfamida*, la cual es un agente citotóxico muy efectivo en un amplio tipo de tumores, ésta interactúa con el ADN y posee la habilidad de interferir con la mitosis y la diferenciación celular de los tejidos en rápida proliferación; el *metotrexato,* el cual previene la división celular al combinarse irreversiblemente con las enzimas involucradas en la proliferación celular; el *5-fluorouracilo*, tiene un efecto citotóxico que bloquea la proliferación celular; las *antraciclinas*, éstas son antibióticos citotóxicos que dañan el ADN y desencadenan la apoptosis; los *taxanos*, los cuales previenen el crecimiento de las células cancerosas al afectar sus microtúbulos (36). La radioterapia es un tratamiento que induce a la muerte celular; la radiación es un agente físico que forma iones y deposita energía en las células de los tejidos que atraviesa, esta energía depositada posee la capacidad de matar a las células cancerosas al causar daños en el material genético, cuyo mecanismo de acción se basa en el daño directo al ADN o indirecto a través de los radicales libres derivados de la ionización, causando alteraciones funcionales y/o estructurales (5).

La cirugía oncológica es el tratamiento más antiguo contra el cáncer, en el cual se resecciona el tumor y parte del tejido sano adyacente, aumentando notablemente la calidad de vida y la tasa de supervivencia de los pacientes (37). La inmunoterapia se define como el uso de materiales que aumentan o reestablecen la habilidad del sistema inmunológico para prevenir y combatir el cáncer; entre sus diferentes métodos se pueden encontrar vacunas, anticuerpos monoclonales e inhibidores de puntos de control, los cuales estimulan la función inmunitaria a través de diferentes mecanismos de acción (38).

El estadio de la enfermedad determina el tipo de tratamiento a utilizar, siendo frecuente su combinación, lo que da como resultado aumento de la eficacia, menor riesgo de provocar toxicidades graves, disminución de la progresión de la enfermedad y/o mayor supervivencia. Tal es el caso del uso de la inmunoterapia con medicamentos quimioterapéuticos, de radio y quimioterapia en conjunto, del empleo de diferentes medicamentos de quimioterapia, o de la

resección de tumores seguida de quimio, radio y/o inmunoterapia. Sin embargo, es importante determinar el estadio del cáncer, la dosis y secuencia adecuados en la combinación de los diferentes tratamientos (39,40). De manera general, se recomienda el uso de cirugía y radio terapia en estadio I; cirugía, radio y quimioterapia en estadio II, y quimioterapia en estadios III y IV; aunque el médico tratante puede determinar tratamientos y combinaciones diferentes de acuerdo a su experiencia y el estado general de salud del paciente (41).

A pesar de que la quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos más comunes contra el cáncer, estos son altamente tóxicos y dañan a las células sanas adyacentes, por lo que se producen diversos efectos secundarios que pueden reducir de manera significativa la calidad de vida de los pacientes, tales como náuseas, vómitos, diarrea, constipación, fatiga, anorexia, trastornos del sueño, alteración del gusto, cefalea, alopecia, anemia, disfagia, infertilidad, déficit cognitivo, mucositis, mielodepresión, fibrosis pulmonar, cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, toxicidad gastrointestinal, entre otros; por lo que en los últimos años se ha hecho énfasis en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer que sean más seguras y selectivas (42,43).

2.1.1.3. Uso de la medicina alternativa o complementaria contra el cáncer

Se refiere a productos médicos y prácticas que se usan exclusivamente o en conjunto con el tratamiento estándar, en el caso de los pacientes con cáncer, algunos de ellos eligen usar productos naturales como suplementos alimenticios, herbolaria y dietas especiales, y/o llevar a cabo prácticas como la meditación, Tai'Chi, yoga, masajes, reflexología, ayurveda, reiki, medicina tradicional china, homeopatía, acupuntura, entre otras, esto con el objetivo de disminuir los efectos secundarios de la terapia estándar, proporcionar un bienestar emocional e inclusive probar un posible tratamiento, sin embargo, su efectividad no ha sido probada de manera rigurosa. A su vez, es común que las personas que padecen de esta enfermedad utilicen plantas como remedio, con la idea de obtener una posible cura a dicho padecimiento (44,45).

2.1.2. Plantas medicinales

Durante miles de años, muchas plantas han sido ampliamente utilizadas como tratamiento para diversas patologías (6), cada parte morfológica contiene diversos metabolitos a los cuales se les ha atribuido diferentes beneficios a la salud, esto debido a que algunos autores han reportado que extractos de plantas presentan efecto antioxidante, anticáncer, antiinflamatorio, antimicrobiano, antiviral, antihipertensivo o antidiabético, entre otros (6,22,46,47), como se muestra en la Tabla 1.

Se piensa que los efectos biológicos que muestran las plantas son gracias a sus distintos tipos de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, que pueden funcionar como antioxidantes exógenos recogiendo radicales libres, inhibiendo enzimas oxidantes o elevando las defensas antioxidantes endógenas, lo que ayuda a prevenir el estrés oxidativo (48–50); los dos principales grupos de fenoles son: Los ácidos fenólicos y los flavonoides (51). A su vez se encuentran las antocianinas, que son glucósidos de antocianidinas, derivados de los flavonoides y producidos a través de la vía fenilpropanoide; éstas son las responsables de proveer de color rojo y azul a las plantas; entre las principales antocianinas se encuentran: Cianidinas, delfinidinas, pelargonidinas, peonidinas, petunidinas y malvidinas, que pueden presentar actividad antioxidante, cardioprotectora, neuroprotectora, antidiabética, antiobesidad, antiinflamatoria, quimiopreventiva y antimicrobiana (52,53). Asimismo las betalaínas, que son colorantes naturales hidrosolubles derivados del indol y están compuestas por una estructura central nitrogenada llamada ácido betalámico que al condensarse con compuestos derivados de aminoácidos forma una variedad de betacianinas (rojas a violetas) o betaxantinas (amarillas a anaranjadas); se ha reportado que estos compuestos tienen actividad antioxidante, antidiabética, cardioprotectora, antimicrobiana, antiviral y antitumoral (54,55).

De igual forma los taninos, que son compuestos polifenólicos de alto peso molecular y se subdividen en taninos condensados e hidrolizables, los condensados son oligómeros y polímeros de flavan-3-ol (procianidinas y prodelfinidinas), mientras que los hidrolizables contienen un núcleo central de glucosa u otro poliol esterificado con ácido gálico (galotaninos y elagitaninos); estos metabolitos ofrecen múltiples beneficios, puesto que poseen actividad

Tabla 1. Efectos benéficos de algunas plantas medicinales sobre la salud humana

Especie	Efecto							Referencia
	Anticáncer	**Antioxidante**	**Antimicro-biano**	**Antiviral**	**Antiinflama-torio**	**Antidia-bético**	**Antihiper-tensivo**	
Punica granatum	X	X	X			X		(56)
Psidium guajava	X	X	X		X			(57)
Citrus paradisi	X	X	X	X	X			(58)
Ananas comosus	X				X			(59)
Mangifera indica	X						X	(60)
Arthrospira maxima	X	X	X		X	X	X	(61)
Brassica oleracea	X	X	X		X	X		(62)

Tabla 1. Continuación

Matricaria recuitta	X	X	X	X	X			(63)
Theobroma cacao	X	X			X	X	X	(64)
Laurus nobilis	X	X	X		X			(65)
Clinacanthus nutans	X	X			X	X	X	(66)
Strobilanthes crispus	X	X				X	X	(67)
Pereskia bleo	X				X	X	X	(68)
Aloe vera	X				X			(69)
Zingiber officinale	X				X			(70)
Persea americana	X	X	X		X	X	X	(22)

X = Indica reportes previos sobre el efecto benéfico mencionado.

antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotectora, antidiabética, antimutagénica y anticarcinogénica (71,72). Igualmente las saponinas, las cuales son moléculas polares que consisten en una aglicona triterpenoide o esteroidal con una o más cadenas de azúcares; se ha reportado que éstas poseen actividad antiinflamatoria, antiproliferativa, citotóxica, proapoptótica, antidiabética, antibacteriana y antihelmíntica (73,74). Así como los carbohidratos, que son los principales sustratos de energía metabólica, influyen sobre la glucosa sanguínea, la insulina y el metabolismo lipídico, actúan como sustancias inmunomoduladoras y contribuyen al tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (75,76).

También se encuentran los alcaloides, que contienen nitrógeno y tienen estructuras cíclicas complejas; se sabe que poseen actividad anticarcinogénica, neuroprotectora, antiparasitaria y antiviral (77–79). Además los compuestos triterpénicos, entre los que se encuentran los esteroides y esteroles; se ha reportado que tienen efecto anticarcinogénico, antiinflamatorio y antimicrobiano (80–82). A su vez las antraquinonas, un tipo de quinonas con dos anillos fenólicos, las cuales se encuentran en animales, plantas y microorganismos; tienen actividad laxante, anticáncer, antinflamatoria, entre otras (83–85). De igual manera las chalconas, éstas son flavonoides con una cadena lineal que conecta a los anillos A y B, mientras que las auronas tienen un anillo heterocíclico que se relaciona con los anillos A y B; ambos tipos de compuestos son pigmentos amarillos de frutas y flores, y poseen efecto citotóxico, antiparasitario y antifúngico (83). Y las cumarinas, que son fenoles con anillos de benceno y pirona fusionados, éstas pueden encontrase en una gran variedad de plantas y poseen actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticáncer y anticoagulante (86).

2.1.3. Características de la especie Persea americana

Dentro del género *Persea* se encuentra la especie *Persea americana,* comúnmente conocida como aguacate, la cual es una fruta tropical nativa de México y América Central (27) que posee diversas variantes fenotípicas debido a las diferentes condiciones geográficas, climáticas, genéticas y evolucionarias (87). Existen cuatro variedades principales de dicha especie, que son *P. americana* var. *americana* (antillana), *P. americana* var. *guatemalensis* (guatemalteca), *P. americana* var. *costaricensis* (costarricense) y *P. americana* var.

drymifolia (criolla mexicana); sin embargo, la hibridación entre ellas ha dado como resultado más de 800 cultivares modernos como Fuerte, Bacon y Hass, éste último es un híbrido proveniente de las variedades *guatemalensis* y *drymifolia* (23,88,89).

Botánicamente, *P. americana* es una baya que contiene una única semilla grande (90), está constituida por el epicarpio (cáscara), el mesocarpio (pulpa) y el endocarpio (semilla); su tamaño, forma, color y contenido fitoquímico dependen del genotipo; la cáscara puede ser de color verde claro, verde oscuro, morada o negra con apariencia suave, rugosa, lustrosa u opaca; el peso del aguacate puede variar entre los 100 y los 3,000g (87). Debido a su gran popularidad y a que contiene diversos compuestos bioactivos, el aguacate ha sido utilizado enormemente en la industria de los alimentos, nutracéutica, farmacéutica y cosmética (22). Sin embargo, típicamente sólo se consume la pulpa de este fruto (91), por lo que grandes cantidades de cáscara y semilla son desechadas durante su procesamiento (92). En el caso del aguacate criollo, éste posee una cáscara muy delgada que es comestible, la cual ha sido consumida en México desde la época prehispánica (93). Por otra parte, se sabe que la semilla y la cáscara poseen altas concentraciones de compuestos bioactivos (92), los cuales pueden ser aprovechados en el área de investigación con la finalidad de encontrar aplicaciones en diversas áreas del conocimiento, como en la farmacología para la búsqueda de metabolitos útiles en el tratamiento del cáncer.

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial (27), durante el año 2020 la producción de aguacate de las variedades Hass, Fuerte y criollo a nivel nacional fue de 2,393,848.57 toneladas, siendo las entidades federativas con mayor producción Michoacán, Jalisco y Estado de México (1,800,021.42; 248,192.73 y 118,268.01 toneladas, respectivamente) (28). En el caso del aguacate Hass, su producción nacional en el mismo año fue de 2,337,254.32 toneladas, siendo sus mayores productores los estados de Michoacán, Jalisco, Estado de México y Nayarit; mientras que la producción de aguacate criollo en todo el país fue de 50,853.64 toneladas y cultivado principalmente en Yucatán, Nayarit, Puebla y Guerrero (28), donde hay un clima húmedo y cálido (94).

2.1.3.1. Compuestos bioactivos y propiedades medicinales del aguacate

Se sabe que *P. americana* otorga múltiples beneficios a la salud, diversos autores han reportado que el aceite obtenido por presando, una pasta reducida en calorías y extractos acuosos, etanólicos, hidroalcohólicos, metanólicos, clorofórmicos, hexánicos, acetónicos, en acetato de etilo y en isopropanol de las diferentes partes (pulpa, semilla, cáscara, hojas y corteza de raíz) de las variedades *americana*, *drymifolia*, Hass, Quintal, Margarida, Fortuna, Fuerte, Shepard, Bacon y Lorena contienen metabolitos como fenoles, flavonoides, taninos, antocianinas, terpenoides, cumarinas, fitoesteroles, alcoholes grasos, ácidos grasos, tocoferoles, carotenos, clorofilas y carbohidratos; gracias a los cuales se cree que el aguacate posee los siguientes efectos biológicos: Antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, citotóxico, antiproliferativo, proapoptótico, antiinflamatorio, antiplaquetario, antitrombótico, cicatrizante, neuroprotector, inmunomodulador, vasodilatador, hipolipemiante e hipoglicemiante (7–26).

A los metabolitos secundarios presentes en las plantas se les ha atribuido la actividad anticáncer a través de diversas vías de señalización celular, tales como los compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, antocianinas, saponinas, betalaínas, alcaloides, antraquinonas, chalconas, auronas, esteroides, terpenos, cumarinas, carbohidratos, entre otros, y que posiblemente dicho efecto se encuentre relacionado con la elevada actividad antioxidante que presentan algunos de estos compuestos (76,85,95–112).

En la Tabla 2 se presentan los compuestos que han sido identificados en la semilla y en la cáscara de aguacate Hass, mientras que en la Tabla 3 los metabolitos identificados en la cáscara de aguacate criollo. Cabe mencionar, que de la semilla de aguacate criollo sólo se ha realizado la identificación de ácidos grasos y sus derivados (acetogeninas alifáticas) (24,113).

Tabla 2. Compuestos identificados en la semilla y cáscara de aguacate Hass

	Fenoles
Semilla	Ácido cafeico, ácido dihidrocafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido sinápico, ácido málico, ácido clorogénico, ácido gentísico, ácido homogentísico, ácido quínico, ácido cítrico, ácido protocatecuico, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeoilquínico, ácido 1-cafeoilquínico, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido trans-5-O-cafeoil-D-quínico, ácido dicafeoilquínico, ácido cafeoilshikímico, ácido p-cumárico, ácido cumaroilquínico, ácido 3-p-cumaroilquínico, ácido 3-O-p-cumaroilquínico, ácido 4-p-cumaroilquínico, ácido p-hidroxicumaroilquínico, ácido feruloilquínico, ácido 3-feruloilquínico, ácido 3-O-feruloilquínico, ácido 4-feruloilquínico, ácido 4-O-feruloilquínico, ácido 5-O-feruloilquínico, ácido hidroxiferúlico, ácido β-D-glucósido, salidrosida, hidroxisalidrosida, hidroxitirosol, hidroxitirosol glucósido, hidroxitirosol glucósido arabinódiso, tirosol glucósido, tirosol glucósido arabinósido, ácido vanílico glucósido, ácido protocatecuico glucósido, ácido cafeico glucósido, ácido dihidrocafeico glucósido, ácido ferúlico glucósido, ácido dihidroferúlico glucósido, quercitina, quercitina glucósido, quercitina diglucósido, quercitina 3-O-glucósido, quercitina 3-β-glucósido, quercitina acetilglucósido, quercitina rutinósido, quercitina 3-O-rutinósido, quercitina arabinósido, quercitina arabinósido glucósido, quercitina glucorónido, isoramnetina arabinósido, isoramnetina glucósido, apigenina, kaempferol, kaempferol arabinósido, kaempferol arabinósido glucósido, kaempferol glucósido, naringenina, naringenina glucósido, luteolina, sakuranetina, vanilina (7,11,87,91,114–122).
Cáscara	Ácido vanílico, ácido quínico, ácido clorogénico, ácido siríngico, ácido sinápico, ácido cafeico, ácido dihidrocafeico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido abscísico, ácido gentísico, ácido protocatecuico, ácido fumárico, ácido benzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido 3-O-feruloilquínico, ácido 4-O-feruloilquínico,ácido 5- O-feruloilquínico,

Tabla 2. Continuación

	ácido p-cumárico, ácido cumaroilquínico, ácido cafeoilshikímico, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido dicafeoilquínico, quercitina, quercitina glucósido, quercitina-3-glucósido, quercitina 3-O-glucósido, quercitina diglucósido, quercitina-3,4'-diglucósido, quercitina glucósido ramnósido, quercitina acetilglucósido, quercitina rutinósido, quercitina 3-O-rutinósido, quercitina arabinósido, quercitina 3-O-arabinósido, quercitina arabinósido glucósido, quercitina-O-arabinosil-glucósido, quercitina-3-O-arabinosil-glucósido, quercitina 3-O-galactósido, quercitina glucorónido, quercitina ramnósido, quercitina 3-O-ramnósido, quercetina derivativa (II), salidrosida, hidroxisalidrosida, hidroxitirosol, hidroxitirosol glúcosido, hidroxitirosol glúcosido arabinósido, tirosol glucósido, tirosol glucósido arabinósido, ácido protocatecuico glucósido, ácido cumárico glucósido, ácido cafeico glucósido, ácido cafeico glucósido derivativo, ácido dihidrocafeico glucósido, ácido ferúlico glucósido, ácido dihidroferúlico glucósido, rutina, apigenina, kaempferol, kaempferol arabinósido, kaempferol arabinósido glucósido, kaempferol glucósido, kaempferol rutinósido, kaempferol O-glucosilramnósido, naringenina, naringenina glucósido, vanilina, isoramnetina, isoramnetina derivativa, isoramnetina arabinósido, isoramnetina arabinósido glucósido, isoramnetina glucósido, sakuranetina, luteolina arabinósido glucósido (11,87,114,115,117–119,122–125).
	Antocianinas
Semilla	Cianidina 3-glucósido (91).
Cáscara	Cianidina-glucósido, cianidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-galactósido (124–128).

Tabla 2. Continuación

	Taninos
Semilla	Catequina, (+) catequina, catequina glucósido, catequina derivativa, epicatequina, (-) epicatequina, epicatequina glucósido, epicatequina derivativa, epicatequina galate, epigalocatequina, procianidina (B1, B2), dímeros de procianidina (A, A2, A3, A4, A5, B, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11), trímeros de procianidina (A, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, B, B1, B2, B3), tetrámeros de procianidina (A1, A2, A3, A4, A5, B1), pentámeros de procianidina (A, B1), hexámeros de procianidina (7,11,87,91,114–118,120–122).
Cáscara	Catequina, (+)-catequina, catequina glucósido, catequina derivativa, epicatequina, (-)-epicatequina, epicatequina glucósido, epicatequina derivativa, epigalocatequina, procianidina B2, dímeros de procianidina (A, A1, A2, A3, A4, A5, B, B1, B2, B3, B4, B5, B6), trímeros de procianidina (A, A1, A2, B, B1, B2), tetrámeros de procianidina (B), pentámeros de procianidina, hexámeros de procianidina (7,11,87,115,117,118,122–125).
	Hidratos de carbono
Semilla	Perseitol, celulosa, hemicelulosa, lignina, manoheptulosa (115,116,119,121,129).
Cáscara	Perseitol, volemitol, arabinosa, fucosa, fructosa, galactosa, glucosa, sucrosa, manosa, manoheptulosa, ramnosa, xilosa (119,123–125,129,130).
	Esteroides y triterpenos
Semilla	Ergosterol, 5α-colestano, campesterol, estigmasterol, β-sitosterol, penstemida (122,131,132).

Tabla 2. Continuación

Cáscara	Estigmasterol, β-sitosterol, campesterol, cicloartenol, penstemida (122,124,125).

Tabla 3. Compuestos identificados en la cáscara de aguacate criollo

Fenoles
Naringenina, ácido clorogénico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido quínico, ácido málico, ácido vanílico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido sinápico, ácido p-cumárico, quercitina, quercitina-β-glucorónido, quercitina-D-galactósido, quercitina-D-glucósido (26,124).
Antocianinas
Cianidina-glucósido, cianidina 3-glucósido, pelargonidina-glucósido, pelargonidina 3-glucósido, hidroxidelfinidina 3-glucósido (26,124).
Taninos
Catequina, epicatequina, procianidina (B1, B2) (26,124).
Hidratos de carbono
Perseitol, volemitol, fructosa, glucosa, sucrosa, manoheptulosa (124).
Esteroides y triterpenos
Estigmasterol, β-sitosterol, campesterol, cicloartenol (124).

2.2. Antecedentes del Problema

2.2.1. Cáncer de mama

Este tipo de cáncer es considerado el más común y es la primera causa de mortalidad en mujeres de todo el mundo (2). Se estima que en el 2020 el número de casos prevalentes de cáncer de mama a nivel mundial fue de 7,790,717 y en México de 99,288 (30); mientras que en Hidalgo en el periodo que comprende del año 2000 al 2015 la cifra de muertes por cáncer de mama fue de 1,338 (133).

Existen mutaciones heredadas en algunos genes que elevan el riesgo de padecer cáncer de mama, tal como en el caso de los genes BRCA1 y BRCA2 (36), cuyos productos se encargan de la reparación del daño en el ADN (2); por otra parte, algunos genes supresores de tumores mutados se encuentran envueltos en el desarrollo del cáncer de mama, como P53 y PTEN; la proteína p53 es un factor de transcripción que regula el ciclo celular y la reparación del ADN, esto se lleva a cabo arrestando el ciclo y permitiendo reparar el ADN o inducir apoptosis; si el gen P53 se encuentra mutado, las células con daño en el ADN continúan replicándose; mientras que el gen PTEN se encuentra envuelto en la proliferación celular, el ciclo celular y la apoptosis de las células cancerosas (36).

Las cascadas de señalización de Ras/Raf/MEK/ERK y de PI3k/PTEN/Akt juegan roles importantes en la transmisión de señales de los receptores de factores de crecimiento, regulando la expresión génica y previniendo la apoptosis en células normales (36), cuando hay mutaciones en los genes de estas vías protectoras, se inhibe la apoptosis en las células cuando ya no son requeridas, lo que deriva en el desarrollo del cáncer (2). El receptor de tirosina cinasa llamado HER-2 o ERBB se encuentra sobreexpresado en el cáncer de mama, éste se une a factores de crecimiento, lo cual activa a las vías Ras/Raf/MEK/ERK y PI3k/PTEN/Akt, resultando en la disminución de la expresión de P53. La vía PI3k/PTEN/Akt también juega un papel importante en la regulación de proteínas que controlan la proliferación celular. Las vías Ras/Raf/MEK/ERK y PI3k/PTEN/Akt interactúan entre sí para regular el crecimiento y la tumorogénesis, tal como se muestra en la Figura 1 (36). Las mutaciones de ambas vías se encuentran asociadas con la exposición a los estrógenos (2).

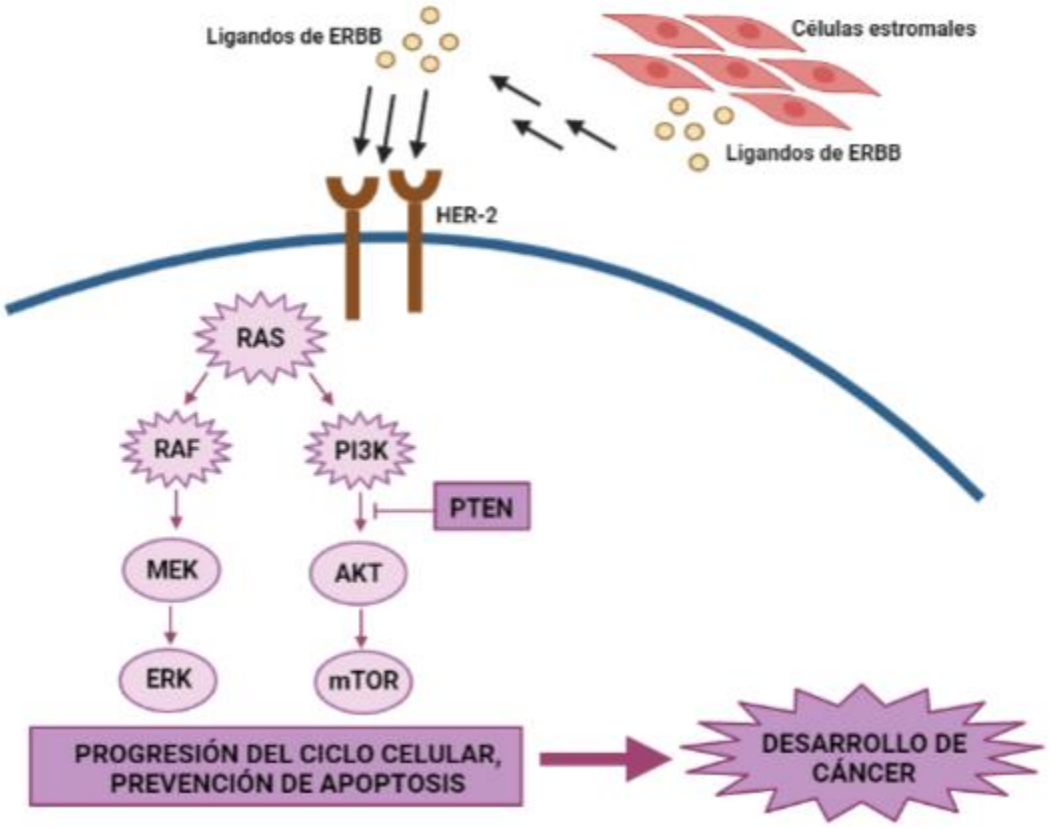

Figura 1. Alteraciones moleculares que conducen al desarrollo del cáncer de mama. Los receptores ERBB, también llamados HER-2, se activan al unirse a los ligandos ERBB que son liberados por las células estromales y/o producidas por la activación del receptor de estrógeno. RAS, RAF, PI3K y PTEN son los sitios de alteraciones genéticas que resultan en la activación de las cascadas RAF/MEK/ERK y PI3k/AKT (36).

2.2.2. Cáncer de cérvix

El cáncer de cérvix es el segundo tipo de cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo, sobre todo en los países de bajo desarrollo (134); durante el 2020 las cifras de casos prevalentes de cáncer de cérvix a nivel mundial y en México fueron de 1,495,211 y 25,026, respectivamente (30). En el estado de Hidalgo se reportaron 1,202 defunciones a causa de esta enfermedad del año 2000 al 2015 (133).

Se ha demostrado que el cáncer de cérvix puede tener una causa viral, sin embargo, la infección de un virus no es suficiente, pero es el primer paso que conlleva al desarrollo del cáncer; los papilomavirus son un grupo heterogéneo de virus y hasta el momento han sido identificados más de 200 genotipos en los humanos; el cáncer de cérvix es considerado como una enfermedad de transmisión sexual ya que se encuentra relacionado al virus del papiloma humano (VPH); la conexión entre la infección de VPH con el desarrollo del cáncer de cérvix se basa en la observación de que la mayoría de los cánceres de cérvix contienen ADN de VPH (3,134,135). Los VPH se pueden agrupar en VPH de alto riesgo u oncogénicos (16, 18, 26, 31, 33-35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 73, 82), los cuales están asociados al desarrollo del cáncer y en VPH de bajo riesgo o no oncogénicos (6, 11, 40, 42-44, 54, 61, 70, 72, 81, 89), asociados a tumores benignos; de los 19 tipos de VPH de alto riesgo, 5 han sido asociados con el cáncer de cérvix (136).

En este tipo de cáncer es frecuente la mutación del gen supresor de tumores P53 disminuyendo su expresión y generalmente combinada con la infección de VPH; el producto del gen P16 previene la progresión del ciclo celular al interferir con la activación de la cinasa dependiente de ciclina (CDK), su mutación y baja expresión también se ha observado en el cáncer de cérvix. Por otro lado, el VPH sintetiza proteínas que intervienen en la replicación de su material genético y que a su vez pueden interactuar con diferentes proteínas de la célula huésped causando el desarrollo del cáncer, tal como: La proteína E6 que se une a p53 promoviendo su degradación; E7 que se une a la forma activa de RB, promoviendo el progreso de la fase S del ciclo celular y la consecuente replicación celular; o E5 que regula la actividad de receptores de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Las mutaciones en los genes RAS juegan un papel importante en los estadios iniciales del cáncer de cérvix, la sobre expresión del gen RAS P21 y la mutación del gen H-RAS han sido encontradas en el cáncer de cérvix (134,137).

2.2.3. Efecto de la semilla y la cáscara de diferentes variedades de P. americana sobre el cáncer

Se han llevado a cabo algunos estudios que evalúan el efecto anticarcinogénico de extractos de cáscara y semilla de aguacate sobre diferentes tipos de cáncer; tal es el caso de Dabas et

al (138), quienes evaluaron un extracto de semilla de aguacate Hass en metanol sobre líneas celulares de cáncer de pulmón (HI299), de colon (HT29), de próstata (LNCaP) y de mama (MCF-7), y demostraron una inhibición celular dependiente de la dosis en todas las líneas celulares; Vo et al (139), mostraron que el extracto en etanol de la semilla de *P. americana* Mill. inhibe el crecimiento celular en células de cáncer de pulmón (A549) y de estómago (BGC823); Abubakar et al (81), reportaron que el extracto en etanol, una fracción y un triterpenoide de semilla de *Persea americana* posee actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de hígado (HepG2) y MCF-7; Widiyastuti et al (140) trabajaron con un extracto en cloroformo de semilla de *P. americana* Mill sobre la línea celular MCF-7, el cual demostró poseer actividad citotóxica y apoptótica, arrestando el ciclo celular en la fase G1/G0; un estudio realizado por Alkhalf et al (131) evaluaron un extracto lipídico en cloroformo/metanol de la semilla de *Persea americana* sobre la línea celular de cáncer de colon (HCT116) y HepG2, este extracto presentó un efecto citotóxico dependiente de la dosis en ambas líneas celulares, muy similar al control positivo sorafinib; Lara-Márquez et al (113) analizaron el extracto lipídico en hexano de semilla de *P. americana* var. *drymifolia* rico en acetogeninas sobre células de cáncer de colon (Caco-2), el cual demostró poseer actividad citotóxica selectiva y actividad apoptótica vía caspasa 8 y 9; Rodríguez-Martínez et al (141), estudiaron un extracto hidroalcohólico de cáscara de aguacate Hass, hallando que disminuye la viabilidad en líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa), Caco-2 y A549.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las enfermedades de mayor prevalencia en la población, representando un grave problema de salud pública (1), siendo el de mama y de cérvix los dos más comunes entre las mujeres a nivel mundial (2,3). Se ha reportado que diferentes variedades de aguacate, entre ellas Hass y criollo pueden presentar múltiples beneficios farmacológicos y a la nutrición humana, se cree que estas actividades son gracias a su elevado contenido de compuestos bioactivos; así como que el efecto anticáncer podría estar relacionado con la actividad antioxidante que presentan algunos compuestos (7–26,112). A la fecha, algunos estudios han probado que compuestos aislados y extractos acuosos, hidroalcohólicos, etanólicos, metanólicos, clorofórmicos y hexánicos de semilla y cáscara de diferentes variedades de aguacate, tales como Hass y criollo, son potenciales coadyuvantes en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, entre ellos el de mama y cérvix (81,113,131,138–141).

De acuerdo a lo anterior expuesto, este estudio se planteó como objetivo evaluar el efecto citotóxico de los extractos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo en metanol y acetato de etilo sobre líneas celulares de cáncer de mama y de cérvix ya que son los que principalmente afectan a las mujeres en México.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cáncer de mama y cérvix son los que mayoritariamente afectan a las mujeres, es de gran importancia estudiar acerca de nuevas alternativas en su tratamiento. Durante miles de años las plantas han sido ampliamente usadas para el tratamiento de diversas patologías, siendo el aguacate una de las frutas empleadas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades, lo cual ha conducido a que en los últimos años investigadores alrededor del mundo se interesaran en estudiar este fruto. Sin embargo, pocas investigaciones se han enfocado en evaluar el efecto anticarcinogénico de la cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo en los tipos de cáncer de mama y de cérvix. Es por ello que se resalta la relevancia del presente estudio, en el que se propone evaluar el efecto citotóxico de extractos orgánicos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo sobre líneas celulares de cáncer de mama y de cérvix. Esto ayudará a aportar conocimiento sobre el uso del aguacate como tratamiento complementario en los pacientes que padecen cáncer de mama o cérvix.

V. HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos de semilla y cáscara de aguacate Hass y criollo mostrarán actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cérvix (SiHa).

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico de los extractos de semilla y cáscara de aguacate Hass y criollo sobre las líneas celulares malignas SiHa y MDA-MB-231.

6.2. Objetivos específicos

1) Preparar los extractos de semilla y cáscara de aguacate Hass y criollo por maceración empleando metanol y acetato de etilo.
2) Calcular la actividad antioxidante de los extractos de semilla y cáscara por los métodos $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$.
3) Cuantificar el contenido de fenoles totales, antocianinas, betalaínas, taninos, saponinas e hidratos de carbono en los ocho extractos de aguacate.
4) Determinar cualitativamente el contenido de alcaloides, antraquinonas, chalconas y auronas, esteroides y triterpenos, y cumarinas en los ocho extractos de aguacate.
5) Analizar la actividad citotóxica de los extractos sobre eritrocitos humanos sanos por el método de hemólisis.
6) Evaluar la actividad citotóxica de los extractos sobre las líneas celulares malignas SiHa y MDA-MB-231 por el método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio (MTT).
7) Identificar el extracto y la línea celular sobre la cual se tiene mayor efecto citotóxico.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Contexto de la investigación

Los estudios fitoquímicos de este estudio se llevaron a cabo en el Laboratorio 5 de Química Orgánica del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Los estudios biológicos se realizaron en el Laboratorio de Toxicología del Área Académica de Medicina de la UAEH. Durante el periodo que comprende del mes de julio de 2019 al mes de julio del 2021.

7.2. Diseño y tipo de estudio

Estudio experimental longitudinal *in vitro*.

7.3. Estudios fitoquímicos

7.3.1. Material vegetal

El aguacate Hass fue adquirido en la Central de Abastos de la ciudad de Pachuca, Hidalgo, México en el mes de enero de 2020. El aguacate criollo fue adquirido en la Central de Abastos de la Ciudad de México, México durante el mes de septiembre de 2020. Ambas variedades de aguacate fueron provenientes del Estado de Michoacán, México.

7.3.2. Obtención de los extractos

Por maceración se prepararon ocho extractos a partir de la semilla y la cáscara de aguacate Hass y criollo en metanol y acetato de etilo. A los dos tipos de aguacate se les retiró la pulpa, luego las cáscaras y las semillas fueron lavadas y secadas en un horno a 50 ºC, con circulación de aire, a continuación, las muestras se molieron en un molino manual convencional hasta obtener partículas de 1-2 mm, aproximadamente. Cada muestra fue macerada en metanol y acetato de etilo, cada uno por separado, y a temperatura ambiente durante siete días en agitación una vez al día. Transcurridos los siete días, todos los líquidos resultantes fueron filtrados y evaporados en un rotavapor semi-automatizado R-114 (Büchi) equipado con un baño de agua B-480 (Büchi) a 65°C para eliminar los disolventes y se determinó el rendimiento; obteniendo los siguientes extractos: Cáscara de aguacate Hass en metanol (CHM), cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo (CHA), semilla de aguacate Hass en metanol (SHM), semilla de aguacate Hass en acetato de etilo (SHA), cáscara de aguacate

criollo en metanol (CCM), cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo (CCA), semilla de aguacate criollo en metanol (SCM) y semilla de aguacate criollo en acetato de etilo (SCA).

7.3.3. Determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos

7.3.3.1. Fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado por el método Folin-Ciocalteau, cuyo principio es la reducción del reactivo Folin-Ciocalteau por parte del grupo de compuestos fenólicos (50). Se preparó una curva de calibración utilizando ácido gálico (Sigma-Aldrich) como estándar en agua desionizada a diferentes concentraciones (0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 µg/mL). Los extractos se prepararon disolviendo 200 mg en 2 mL de etanol. Para la cuantificación, se mezclaron 100 µL de cada concentración de la curva o de los extractos con 500 µL de una solución de Folin-Ciocalteau (1:10, Sigma-Aldrich) y 400 µL de una solución de carbonato de sodio al 7.5 % (Sigma-Aldrich). Se dejaron reposar por 30 min en oscuridad y se realizaron las lecturas de la absorbancia a 765 nm. Los resultados fueron expresados como miligramos de equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g).

7.3.3.2. Antocianinas

La cuantificación de antocianinas de los extractos se llevó a cabo por el método de pH diferencial, éste es un método espectrofotométrico que se basa en transformación de las estructuras de las antocianinas por el cambio en el pH (pH 1.0 coloreadas y pH 4.5 incoloras) (142). Los extractos fueron preparados en metanol a 16.66 mg/mL y alícuotas de cada uno de los extractos se mezclaron con las soluciones amortiguadoras de cloruro de potasio (Sigma-Aldrich) 0.025 M a pH 1.0 y de acetato de sodio (Sigma-Aldrich) 0.4 M a pH 4.5, a continuación, se realizaron lecturas de absorbancia a 510 y 700 nm en un lector de microplacas Epoch (BioTek); la diferencia entre las absorbancias fue proporcional al contenido de antocianinas. Los resultados se expresaron como miligramos de cianidina-3-glucósido por 100 gramos de muestra (mg cianidina-3-glucósido/100 g).

7.3.3.3. Betalaínas

Para la cuantificación de betalaínas de los extractos se realizó mediante un método espectrofotométrico, para lo cual los extractos se prepararon a 200 mg/mL en metanol al 80 %, se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 2,200 rpm (VanGuard V6500), el sobrenadante se separó y se filtró para medir la absorbancia en el espectrofotómetro (Jenway, 6405) a 538 nm para las betacianinas y 472 nm para las betaxantinas, mediante el uso de coeficientes de extinción de 60,000 y 48,000 L mol-1 cm-1, respectivamente. Ambos resultados se sumaron para obtener el contenido total de betalaínas. Los resultados se expresaron como microgramos de betalaínas por 100 gramos de muestra (μg BE/100 g).

7.3.3.4. Taninos

La cuantificación de taninos condensados se llevó a cabo por el método espectrofotométrico descrito por Valadez-Vega et al (143). Los taninos fueron extraídos de los extractos de semilla y cáscara de aguacate, se pesaron 9 mg de cada extracto y se adicionaron 2.25 mL de metanol, se agitaron en vórtex y luego en placa de agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Se preparó una curva de calibración con catequina (Sigma-Aldrich) como estándar en el rango de 40 – 400 μg/mL. De cada extracto se tomaron 250 μL de los sobrenadantes de las extracciones, se les añadió 1.25 mL de vainillina al 0.5 % en metanol acidificado al 8 % y se dejaron reaccionar por 45 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 500 nm en el lector de microplacas Epoch (BioTek) y los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de catequina por 100 gramos de muestra (mg EC/100 g).

7.3.3.5. Saponinas

Para la cuantificación de saponinas totales se empleó la técnica descrita por Girón (144), la cual se fundamenta en la aglutinación de los eritrocitos presentes en la sangre. Se emplearon 4 mL de sangre humana fresca tipo B+ de donador sano, quien firmó un consentimiento informado (Anexo 12.2), se depositó en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 2 % como anticoagulante, se mezcló con cuidado para no lisar los eritrocitos y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Una vez separados los eritrocitos, fueron lavados y diluidos al 4 % con una solución salina isotónica al 0.9 %, y se reservaron para su uso

posterior. Las saponinas presentes en los extractos de semilla y cáscara de aguacate se extrajeron de 10 mg de cada extracto y se añadieron 500 µL de etanol, se llevaron a un agitador orbital por 30 min. Se empleó una microplaca de 96 pozos de fondo cónico, se colocaron 50 µL de PBS en cada pozo, al primer pozo se le agregaron 50 µL de las saponinas extraídas previamente y se realizaron diluciones seriadas en orden de dos en los siguientes pozos, posteriormente se adicionaron 50 µL de los eritrocitos anteriormente preparados y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Se registró la máxima dilución que presentó la aglutinación y los resultados se reportaron como unidades hemolíticas por miligramo de muestra (UH/mg).

7.3.3.6. Hidratos de carbono

Para la cuantificación de hidratos de carbono se utilizó el método de fenol-sulfúrico de Dubois, en el cual los hidratos de carbono presentes son convertidos a furfural y compuestos homólogos por acción del ácido y con fenol producen un complejo colorido cuantificable a 490 nm (145). Se tomaron 100 µL de los extractos y se añadieron 100 µL de una solución de fenol al 5 % y 500 µL de ácido sulfúrico concentrado, la reacción se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agitaron y se dejaron reposar por 30 min más. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia en un lector de microplacas Epoch (BioTek) a una longitud de onda de 490 nm. La concentración de hidratos de carbono se estimó interpolando la absorbancia obtenida con una curva de calibración obtenida con estándares de glucosa. Los resultados fueron reportados en microgramos por gramo de muestra (µg/g).

7.3.4. Determinación cualitativa de compuestos

7.3.4.1. Alcaloides

7.3.4.1.1. Método de Mayer

Se preparó el reactivo de Mayer mezclando 1.3 g de cloruro mercúrico con 5 g de yoduro de potasio y aforando a 100 mL con agua destilada. A continuación, se tomaron 2 mg de cada extracto y se les añadió 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % más 2 gotas del reactivo de Mayer. Se consideró como resultado positivo (+) a la formación de un precipitado blanco.

7.3.4.1.2. Método de Dragendorff

Se elaboró el reactivo de Dragendorff disolviendo 8 g de subnitrato de bismuto en 20 mL de ácido nítrico densidad 1.8, esta solución se mezcló con otra que contenía 22.7 g de yoduro de potasio disuelto en 20 mL de agua destilada; se dejó en reposo, se separó el ácido nítrico por decantación y se aforó a 100 mL con agua destilada. Posteriormente, se tomaron muestras de 2 mg de cada extracto, a las cuales se les añadieron 2 mL de ácido clorhídrico al 1 % y 2 gotas del reactivo de Dragendorff. La formación de un precipitado pardo anaranjado se reportó como resultado positivo (+).

7.3.4.2. Antraquinonas

Se tomaron muestras de 2 mg de cada uno de los extractos, se les añadieron 3 mL de ácido clorhídrico al 10 % y se llevaron a calentar durante 30 min; a continuación, se dejaron enfriar y se realizaron extracciones con éter, las fracciones etéreas se mezclaron con 2 mL de hidróxido de sodio al 10 % y se agitaron. La presencia de una coloración roja, debida a antraquinonas, en la interfase se reportó como resultado positivo (+).

7.3.4.3. Chalconas y auronas

Se tomaron muestras de 2 mg de los extractos, a cada una se les añadieron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y se agitaron. La coloración roja se consideró como resultado positivo (+) de la presencia de los compuestos.

7.3.4.4. Esteroides y triterpenos

Se pesaron 2 mg de cada uno de los extractos y se les añadió 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo; a continuación, se enfriaron a 0 °C en un baño con hielos, se les añade a través de las paredes 1 gota de ácido sulfúrico también enfriado a 0 °C y se vuelve a enfriar. La coloración rojo naranja evidenció un resultado positivo (+).

7.3.4.5. Cumarinas

Se mezclan los extractos con 5 mL de agua destilada y se cubren con papel filtro humedecido con hidróxido de sodio al 10 %, posteriormente se llevan a baño maría con agua hirviendo durante 5min; se dejan enfriar y los papeles filtro se observan con luz ultravioleta. La

presencia de cumarinas forma una coloración fluorescente verde, amarilla o roja, reportándose como positivo (+).

7.3.5. Actividad antioxidante de los extractos

7.3.5.1. Método ABTS·⁺

Se midió la actividad antioxidante de los extractos por el método ABTS·⁺, este método se basa en la reducción del catión radical ABTS·⁺ por parte de los compuestos antioxidantes, el cual es un cromóforo azul/verde formado a partir de la reacción del ABTS·⁺ con el persulfato de potasio (146). Se usaron ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS·⁺, Sigma-Aldrich) y ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroo-2-carboxílico (Trolox, Sigma-Aldrich) como estándares. El ABTS·⁺ se preparó a una concentración de 3.6 mg/mL con 6 mg de persulfato de potasio (Sigma-Aldrich) en agua desionizada, se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente y en oscuridad. El ABTS·⁺ se diluyó en etanol hasta llevarlo a una absorbancia de 0.70 $\pm$ 0.02 con una longitud de onda de 734 nm en el lector de microplacas Epoch (BioTek). A su vez, se preparó una curva de calibración de Trolox en el rango de concentración de 0 – 140 µg/mL en etanol (J.T. Baker). Los extractos se prepararon a 15 mg/mL de etanol. Para la cuantificación, se tomaron alícuotas de 100 µL de cada extracto se le añadieron 900 µL de la solución de ABTS·⁺, se dejó reposar en oscuridad por 5 min y se realizó la lectura en el lector de microplacas a 734 nm. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra (mg ET/g).

7.3.5.2. Método DPPH·

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos por el método DPPH·, el cual se basa en la reducción del radical 2,2 difenil-1-picrihidracilo (DPPH·) color violeta por parte de los compuestos antioxidantes a través del mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno, lo que causa un cambio al color amarillo (147). Se preparó una solución de DPPH· (Sigma-Aldrich) al 7.5% en etanol y una curva de calibración de trolox en un rango de concentración de 0 – 140 µg/mL en etanol. Los extractos se prepararon a la concentración de 15 mg/mL en etanol. A continuación, alícuotas de 100 µL de cada extracto se le agregaron 900 µL de la solución de DPPH·, se dejaron reposar 60 min en oscuridad y se realizó la lectura de absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas Epoch (BioTek). Se tomaron como válidas

las curvas del calibrador de trolox con una $R^2 \geq 0.995$. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra (mg ET/g).

7.4. Estudios biológicos

7.4.1. Actividad hemolítica

Una forma de conocer la citotoxicidad de un compuesto sobre células sanas es evaluar su actividad hemolítica a través del método de hemólisis, el cual se basa en la detección por espectrofotometría de la hemoglobina que se libera de los eritrocitos, derivada del rompimiento de las membranas por acción de compuestos tóxicos (148). Se emplearon 4 mL de sangre humana fresca tipo B+ de donador sano, el cual firmó un consentimiento informado (Anexo 12.2), se depositó en un tubo EDTA al 2 % como anticoagulante, se mezcló cuidadosamente para no lisar los eritrocitos, y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Una vez separados los eritrocitos, fueron lavados y diluidos al 4 % con un buffer de fosfatos pH 7.4 y se reservaron para su uso. En un tubo Eppendorf se colocaron 20 µL de eritrocitos, los cuales fueron tratados con 1 mL de los extractos en concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL, se incubaron durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, los eritrocitos se centrifugaron a 500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a una microplaca de 96 pozos y se midió la absorbancia en un lector de microplacas Epoch (BioTek) a 540 nm. Se empleó como control positivo eritrocitos tratados con Triton-X 100 al 20 %. Los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis (% hemólisis).

7.4.2. Líneas celulares

Las líneas celulares MDA-MB-231 de cáncer de mama (ATCC, HTB-26) y SiHa de cáncer de cérvix (ATCC, HTB-35) fueron donadas por el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México. La línea MDA-MB-231 es un adenocarcinoma que proviene del tejido epitelial de glándula mamaria de una mujer caucásica de 51 años de edad (149) y la línea SiHa es un carcinoma de células escamosas grado ll proveniente del tejido epitelial de cérvix de una mujer asiática de 55 años y contiene virus del papiloma humano (150).

7.4.3. Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en un medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) adicionado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Gibco), estreptomicina (Sigma-Aldrich) y penicilina (Sigma-Aldrich) al 0.1 % en una incubadora con 4 % de CO_2 (Sanyo) a 37 °C en una atmósfera humidificada.

7.4.4. Actividad citotóxica

La actividad citotóxica se determinó a través del método colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio (MTT), éste se basa en la habilidad de las mitocondrias funcionales para catalizar la reducción del MTT a formazán insoluble, la concentración de colorante se mide por espectrofotometría (151). Para cada línea celular se realizaron experimentos, en microplacas de 96 pozos fondo plano se sembraron 10,000 células/pozo para el ensayo a 24 h y 5,000 células/pozo en los ensayos a 48 y 72 h, una vez adheridas al fondo del pozo, se aplicaron los extractos en el rango de concentraciones que se muestran en la Tabla 4, las cuales se establecieron a partir de experimentos preliminares para determinar las condiciones experimentales, y se incubaron por 24, 48 y 72 h. Se añadieron en cada pozo 110 µL de MTT al 5 mg/mL (Sigma-Aldrich) y se llevó a la incubadora por 3h. Posteriormente, se removió el medio y el producto intracelular formazán se disolvió con 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas Epoch (BioTek) y se calculó el porcentaje de viabilidad celular (% viabilidad celular), donde la absorbancia de la muestra control se consideró como 100 % de viabilidad celular, y a partir de este resultado se calculó la viabilidad de cada muestra en estudio.

7.5. Análisis estadístico

El manejo de datos se realizó a través de Microsoft Excel y GraphPad Prism 8. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software Statgraphics Centurion XVI.I, en el cual se llevaron a cabo pruebas t de student y ANOVAs de una vía seguidos de pruebas post hoc de Tukey, las diferencias se consideraron significativas a una $p<0.05$.

Tabla 4. Concentraciones empleadas en los ensayos de citotoxicidad

Extracto	SiHa (µg/mL)	MDA-MB-231 (µg/mL)
CHM	100, 250, 300, 500	50, 100, 250, 500
CHA	250, 375, 500, 750	75, 250, 500, 750
SHM	10, 50, 100, 250	10, 50, 100, 250
SHA	50, 75, 100, 250	10, 50, 100, 250
CCM	10, 50, 75, 100	10, 50, 100, 250
CCA	10, 50, 100, 250	50, 100, 250, 500
SCM	50, 100, 250, 500	50, 100, 250, 500
SCA	50, 75, 100, 250	50, 100, 250, 500

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol, CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo, SHM = semilla de aguacate Hass en metanol, SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo, CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol, CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo, SCM = semilla de aguacate criollo en metanol y SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo.

7.6. Aspectos éticos

Este estudio fue revisado, aprobado y supervisado por el Comité de Ética del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con número de oficio 9/2021 (Anexo 12.1). Las personas donantes de las muestras de sangre firmaron un consentimiento informado (Anexo 12.2).

VIII. RESULTADOS

8.1. Estudios fitoquímicos

8.1.1. Preparación de los extractos

De aguacate Hass se obtuvieron 540 g de semilla y 464 g de cáscara, y de las muestras de aguacate criollo se obtuvieron 2.846 kg de semilla y 360 g de cáscara. De la harina obtenida se prepararon 8 extractos, 4 con metanol y 4 con acetato de etilo. En la Tabla 5 se muestran los resultados de rendimiento obtenidos de cada extracto, en donde se puede observar que el extracto CHM presentó el valor más alto, mientras que SHA fue el que presentó el menor rendimiento.

Tabla 5. Rendimiento en la obtención de los extractos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo

	Cáscara		**Semilla**	
	Metanol	**Acetato de etilo**	**Metanol**	**Acetato de etilo**
Aguacate Hass (%)	3.0	2.4	5.8	1.4
Aguacate criollo (%)	6.8	4.0	0.8	1.3

8.1.2. Determinación cuantitativa de metabolitos de los extractos

8.1.2.1. Fenoles totales

Se llevó a cabo la cuantificación de fenoles totales de cada extracto, cuyos resultados se muestran en la Tabla 6, destacándose el extracto SHM, ya que presentó la mayor cantidad de dichos compuestos bioactivos, mientras que el extracto con menor cantidad fue SCA, siendo aproximadamente 13 veces menor que SHM; así como también que ambos extractos de semilla en metanol eran los que poseían más cantidad de compuestos fenólicos (SHM y SCM). No se observaron diferencias significativas entre ambos extractos de cáscara de aguacate Hass y criollo en acetato de etilo (CHA y CCA), mientras que en el resto de los extractos sí hubo diferencias significativas ($p<0.05$).

8.1.2.2. Antocianinas

En cuanto a la cuantificación de antocianinas, no se observó la presencia de estos metabolitos en ninguno de los extractos de aguacate Hass y criollo.

8.1.2.3. Betalaínas

La cantidad de betalaínas presentes en los extractos de semilla y cáscara de aguacate se presentan en la Tabla 6, observándose que CHM presentó el mayor contenido de betalaínas, mientras que el resto de los extractos tenían concentraciones bajas, estando por debajo de un microgramo por mililitro; presentándose diferencias estadísticamente significativas entre todos los extractos ($p<0.05$).

8.1.2.4. Taninos

Los resultados del contenido de taninos de los extractos se muestran en la Tabla 6; siendo el extracto SHM el que exhibió la mayor concentración de dichos compuestos bioactivos, mientras que SCA fue el de menor concentración, siendo SHM aproximadamente 87 % mayor que SCA. Se puede observar que, en general, los extractos con más taninos fueron los preparados con metanol, exceptuando a CHA, que fue el segundo con mayor cantidad de estos compuestos. De acuerdo al análisis estadístico, existen diferencias significativas entre todos los extractos ($p<0.05$), a excepción de los dos extractos de semilla de aguacate Hass y criollo en acetato de etilo (SHA y SCA).

8.1.2.5. Saponinas

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la cuantificación de saponinas en los extractos de aguacate, de los cuales solo en cuatro se observó la presencia de estos compuestos, tres de metanol y uno de acetato de etilo; SHM exhibió 2 veces mayor cantidad de saponinas que CHM, SCM y SCA, siendo SHM diferente estadísticamente ($p<0.05$). Por otra parte, de acuerdo a la metodología empleada no se detectó la presencia de estos metabolitos en los extractos CHA, SHA, CCM y CCA.

8.1.2.6. Hidratos de carbono

Se realizó la cuantificación de hidratos de carbono en los ocho extractos, la cual se presenta en la Tabla 6, hallándose que el extracto con mayor cantidad de hidratos de carbono fue SCM, mientras que el de menor cantidad fue CHM, siendo 99 % menor que SCM; también se destacó que los extractos de semilla de aguacate contienen más hidratos de carbono que los de cáscara.

Tabla 6. Composición cuantitativa de metabolitos en los extractos de aguacate Hass y criollo

	Fenoles totales (mg EAG/g)	**Betalaínas (µg BE/100 g)**	**Taninos (mg EC/100 g)**	**Saponinas (UH/mg)**	**Hidratos de carbono (µg/g)**
CHM	14.35±0.91^{a}	**3.49±0.0023^{a}**	159.02±8.16^{a}	10±0.00^{a}	2.28±0.15^{a}
CHA	21.38±0.96^{b}	0.59±0.0007^{b}	235.70±8.58^{b}	ND	19.41±0.40^{b}
SHM	**90.18±3.63^{c}**	0.19±0.0001^{c}	**360.73±6.59^{c}**	**20±0.00^{b}**	16.61±0.52^{c}
SHA	11.07±0.91^{d}	0.14±0.0003^{d}	54.99±5.40^{d}	ND	71.61±2.15^{d}
CCM	31.68±1.27^{e}	0.27±0.0001^{e}	169.76±2.11^{e}	ND	12.59±0.54^{e}
CCA	20.89±1.11^{b}	0.17±0.0002^{f}	120.43±6.71^{f}	ND	5.69±0.40^{f}
SCM	75.20±1.09^{f}	0.14±0.0003^{g}	195.89±1.26^{g}	10±0.00^{a}	**232.39±2.33^{g}**
SCA	7.07±0.75^{g}	0.11±0.0003^{h}	47.66±2.11^{d}	10±0.00^{a}	41.07±0.92^{h}

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol, CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo, SHM = semilla de aguacate Hass en metanol, SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo, CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol, CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo, SCM = semilla de aguacate criollo en metanol, SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo, mg EAG/g = miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo, µg BE/100 g = como microgramos de betalaínas por 100 gramos, mg EC/100 g = miligramos equivalentes de catequina por 100 gramos, UH/mg = unidades hemolíticas por miligramo, y µg/g = microgramos por gramo. Títulos de hemólisis de saponinas para CHM, SCM y SCA = 2; para SHM = 4. Las letras a, b, c, d, e, f, g, h minúsculas corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre extractos para cada tipo de compuestos halladas en las pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ DE. ND = No detectado.

8.1.3. Determinación cualitativa de compuestos

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los ensayos cualitativos de metabolitos presentes en los extractos, donde se observa la presencia de alcaloides en los extractos CHM, SHM, SHA, CCM, SCM y SCA, mientras que ambos extractos de cáscara en acetato de etilo no los contenían (CHA y CCA); en cuanto a esteroides y triterpenos, estos se encontraron presentes únicamente en los dos extractos de semilla en metanol (SHM y SCM). No se halló presencia de antraquinonas, chalconas, auronas, ni cumarinas en ninguno de los extractos de semilla y cáscara de aguacate.

Tabla 7. Composición cualitativa de metabolitos en los extractos de aguacate Hass y criollo

	Alcaloides		**Esteroides y**
Extracto	**Mayer**	**Dragendorff**	**triterpenos**
CHM	+	+	-
SHM	+	-	+
SHA	+	-	-
CCM	+	+	-
SCM	+	-	+
SCA	+	-	-

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol, SHM = semilla de aguacate Hass en metanol, SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo, CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol, SCM = semilla de aguacate criollo en metanol y SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. Los resultados representan la presencia (+) o ausencia (-) de los compuestos.

8.1.4. Actividad antioxidante

La prueba de actividad antioxidante de los 8 extractos de aguacate por el método de $ABTS^{\cdot+}$, cuyos resultados se pueden ver en la Tabla 8, donde se encontró que el extracto con mayor actividad fue SHM, siendo casi 15 veces mayor que SCA, el cual fue el que presentó una menor capacidad antioxidante; en los resultados sobresale que los extractos metanólicos (CHM, SHM, CCM y SCM) fueron los que mostraron mayor actividad por este método, presentándose diferencias estadísticas entre seis de los extractos ($p<0.05$), a excepción de los dos de cáscara en acetato de etilo (CHA y CCA).

En cuanto al ensayo por el método $DPPH^{\cdot}$, los resultados se muestran en la Tabla 8, de los cuales SHM presentó la actividad antioxidante más elevada, siendo 90.8 % mayor que SHA, el cual fue el que presentó la menor capacidad; también se destaca que los cuatro extractos metanólicos presentaron el mayor efecto (CHM, SHM, CCM y SCM). No se encontraron diferencias significativas de los extractos CHM y CHA con respecto a CCA, sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los extractos SHM, SHA, CCM, SCM y SCA ($p<0.05$).

Al comparar entre los dos métodos se observa que la prueba de $DPPH^{\cdot}$ exhibió mayores valores de actividad antioxidante, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

8.2. Estudios biológicos

8.2.1. Actividad hemolítica

En la Figura 2 se muestran los resultados de la actividad hemolítica de los ocho extractos de aguacate, observándose un efecto dosis-dependiente. El extracto CCM presentó el mayor efecto hemolítico en las diversas concentraciones analizadas (8.5 – 73.24 % hemólisis), siendo aproximadamente seis veces mayor que la actividad hemolítica de SHM a la concentración más alta, el cual fue el que presentó menor efecto; a su vez, se puede observar que los cuatro extractos de cáscara fueron los que provocaron una mayor lisis de los eritrocitos humanos, en comparación de los cuatro extractos de semilla. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) al realizar las comparaciones entre

extractos y entre concentraciones (Anexo 12.3.1.), sin embargo, en el caso de SHM, este extracto no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de 800 y 1000 µg/mL, demostrando que incluso a concentraciones elevadas su actividad hemolítica no cambió, manteniéndose baja.

Tabla 8. Actividad antioxidante de los extractos de aguacate Hass y criollo

Extracto	ABTS·$^{+}$ (mg ET/g)	DPPH· (mg ET/g)
CHM	$68.79\pm0.78^{a}{}_{y}$	$190.20\pm0.81^{a}{}_{z}$
CHA	$56.22\pm1.58^{b}{}_{y}$	$179.36\pm4.25^{b}{}_{z}$
SHM	$323.61\pm6.82^{c}{}_{y}$	$1623.53\pm6.39^{c}{}_{z}$
SHA	$27.66\pm1.35^{d}{}_{y}$	$150.07\pm2.79^{d}{}_{z}$
CCM	$107.39\pm1.95^{e}{}_{y}$	$232.53\pm3.32^{e}{}_{z}$
CCA	$51.79\pm2.61^{b}{}_{y}$	$183.17\pm4.19^{ab}{}_{z}$
SCM	$92.74\pm2.67^{f}{}_{y}$	$213.57\pm4.29^{f}{}_{z}$
SCA	$21.78\pm1.28^{g}{}_{y}$	$160.15\pm4.94^{g}{}_{z}$

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol, CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo, SHM = semilla de aguacate Hass en metanol, SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo, CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol, CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo, SCM = semilla de aguacate criollo en metanol, SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo, y mg ET/g = miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra. Las letras a, b, c, d, e, f, g en superíndice corresponden a las diferencias estadísticamente significativas entre extractos halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Las letras y, z en subíndice corresponden a las diferencias estadísticamente significativas al comparar entre métodos de actividad antioxidante halladas en t de Student ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

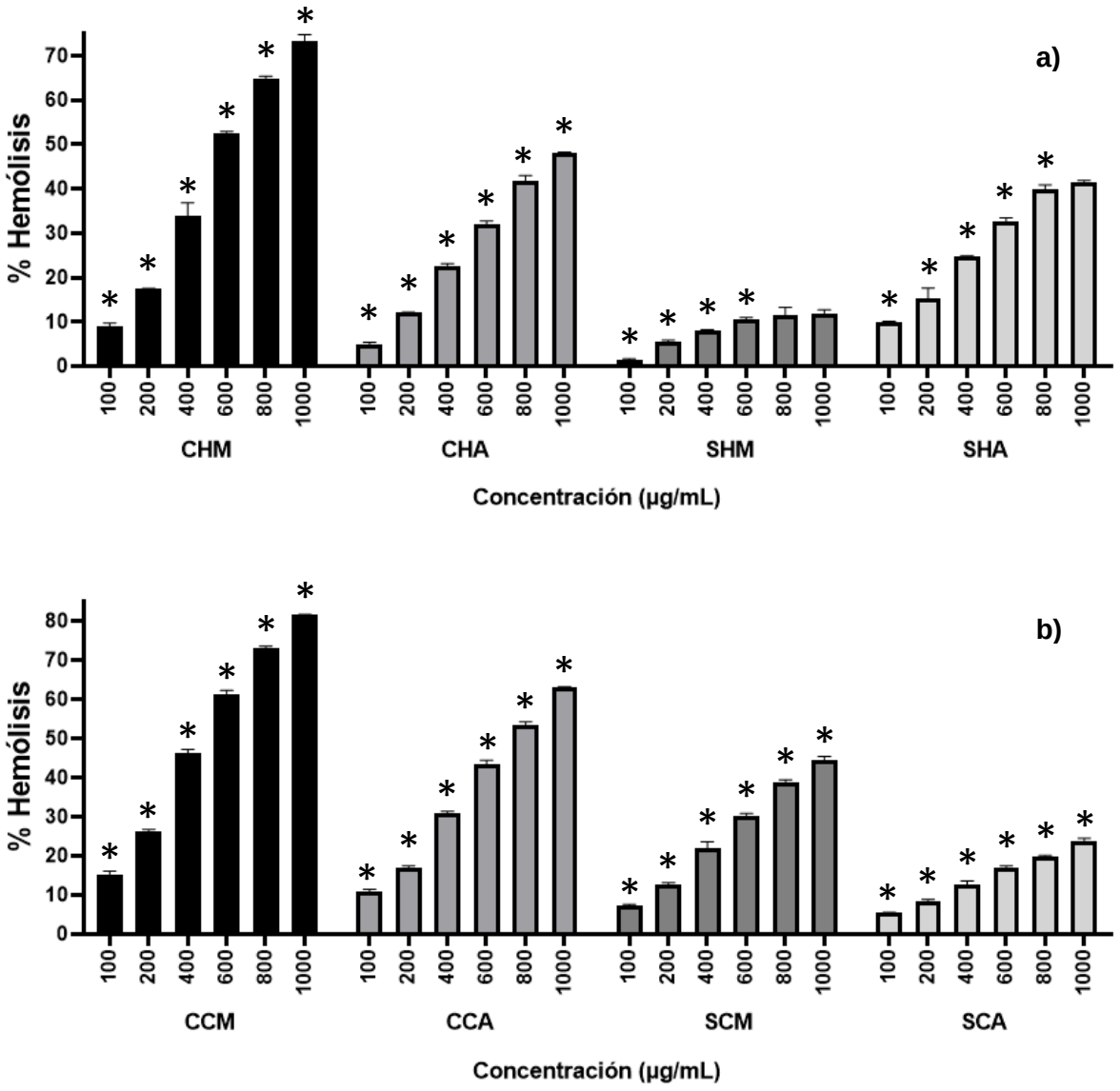

Figura 2. Efecto hemolítico causado por los extractos de aguacate. a) Hass. **b)** Criollo. CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol, CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo, SHM = semilla de aguacate Hass en metanol, SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo, CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol, CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo, SCM = semilla de aguacate criollo en metanol y SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. El * indica las diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones para cada extracto ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

8.2.2. Actividad citotóxica

En la Figura 3 se presentan los resultados del efecto de los cuatro extractos de aguacate Hass sobre la viabilidad celular de la línea celular SiHa. Como se puede observar en la Figura 3a, CHM tiene un efecto citotóxico dosis-tiempo dependiente hasta la concentración de 250 µg/mL, sin embargo, a partir de la concentración de 300 µg/mL se observa un incremento en la viabilidad, observándose esta misma tendencia a las 24, 48 y 72 h de exposición; es importante destacar que a las 72h se presentó la viabilidad celular más baja (15.12 %) en la concentración de 250 µg/mL; se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) al realizar comparaciones entre los tres tiempos y la mayoría de las concentraciones, a excepción de los resultados en las concentraciones de 250 y 300 µg/mL en los tiempos de 48 y 72 h (Anexo 12.3.2.). En relación al efecto sobre la viabilidad celular de CHA mostrado en la Figura 3b, este extracto logró disminuir la viabilidad celular de forma dosis-tiempo dependiente, demostrando poseer un efecto citotóxico, logrando disminuir la viabilidad celular hasta 7.34 % a la concentración de 750 µg/mL tras una incubación de 72 h. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre los tres tiempos en todas las concentraciones (Anexo 12.3.3.). Con lo que respecta al ensayo a 24 h, se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre todas las concentraciones; mientras que en el tiempo de 48 h se presentaron diferencias a bajas concentraciones, no así entre las concentraciones de 500 y 750 µg/mL, por otro lado, a 72 h la única concentración que demostró ser diferente fue la de 250 µg/mL.

Con respecto a SHM sobre células SiHa, en la Figura 3c se observa que esta muestra incrementa la viabilidad celular, puesto que éste estimula a las células de manera dosis y tiempo dependiente, aumentándola hasta 162.80 % en el tiempo de 72 h a la mayor concentración analizada (250 µg/mL). Al comparar entre concentraciones para cada tiempo de tratamiento, se observó que hubo diferencias significativas ($p<0.05$), a excepción entre el control y 10 µg/mL a las 24 h (Anexo 12.3.4.); asimismo se observaron diferencias entre los tiempos de estudio en las diversas concentraciones evaluadas. Por su parte, SHA logró reducir la viabilidad de las células en los tres tiempos, lo cual se muestra en la Figura 3d, indicando que hay un efecto citotóxico dependiente de la dosis y del tiempo. La viabilidad celular más baja (6.51 %) se presentó en el tiempo de incubación de 72 h a 250 µg/mL; de

acuerdo al análisis estadístico (Anexo 12.3.5.), este extracto mostró diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tiempos y las concentraciones, sin embargo, a 72 h no se hallaron diferencias entre las concentraciones de 75, 100 y 250 µg/mL.

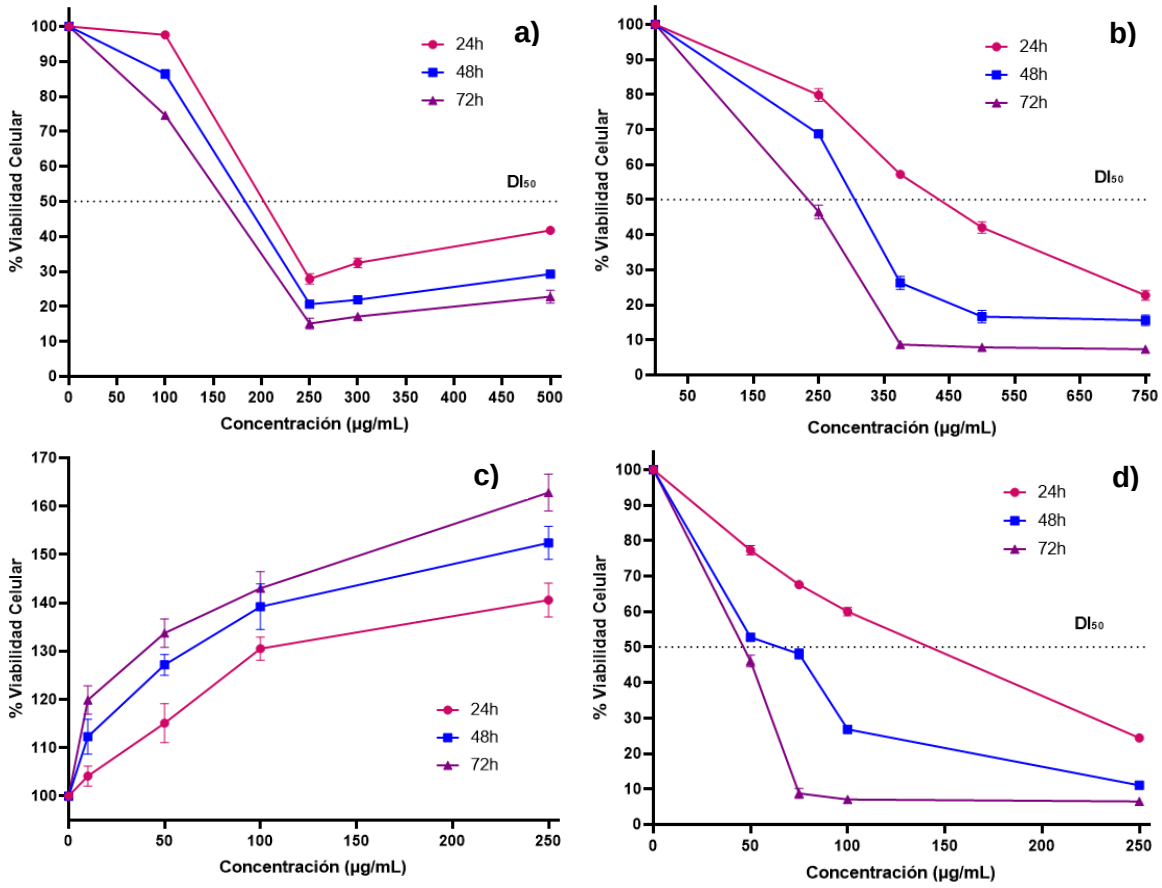

Figura 3. Efecto de los extractos de aguacate Hass sobre la viabilidad de la línea celular SiHa. a) CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol. **b)** CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo. **c)** SHM = semilla de aguacate Hass en metanol. **d)** SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo. Los puntos representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ DE.

El efecto de los extractos de aguacate criollo sobre la viabilidad en las células malignas SiHa se presenta en la Figura 4. Como se puede observar en la Figura 4a, la disminución de la viabilidad celular por parte del extracto CCM es dependiente de la dosis y del tiempo, lo cual

indica que posee efecto citotóxico; sin embargo, a las 24 h se destaca que la viabilidad permaneció por arriba del 50 %, lográndose disminuir después de 48 h. La viabilidad celular más baja observada fue de 7.53 % y se encontró a las 72 h a la concentración de 100 µg/mL. De acuerdo a los análisis estadísticos (Anexo 12.3.6.), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos y entre las concentraciones, a excepción entre el control y 10 µg/mL a 24 h, y entre las concentraciones 75 y 100 µg/mL a las 72 h. En cuanto a CCA, los resultados se presentan en la Figura 4b, el extracto demostró tener actividad citotóxica, y que ésta fue dosis-tiempo dependientes; la vialidad celular más baja (6.84 %) se detectó a las 72 h a 250 µg/mL. En los análisis estadísticos (Anexo 12.3.7.) se pudo comprobar que existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tiempos y las concentraciones, sin embargo, entre 0 y 10 µg/mL a las 24 y 48 h no hubo diferencias, así como tampoco entre 100 y 250 µg/mL a las 72 h.

Con respecto a SCM, los resultados se presentaron en la Figura 4c, observándose disminución de la viabilidad a 24 y 48 h hasta la concentración 250 µg/mL, pero a la concentración más alta se presentó recuperación de la viabilidad de 29.43 y 44.0 %, respectivamente; por su parte, a 72 h se presentó disminución de la viabilidad del 88 % hasta 100 µg/mL, sin embargo, a concentraciones superiores se observó recuperación de las células incrementándose la viabilidad en un 61.64 %. Con respecto a los análisis estadísticos (Anexo 12.3.8.), se hallaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre todas las concentraciones y todos los tiempos analizados. Referente a la muestra SCA, los resultados se muestran en la Figura 4d, observando disminución de la viabilidad celular de forma dosis-tiempo dependiente, lo que indica que tiene efecto citotóxico; presentándose la menor viabilidad celular a las 72 h en la concentración de 250 µg/mL (5.82 %). De acuerdo a lo hallado en los análisis estadísticos (Anexo 12.3.9.), existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tiempos y las concentraciones utilizadas, exceptuando entre 100 y 250 µg/mL a 48 h, y 75 y 100 µg/mL a 72 h.

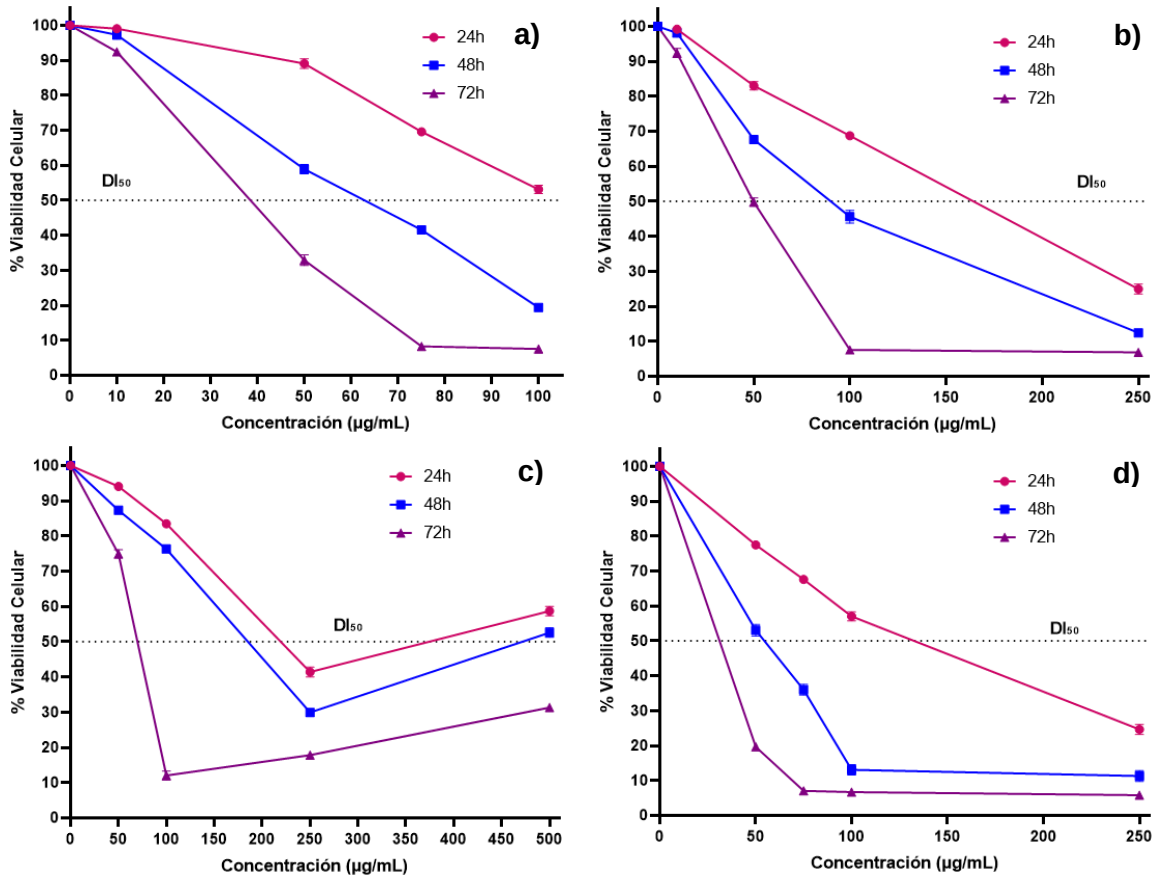

Figura 4. Efecto de los extractos de aguacate criollo sobre la viabilidad de la línea celular SiHa. a) CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol**. b)** CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo. **c)** SCM = semilla de aguacate criollo en metanol. **d)** SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. Los puntos representan la media de tres repeticiones independientes ± DE.

En lo que respecta a la línea celular MDA-MB-231, en la Figura 5 se presenta el efecto sobre la viabilidad causado por los extractos de aguacate Hass. En la Figura 5a se puede observar que CHM tiene efecto citotóxico hasta la concentración de 100 µg/mL, presentándose la menor viabilidad a las 72 h con 16.50 %, sin embargo, a concentraciones más elevadas ésta aumenta; observándose esta misma tendencia en todos los tiempos de tratamiento. Se puede ver que en la concentración de 500 µg/mL a las 24 y 48 h de exposición, la viabilidad celular aumenta incluso por encima del 50 %. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre todas las concentraciones y todos los tiempos analizados (Anexo 12.3.10.). En el caso de CHA, cuyos resultados se presentan en la Figura 5b, se puede

observar que la disminución de la viabilidad celular fue dependiente de la dosis y del tiempo, exponiendo un efecto citotóxico; presentándose la menor viabilidad celular (9.88 %) a 750 µg/mL a las 72 h. El análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tres tiempos y las concentraciones, a excepción de 500 y 750 µg/mL a las 72 h de incubación (Anexo 12.3.11.).

En tanto al extracto SHM, el cual se muestra en la Figura 5c, demostró que eleva la viabilidad de las células MDA-MB-231, puesto que ésta aumentó de manera dosis-tiempo dependiente; el resultado mayor fue de 214.13 %, éste se presentó en la concentración de 250 µg/mL a las 72 h. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre las concentraciones y tiempos analizados; sin embargo, no se encontraron diferencias entre 0 y 10 µg/mL a 24 h, así como tampoco entre 48 y 72 h a 10 µg/mL (Anexo 12.3.12.). En la Figura 5d se muestra el efecto de SHA sobre la viabilidad celular, la cual disminuyó de manera tiempo-dosis dependiente, presentando un efecto citotóxico; la viabilidad celular más baja fue de 9.16 % presentándose a 72 h en la concentración de 250 µg/mL. Se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) en gran parte de los tiempos y las concentraciones estudiadas, exceptuando entre 0 y 10 y 100 y 250 µg/mL a las 24 y 72 h respectivamente, así como entre los tiempos de 48 y 72 h a la concentración de 10 µg/mL (Anexo 12.3.13.).

Los resultados del efecto de los extractos de aguacate criollo sobre la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 se presentan en la Figura 6. En la Figura 6a se muestran los resultados de CCM, éste demostró tener un efecto citotóxico puesto que redujo la viabilidad celular de manera tiempo-dosis dependiente, logrando bajarla hasta 7.41 % a 72 h; se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) exceptuando entre 0 y 10 µg/mL a 24 h, y entre 100 y 250 µg/mL a 72 h, así como entre 24 y 48 h en la concentración de 10 µg/mL (Anexo 12.3.14.). En lo que respecta a CCA, en la Figura 6b se observa una disminución de la viabilidad de manera dosis-tiempo dependiente exhibiendo efecto citotóxico, el valor más bajo de viabilidad (11.46 %) se presentó a las 72 h a 500 µg/mL; no se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre las concentraciones de 250 y 500 µg/mL a 72 h, sin embargo, entre el resto de las concentraciones y los tiempos estudiados sí las hubo (Anexo 12.3.15.).

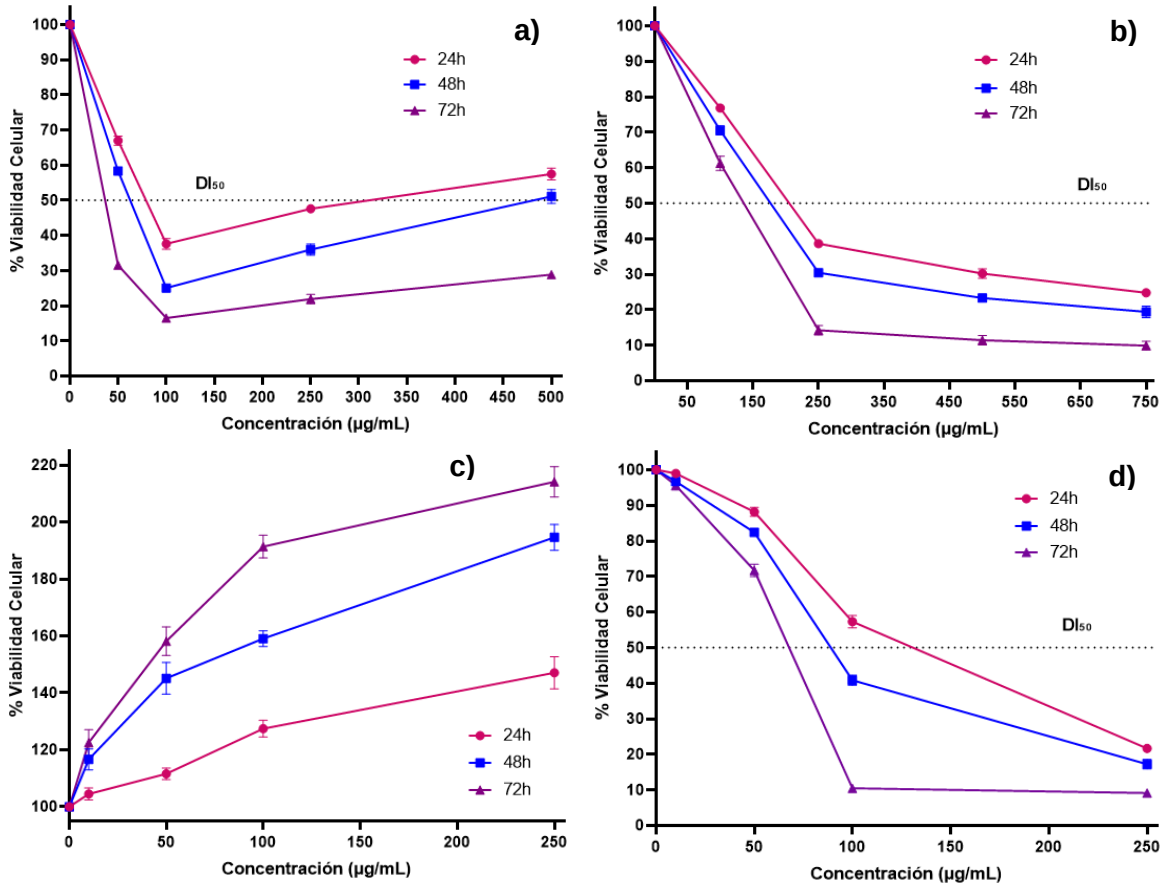

Figura 5. Efecto de los extractos de aguacate Hass sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231. a) CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol. **b)** CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo. **c)** SHM = semilla de aguacate Hass en metanol. **d)** SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo. Los puntos representan la media de tres repeticiones independientes ± DE.

En el caso de SCM, esta muestra logró inhibir la viabilidad celular hasta 72.21 % a 250 µg/mL tras la incubación de 72 h, no obstante, al aumentar la concentración, la viabilidad se elevó por encima del 50 %, dicha tendencia se observó en los tres tiempos de exposición, tal como se presenta en la Figura 6c. El análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p<0.05$) entre la mayoría de los tiempos y concentraciones evaluadas, no siendo así entre 250 y 500 µg/mL a 72 h (Anexo 12.3.16.). Los resultados del extracto SCA se presentan en la Figura 6d, éste mostró un efecto citotóxico dependiente de la dosis y del tiempo en esta

línea celular maligna, inhibiendo la viabilidad celular hasta 91.98 % a 72 h en la máxima concentración analizada; presentándose diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tiempos de exposición y las concentraciones, excepto entre 250 y 500 µg/mL a 72 h (Anexo 12.3.17.).

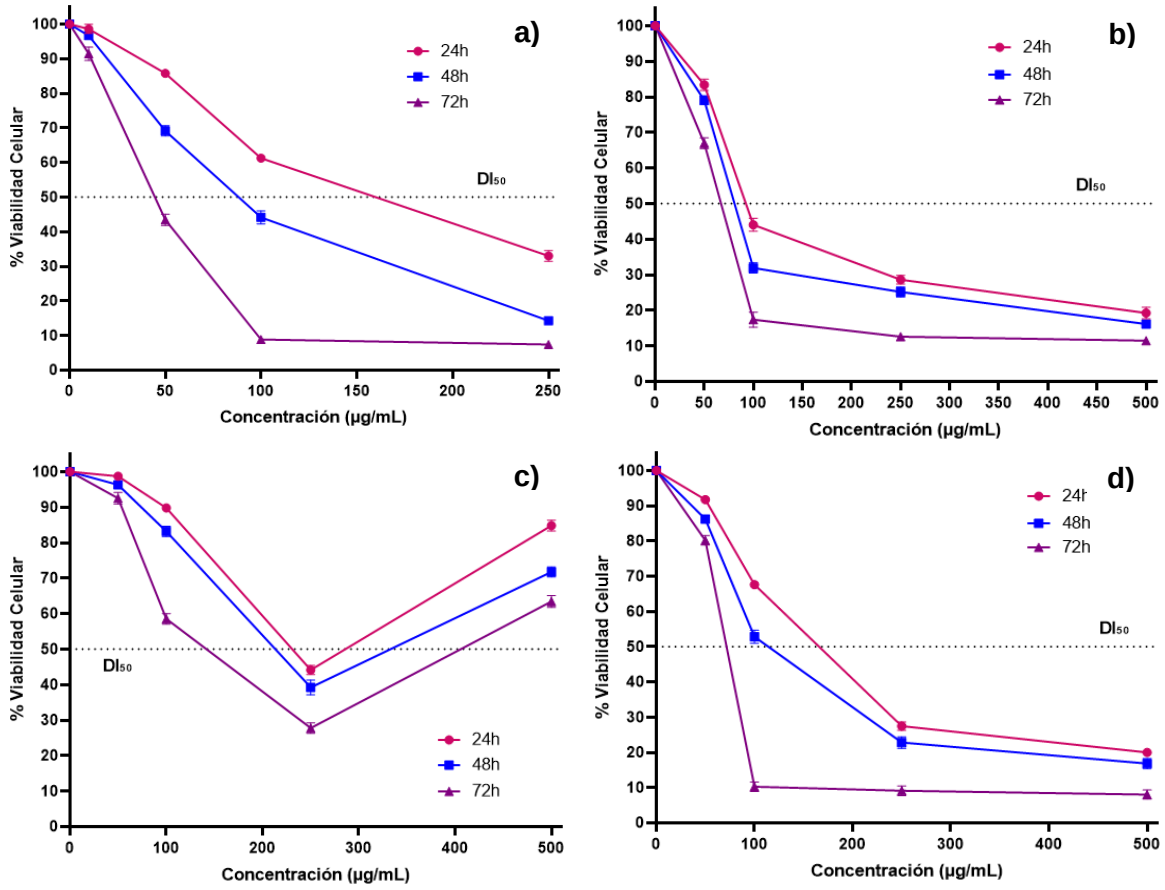

Figura 6. Efecto de los extractos de aguacate criollo sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231. a) CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol. **b)** CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo. **c)** SCM = semilla de aguacate criollo en metanol. **d)** SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. Los puntos representan la media de tres repeticiones independientes ± DE.

En la Tabla 9 se presentan las dosis inhibitorias medias (DI_{50}) de los ocho extractos de aguacate Hass y criollo sobre las dos líneas celulares. Con respecto a las células SiHa, se puede observar que la DI_{50} disminuye de manera tiempo dependiente, existiendo diferencias significativas entre los tiempos de tratamiento ($p<0.05$). El mayor efecto citotóxico lo mostraron los extractos de aguacate criollo, siendo SCA el que presentó los valores más bajos de DI_{50} en los tres tiempos de exposición, exhibiéndose estadísticamente diferente a todos los extractos ($p<0.05$). De manera general, las muestras de semilla fueron más tóxicas que las de cáscara en ambos tipos de aguacate, siendo los extractos en acetato de etilo los que presentaron DI_{50} más baja; por el contrario, CHA fue el extracto menos tóxico, el cual mostró diferencias significativas con respecto a los otros extractos ($p<0.05$). En el caso de SHM no se logró calcular la DI_{50} en ninguno de los tiempos evaluados, puesto que esta muestra incrementó la viabilidad celular.

Los resultados para la línea celular MDA-MB-231 muestran que la DI_{50} disminuyó de manera significativa ($p<0.05$) al aumentar el tiempo de incubación; observándose el mayor efecto tóxico por el aguacate Hass, siendo el extracto CHM el más citotóxico en los tres tiempos de tratamiento, con diferencias significativas al compararlo con la mayoría de los extractos ($p<0.05$), exceptuando CCM a 72 h. Los extractos de semilla de aguacate criollo fueron más tóxicos que los de cáscara; sin embargo, en el aguacate Hass en ambas partes morfológicas se observa mucha variabilidad en los resultados de DI_{50}, por lo cual no se puede saber qué parte es la más citotóxica. Al comparar las muestras de acuerdo al disolvente, en la mayoría de los casos los extractos en acetato de etilo fueron los que mayor daño causaron a las células, siendo superado únicamente por el extracto CHM; opuesto a lo antes mencionado, SCM fue la muestra menos tóxica, observándose diferencias estadísticamente significativas comparándolo con los otros extractos ($p<0.05$), no siendo así con CHA a 72 h. Por otro lado, debido a que el extracto SHM promovió aumento de la viabilidad celular, no se pudo calcular la DI_{50} en ninguno de los tiempos de estudio.

Tabla 9. DI_{50} de los extractos de aguacate Hass y criollo sobre ambas líneas celulares en los ensayos de citotoxicidad

Extracto (µg/mL)	SiHa			MDA-MB-231		
	24 h	**48 h**	**72 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**
CHM	$202.41\pm2.68^{a}_{x}$	$183.01\pm1.87^{a}_{y}$	$162.05\pm3.10^{a}_{z}$	$78.88\pm2.39^{a}_{x}$	$62.47\pm1.20^{a}_{y}$	$36.50\pm0.40^{a}_{z}$
CHA	$434.68\pm8.33^{b}_{x}$	$305.19\pm3.74^{b}_{y}$	$234.07\pm8.49^{b}_{z}$	$205.32\pm2.60^{b}_{x}$	$176.75\pm1.66^{b}_{y}$	$135.82\pm6.02^{b}_{z}$
SHM	NC	NC	NC	NC	NC	NC
SHA	$142.17\pm4.97^{c}_{x}$	$65.51\pm5.06^{c}_{y}$	$46.37\pm1.39^{c}_{z}$	$130.46\pm4.83^{c}_{x}$	$89.01\pm1.15^{c}_{y}$	$67.69\pm0.65^{c}_{z}$
CCM	NC	$62.78\pm1.01^{c}_{x}$	$38.53\pm0.77^{d}_{y}$	$159.85\pm5.89^{d}_{x}$	$88.44\pm2.82^{c}_{y}$	$44.54\pm1.37^{a}_{z}$
CCA	$164.23\pm4.18^{d}_{x}$	$90.12\pm3.68^{d}_{y}$	$49.86\pm1.27^{c}_{z}$	$91.87\pm1.59^{e}_{x}$	$80.83\pm1.30^{d}_{y}$	$67.57\pm1.23^{c}_{z}$
SCM	$219.52\pm3.44^{e}_{x}$	$185.14\pm1.35^{a}_{y}$	$69.80\pm0.93^{e}_{z}$	$230.85\pm4.15^{f}_{x}$	$213.35\pm6.40^{e}_{y}$	$139.03\pm11.25^{b}_{z}$
SCA	$132.44\pm5.96^{f}_{x}$	$54.70\pm2.61^{e}_{y}$	$31.12\pm0.21^{f}_{z}$	$165.76\pm4.14^{d}_{x}$	$113.71\pm7.92^{f}_{y}$	$71.57\pm0.71^{c}_{z}$

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol, CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo, SHM = semilla de aguacate Hass en metanol, SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo, CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol, CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo, SCM = semilla de aguacate criollo en metanol y SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. Las letras diferentes en superíndice a, b, c, d, e, f indican diferencia estadística significativa entre extractos, para cada tiempo. Letras diferentes en subíndice x, y, z indican diferencia estadística significativa entre los tres tiempos de ensayo para cada extracto, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

IX. DISCUSIÓN

9.1. Análisis fitoquímico de los extractos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo

9.1.1. Determinación cuantitativa de compuestos

En la Tabla 6 se presentan los resultados del contenido de fenoles de los extractos de aguacate Hass y criollo. En relación a los extractos de semilla de aguacate Hass analizados, algunas muestras tuvieron concentraciones superiores a lo reportado para extractos obtenidos con diferentes disolventes en semillas de la misma especie de las variedades Hass, Fuerte y Shepard, cultivadas en diversos países (7,92,118,152); mientras que la muestra SHA mostró resultados similares a los extractos metanólicos obtenidos de dos de las variedades anteriormente mencionadas (118); por el contrario, varios de los extractos presentaron valores inferiores a lo reportado para extractos de semilla de aguacate Hass y Fuerte (7,92,116,120,122,153).

En cuanto a los extractos de cáscara de aguacate Hass, el contenido de estos compuestos fue entre 3 y 99 % superiores a los de extractos acetónicos, hidroalcohólicos y metanólicos de cáscara de las variedades Hass y tipo Hass (92,125,154); sin embargo, algunos valores coincidieron con los resultados de los extractos de aguacate Hass y Shepard (118,154); contrariamente, en otros extractos las concentraciones fueron de 2 - 36 veces inferiores a las reportadas por diversos autores en extractos de aguacate Hass y Fuerte (7,122,124,130,153–156).

En lo que respecta al contenido de fenoles de las muestras de aguacate criollo de este trabajo, al compararlos con extractos de la variedad *drymifolia*, la muestra SCM presentó entre 61 - 93 % mayor contenido de fenoles que el extracto de semilla en hexano y sus fracciones en metanol y cloroformo, mientras que la concentración de SCA fue similar al mismo extracto y su fracción en cloroformo (157). En cuanto a las muestras de cáscara CCM y CCA, el contenido de estos compuestos mostraron diferencias a lo reportado para la variedad *drymifolia*, siendo inferiores al extracto metanólico y muestran resultados variables a los

extractos metanol-ácido trifluoroacético, lo cual se debió al árbol del cual se realizó la colecta (26,124). Es importante destacar que la técnica utilizada detecta y cuantifica cualquier metabolito que tenga grupos fenólicos en su estructura, tales como ácidos fenólicos, flavonas, taninos, flavonoides, entre otros, que han sido identificados en la semilla y cáscara de aguacate Hass y criollo por otros autores y previamente descritos en las Tablas 2 y 3.

Las diferencias observadas entre los resultados de este estudio comparados con los de otros autores pueden estar relacionadas a la variedad del aguacate utilizado, las condiciones agronómicas donde fue cultivado (92), las condiciones de procesamiento de las muestras (114), la etapa de maduración del aguacate (130,158), el tipo de disolventes usados en las extracciones y la variabilidad en las metodologías utilizadas.

En el presente estudio no se detectaron antocianinas en ninguno de los extractos de aguacate Hass y criollo, lo cual es contrario a lo publicado por diversos autores quienes hallaron estos compuestos en extractos de semilla y cáscara de aguacate Hass y criollo (var. *drymifolia*) cultivados en México, Nueva Zelanda, Sudáfrica y España, como se muestra en las Tablas 2 y 3 (93,122,126–129). La ausencia de antocianinas en los extractos estudiados puede deberse a que fueron expuestos a la luz y a temperaturas de hasta 65 °C durante su procesamiento, y debido a que este tipo de compuestos poseen una baja estabilidad, pueden ser degradados por la luz, oxígeno, enzimas, metales, presencia de otros oxidantes, pH y temperatura (159); mientras que en los estudios antes mencionados, las muestras fueron secadas por liofilización o con nitrógeno líquido, maceradas a 4 °C o a temperatura ambiente, los disolventes evaporados a máximo 40 °C y en condiciones de oscuridad usando lámparas verdes para minimizar la degradación de las antocianinas (93,122,126–129).

En el presente trabajo se detectaron concentraciones de betalaínas muy bajas en todos los extractos, destacando el extracto CHM, ya que fue el que mostró mayor cantidad, 3.49 µg BE/100g (Tabla 6), siendo 99.99 % menor que el contenido de estos metabolitos en extractos metanólicos al 80 % de pitahaya de mayo amarilla y roja (160). Se sabe que algunas de las plantas ricas en betalaínas son el betabel, el amaranto y la pitahaya (99,161,162). Sin embargo, no se encontraron reportes que demostraran la presencia de este tipo de compuestos

en aguacate, lo cual podría deberse a que estos metabolitos son característicos de plantas del orden Caryophyllales (163), mientras que el aguacate pertenece al orden Laurales (91).

Se sabe que la cáscara y la semilla del aguacate son ricas en taninos, siendo superior a la concentración en pulpa (87). Las concentraciones de estos compuestos en los extractos de semilla de aguacate Hass y criollo presentados en la Tabla 6, mostraron que el contenido de estos metabolitos fue entre 71 – 98 % superior a lo reportado por otros autores quienes evaluaron extractos acuosos y etanólicos de semilla de aguacate Hass (11,152); mientras que fueron entre 98.8 – 99.8 % inferiores a la fracción en acetato de etilo de un extracto hidroalcohólico de *P. americana* cultivado en Brasil (120).

En el caso de los extractos de cáscara en ambos tipos de aguacate, estos fueron inferiores, aproximadamente entre 91-56 %, con respecto a lo reportado para extractos metanólicos y acuosos de *P. americana* (155,156); mientras que fueron entre 96 - 98 % superiores al extracto acuoso de cáscara de aguacate Hass analizado por Calderón-Oliver et al. (11). Un estudio realizado por Salmerón (130), quien evaluó extractos acuosos y etanólicos de semilla de aguacate cultivado en México, demostró que el contenido de estos compuestos fue similar a CHM y CCM, superior a CCA e inferior a CHA. Las variaciones entre los resultados podrían deberse a la fase de maduración de *Persea americana* (130,158), al tipo de disolvente usado para obtener los extractos y a la metodología utilizada. Diversos estudios han demostrado que la semilla y la cáscara de aguacate Hass y la cáscara de aguacate criollo contienen diversos tipos de taninos, como se describen en las Tablas 2 y 3, entre los que se encuentran catequinas y procianidinas.

En el presente estudio se detectaron saponinas en un extracto de cáscara de aguacate Hass (CHM) y en tres extractos de semilla de ambos tipos de aguacates (SHM, SCM y SCA) (Tabla 6), lo cual concuerda con lo publicado por diversos autores quienes detectaron estos compuestos en extractos acuosos, metanólicos, etanólicos, etanol-hexano y cloroformo, de semillas y cáscara de *Persea americana* cultivadas en diversos países (152,158,164–167). Contrariamente, algunos autores no encontraron la presencia de saponinas en extractos acuosos y metanólicos de cáscara de la misma variedad de aguacate (155,156). Por otro lado,

un estudio demostró la presencia de estos metabolitos en extractos hidro-alcohólicos de cáscara de aguacate Hass cultivado en México, en un rango de 3.88 – 40.84 mg/g (154), lo que coincide con lo hallado en CHM. Por otro lado, no se encontraron trabajos que informen de la presencia de saponinas en aguacate criollo. Los extractos analizados en el presente trabajo causaron bajo efecto hemolítico debido a las saponinas, ya que los títulos resultantes fueron de 2 y 4, lo cual es un indicativo de que la concentración de saponinas es bajo, pues extractos de amaranto han reportado títulos de hemólisis entre 7 – 14 veces superiores a los de los extractos de aguacate (168).

Los resultados de este estudio, realizado en los extractos de aguacate, mostraron que los extractos de semillas contienen una mayor cantidad de carbohidratos que los de cáscaras (Tabla 6); sin embargo, esto difiere con Araújo et al. (115), quienes refirieron que la cantidad de estos compuestos es muy similar en la semilla (42 – 81 %) y en la cáscara (43 – 81 %) de diferentes variedades de este mismo fruto. Se han reportado diversos estudios sobre el contenido de carbohidratos totales, realizados mediante análisis químicos proximales de harinas de cáscara y semilla de *Persea americana,* indicando que contienen entre 36.3 – 71.3 % (115,122,130) y 28.1 – 79.54 % (91,115,122,158), respectivamente; así como también se ha descrito la composición de hidratos de carbono en la cáscara y la semilla de aguacate Hass y en la cáscara de aguacate criollo, identificando diversos monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, como se muestran en las Tablas 2 y 3. Las diferencias entre los resultados de este trabajo y los publicados por los autores anteriormente mencionados, están relacionadas con el tipo de muestra analizada, ya que todos ellos cuantificaron los carbohidratos a partir de harinas, mientras que en el presente estudio se realizó en los extractos orgánicos.

9.1.2. Determinación cualitativa de compuestos

En el presente trabajo, los cuatro extractos en metanol de semilla y cáscara y los dos extractos de semilla en acetato de etilo mostraron la presencia de alcaloides (Tabla 7), lo cual es similar a lo reportado por diferentes autores quienes hallaron este tipo de compuestos en semilla (152,158,164–166) y cáscara de aguacate Hass (155,156,167). Por otro lado, en los dos extractos de semilla en metanol se observó la presencia de esteroides y triterpenos, mientras que en ningún extracto de cáscara fueron encontrados (Tabla 7), estos resultados coinciden

con distintos investigadores, quienes analizaron extractos de semilla de *Persea americana*, hallando estos metabolitos (122,152,158,165,166), y no encontrándolos en cáscara (155,156,167). A través de métodos cuantitativos se ha reportado la presencia de fitoesteroles, fitoestanoles y terpenos en extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de cáscara de aguacate Hass y criollo (var. *drymifolia*) cultivados en México y España, identificando algunos de estos compuestos, como se indican en las Tablas 2 y 3 (122,124,125). Por otra parte, en ninguno de los extractos analizados en el presente estudio se observó la presencia de antraquinonas, chalconas, auronas, ni cumarinas, esto resulta parecido a lo reportado por diversos autores, quienes no hallaron antraquinonas en semilla de *Persea americana* (165,166), así como tampoco cumarinas en cáscara (155); contrariamente, en un estudio llevado a cabo en extractos etanólicos y clorofórmicos de semilla de este mismo tipo de aguacate sí se encontraron cumarinas (152); sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estos metabolitos sí se encuentren presentes en los extractos analizados en el presente trabajo, puesto que las técnicas empleadas fueron cualitativas, por lo que sería necesario llevar a cabo la cuantificación de estos compuestos, empleando otros métodos para comprobar los resultados obtenidos.

9.1.3. Actividad antioxidante

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo para la actividad antioxidante por el método $ABTS^{\bullet+}$ en la semilla de aguacate Hass y criollo, los cuales se muestran en la Tabla 8, los cuatro extractos fueron entre 1.2 - 20.8 veces superiores a lo reportado por Kosińska et al. (118), quienes estudiaron extractos metanólicos de semilla de las variedades Hass y Shepard; asimismo, SHM mostró actividad antioxidante aproximadamente 68 % superior a las variedades Hass y Fuerte estudiadas por Tremocoldi et al. (7). Por el contrario, los cuatro extractos de semilla fueron inferiores alrededor de 3 y 4 veces a lo reportado para la variedad Hass usando diferentes disolventes (116,122); mientras que SHA, SCM y SCA fueron sobre el 55 % menores a extractos etanólicos de semilla de aguacate Hass y Fuerte (7).

Acorde a lo publicado por Lee et al. (153), el extracto metanólico de semilla de aguacate Hass mostró un mayor porcentaje de atrapamiento de radicales libres que el extracto de

cáscara, lo cual fue similar a lo hallado en este trabajo, mientras que Zavala-Guerrero (157), quien estudió semillas de la variedad *drymifolia*, demostrando que la fracción metanólica poseía mayor porcentaje de atrapamiento que el extracto hexánico y la fracción clorofórmica, lo cual coincidió con lo hallado en el presente estudio con los extractos en metanol y acetato de etilo.

Con respecto a los extractos de cáscara del presente estudio, estos fueron alrededor de 3 veces mayores a lo reportado por Kosińska et al. (118) para las variedades Hass y Shepard cultivadas en Australia; sin embargo, los cuatro extractos de cáscara mostraron entre 53 - 99 % menor actividad antioxidante que extractos acuosos, etanólicos e hidroalcohólicos de *P. americana* var. Hass y Fuerte (7,122,154).

En cuanto a la actividad antioxidante medida por el método DPPH·, mostrada en la Tabla 8, las cuatro muestras de semilla analizadas fueron entre 7 – 17 veces superiores a lo hallado por diferentes autores quienes evaluaron muestras de aguacates Hass y Fuerte extraídas con etanol/agua y acetona/agua/ácido acético (7,92,122); igualmente SHM presentó aproximadamente 6 veces mayor actividad antioxidante que los extractos acetónicos y etanólicos de la variedad Hass cultivada en México; por el contrario, SHA, SCM y SCA fueron menores alrededor de 30 % (116). Un estudio realizado en Corea, demostró que el extracto metanólico de semilla de aguacate Hass presentó un mayor porcentaje de atrapamiento de radicales libres que el de cáscara, lo cual es coincidente a lo hallado en el presente trabajo (153). Mientras que el caso del extracto hexánico y sus fracciones en metanol y cloroformo de semilla de la variedad *drymifolia*, las tres muestras presentaron porcentajes de atrapamiento similares entre sí (157), lo cual es contrario a lo hallado en el presente estudio puesto que la actividad antioxidante de los extractos en metanol fue superior a la de los preparados con acetato de etilo, esto se debe a que cada disolvente extrae metabolitos distintos debido a la afinidad por su polaridad.

Con respecto a los dos extractos de cáscara de aguacate Hass, estos mostraron resultados alrededor de 2 – 17 veces por encima de lo reportado por diversos autores para *Persea americana* variedades Hass, tipo Hass y Fuerte, cultivadas en distintos países y usando

diferentes disolventes (7,92,122,124,125). Mientras que en el caso de los dos extractos de cáscara de aguacate criollo, al compararlos con la variedad *drymifolia* cultivada en México, ambos mostraron actividad antioxidante arriba del 89 % que la encontrada para muestras obtenidas en metanol-ácido trifluoroacético (124) y aproximadamente 99 % inferiores a extractos metanólicos (93).

La variabilidad entre los resultados puede estar ligada al procesamiento de las muestras analizadas (114), la etapa de maduración del fruto (130), la variedad de *Persea americana* (115), el método de extracción y disolvente utilizado.

Los resultados de este estudio demostraron que los extractos en metanol presentaron mayor actividad antioxidante que los de acetato de etilo por ambos métodos, así como también que el método de DPPH· mostró valores superiores comparados con los de $ABTS^{\cdot+}$; ambos resultados podrían deberse al hecho de que el método $ABTS^{\cdot+}$ detecta la capacidad antioxidante de compuestos polares y no polares, mientras que DPPH· únicamente de compuestos polares (169) y a la diferencia entre los compuestos extraídos por cada disolvente debido a su polaridad.

Se observó una relación entre los resultados de actividad antioxidante por ambos métodos y el contenido de fenoles totales y taninos de los extractos de aguacate, debido a que los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los que presentaban mayor concentración de dichos compuestos, esto concuerda con lo observado en diferentes estudios en los que se analizaron extractos etanólicos y acetónicos de semilla y cáscara de aguacate Hass en los que se demostró que a mayor contenido de fenoles, mayor capacidad antioxidante (116,122,141); puesto que se sabe que los compuestos fenólicos poseen alta capacidad de atrapamiento de radicales libres (170).

9.2. Estudios biológicos

9.2.1. Actividad hemolítica

Los resultados del presente estudio mostraron que los ocho extractos poseen menor actividad hemolítica a dosis bajas (Figura 2), lo cual es similar a extractos hexánicos de semilla de aguacate variedad *drymifolia* y al etanólico de cáscara de aguacate Quintal sobre cultivo primario de células epiteliales mamarias bovinas, eritrocitos humanos y ovinos (8,24,113).

Se ha reportado que el extracto acetónico de pulpa de aguacate protege de la oxidación a eritrocitos humanos (171). Diversos autores han reportado por diferentes métodos que extractos metanólicos, hexánicos y clorofórmicos de pulpa de aguacate Hass y Fuerte, poseen baja citotoxicidad sobre líneas celulares no cancerosas como fibroblastos de pulmón de hámster chino (V79), células de tejido conectivo de ratón (L-929) y células epiteliales orales (TE1177) (172–174). Contrariamente, en un estudio realizado por Kulkarni et al. (175), se encontró que extractos metanólicos de hojas y pulpa de *P. americana* poseen alta genotoxicidad, puesto que provocaron aberraciones en metafase sobre linfocitos humanos.

Se sabe que las saponinas tienen la propiedad de causar hemólisis (176); de los extractos analizados solamente CHM, SHM, SCM y SCA mostraron la presencia de estos compuestos, siendo SHM el extracto con mayor actividad de saponinas, sin embargo, con el menor porcentaje de hemólisis, contrariamente, CCM fue el que presentó el mayor porcentaje de lisis de eritrocitos pero no mostró presencia de saponinas, por lo que a estos metabolitos no se les puede atribuir exclusivamente el efecto hemolítico observado en todos los extractos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, de manera individual no se observó relación entre la actividad hemolítica causada por los extractos de aguacate y la actividad antioxidante, así como el contenido de compuestos fenólicos, alcaloides, esteroides y triterpenos, sin embargo, no se descarta que estos metabolitos pudieran tener un efecto sobre la actividad biológica de manera sinérgica o que posiblemente los extractos presenten otros compuestos que pudieran contribuir a la lisis de los eritrocitos.

9.2.2. Actividad citotóxica

Los extractos CHA, SHA, CCM, CCA y SCA presentaron actividad citotóxica tiempo y dosis dependiente en ambas líneas celulares (Figuras 3b, 3d, 4a, 4b, 4d, 5b, 5d, 6a, 6b y 6d), resultados similares han sido hallados por acción de diferentes extractos orgánicos de distintas partes del aguacate, incluyendo extractos etanólicos, metanólicos, clorofórmicos, hexánicos y en cloroformo/metanol de cáscara, semilla, cubierta de semilla y pulpa de *P. americana* variedades Hass y *drymifolia* sobre líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7), cérvix (HeLa), colon (Caco-2, HT29 y HCT116), hígado (HepG2), pulmón (H1299 y A549), próstata (LNCaP), estómago (BGC823) y orales (83-01-82CA) (81,113,122,131,138–141,153,174). Por otro lado, se han observado resultados similares a los obtenidos al probar compuestos aislados, como triterpenoides y defensinas PaDef de semilla y pulpa de aguacate Hass y criollo (var. *drymifolia*) sobre células MCF-7, HepG2 y de leucemia mieloide (K562) y linfoide (Jurkat) (81,177–179).

Se ha sugerido que los compuestos fenólicos presentes en las plantas son los responsables de la actividad anticáncer (100,180–182), inhibiendo la iniciación y la progresión de la enfermedad al modular genes que regulan procesos claves como la transformación oncogénica de las células normales, desarrollo de tumores, angiogénesis, metástasis y apoptosis (183). Tal es el caso de extractos etanólicos ricos en fenoles obtenidos de semilla, cubierta de semilla y cáscara de aguacate Hass, que disminuyeron la viabilidad y proliferación celular, además de reportar incremento del número de células apoptóticas en las líneas celulares Caco-2, A549 y HeLa (cáncer de cérvix) (122,141). Se ha publicado que compuestos fenólicos puros que se encuentran en la cáscara o semilla de aguacate, como es el caso del ácido protocatecuico que tiene actividad citotóxica y antiproliferativa dependientes de la dosis, induciendo apoptosis, arresto del ciclo celular en fase G_2/M y autofagia en líneas celulares de cáncer de ovario (OVCAR-3, SKOV-3 y A2780) (184); así como el ácido clorogénico, el cual tuvo efecto citotóxico sobre células 4T1 de cáncer de mama de ratón e indujo la apoptosis vía Bax, Bcl-2, p53 y caspasa 3 (185); otro compuesto fenólico es la quercitina, que demostró efecto citotóxico dosis-dependiente sobre las líneas celulares HepG2, Hep3B, MDA-MB-231 y HCT116, provocando la muerte celular a través de la activación de los lisosomas por el factor de transcripción EB y la inducción de

ferroptosis gracias a la peroxidación lipídica generada por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) (186); y la (-)-epicatequina disminuyó la proliferación celular de células MDA-MB-231 y MCF-7 e indujo la apoptosis a través de la producción de ERO (187).

Una de las principales hipótesis es que a mayor concentración de fitoquímicos, mayor capacidad antioxidante y, por lo tanto, mayor actividad anticáncer (188), sin embargo, en este trabajo se observó que la mayoría de los extractos con baja actividad antioxidante y bajo contenido de fenoles y taninos, tales como CHA, SHA, CCA, SCA y CCM, fueron los que mostraron una constante actividad citotóxica; algunos autores han sugerido que este hecho podría deberse a que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos no juega un papel importante durante las etapas tardías de la carcinogénesis, la promoción y la progresión, siendo los mecanismos de acción principales el antiproliferativo y la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular, mientras que en la iniciación el efecto antioxidante es más relevante, cuando las ERO y otros carcinógenos prooxidantes provocan mutaciones en el ADN (188,189).

Por otro lado, el extracto SHM incrementó la viabilidad de ambos tipos de células (Figuras 3c y 5c), además presentó el mayor contenido de fenoles, taninos y la actividad antioxidante más elevada por ambos métodos (Tablas 6 y 8), así como la actividad hemolítica más baja (Figura 2). Este incremento se puede deber a que el extracto contiene alta actividad antioxidante promovida por los compuestos fenólicos, lo cual reduce la concentración de radicales libres en las células evitando la muerte celular y elevando la viabilidad celular; ya que se ha demostrado que el aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) induce la apoptosis, como es el caso del extracto clorofórmico de pulpa de aguacate Hass, el cual aumentó la cantidad de ERO en la línea celular 83-01-82CA, promoviendo la apoptosis mediante vías intrínsecas y extrínsecas, mientras que en células orales normales no aumentaron (174); en el caso del extracto hexánico de semilla de aguacate variedad *drymifolia*, éste aumentó la producción de ERO en la línea celular Caco-2, lo cual provocó disminución de la viabilidad celular y aumento de apoptosis vía caspasas 8 y 9 (113); asimismo los extractos etanólicos de semilla y hoja de aguacate Hass elevaron la generación de peróxido de hidrógeno induciendo apoptosis vía p53 y caspasa 3 en células Jukart de

leucemia, mientras que al ser combinados con el antioxidante N-acetil-cisteína se redujo el peróxido de hidrógeno y se inhibió la apoptosis (190); así como el péptido antimicrobiano PaDef presente en la semilla de *P. americana* var. *drymifolia* indujo la producción de peróxido de hidrógeno y anión superóxido en células Jukart, estimulando la apoptosis por vía intrínseca y extrínseca, y realizando cambios epigenéticos en histona 3 (179); estos resultados dan evidencia de que el aumento en la viabilidad celular inducida por el extracto podría estar ligada a su elevada actividad antioxidante, aumentando el atrapamiento de ERO intracelulares y evitando la muerte celular.

Por otro lado, se ha reportado que el factor nuclear eritroide 2 (NRF2) en las células cancerosas se encuentra envuelto en la progresión de la enfermedad y que incluso puede conferir resistencia hacia la quimioterapia y la radioterapia (191). NRF2 es un factor de transcripción que regula la expresión de diversos genes de enzimas antioxidantes endógenas, ya que se une a una secuencia del ADN llamada elemento de respuesta antioxidante, y su actividad es regulada por la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1), la cual se une a NRF2 provocando su degradación (192). Sin embargo, los compuestos antioxidantes pueden inhibir a Keap1 (193), lo cual se traduce en una sobre activación de NRF2, aumentando la expresión de enzimas antioxidantes que disminuyen las ERO intracelulares evitando la apoptosis (194); esto podría haber sucedido en ambas líneas celulares malignas tratadas con el extracto SHM, ya que mostró elevado contenido de compuestos fenólicos, los cuales podrían causar bloqueo de la acción de Keap1, evitando la degradación de NRF2 y sobreexpresando genes antioxidantes.

Los extractos CHM y SCM presentaron actividad citotóxica a dosis bajas, mientras que a dosis altas mostraron recuperación de la viabilidad en ambas líneas celulares (Figuras 3a, 4c, 5a y 6c); este incremento en la viabilidad podría ser explicado por el hecho de que en los ensayos se utilizaron concentraciones de hasta 500 µg/mL de dichas muestras, por lo que al aumentar la concentración del extracto, también se eleva la concentración de antioxidantes; lo cual podría disminuir las ERO intracelulares por vías antioxidantes indirectas (Keap1/NRF2) y directas, evitando la muerte celular, como se mencionó en párrafos

anteriores; sin embargo, no se descarta la acción de otro tipo de compuestos, pues ambas partes morfológicas del aguacate contienen diferentes metabolitos.

La presencia de otros compuestos detectados en algunos de los extractos de cáscara y semilla de aguacate Hass y criollo, tales como saponinas, alcaloides, esteroides y triterpenos también podrían haber contribuido al efecto biológico observado, puesto que algunos autores han reportado que estos metabolitos mostraron actividad citotóxica sobre las líneas celulares malignas de pulmón (NCI-H460 y Calu-1), colon (SW480 y Caco-2), ovario (CaOV-3 y OVCAR-3), hígado (HepG2) y mama (MDA-MB-231 y MCF-7) (195–200).

X. CONCLUSIONES

- El extracto SCA presentó el mayor rendimiento.
- Los ocho extractos contenían elevados niveles de fenoles y taninos, siendo SHM el de mayor contenido.
- Cuatro extractos presentaron saponinas, destacándose SHM con la mayor actividad.
- Seis extractos mostraron presencia de alcaloides y dos de esteroides y triterpenos.
- Todos los extractos presentaron alta actividad antioxidante por ambos métodos, sobresaliendo SHM.
- Todos los extractos mostraron baja actividad hemolítica, siendo SHM el de menor actividad.
- Los extractos con actividad citotóxica fueron CHA, SHA, CCA, SCA y CCM, cuyo efecto fue dependiente de la dosis y del tiempo en ambas líneas celulares.
- Los extractos CHM y SCM presentaron actividad citotóxica a bajas concentraciones, sin embargo, a concentraciones elevadas se mostró recuperación de la viabilidad en ambos tipos de células.
- El extracto SHM incrementó la viabilidad celular de forma dosis-dependiente en las dos líneas celulares.
- La mayor actividad citotóxica se mostró en las células SiHa por parte del extracto SCA.

XI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar extractos que sean obtenidos a través de disolventes no polares.
- Se sugiere realizar la purificación e identificación de compuestos de los extractos CHA, SHA, CCM, CCA y SCA, ya que fueron los que mostraron actividad citotóxica, así como de la muestra SHM, la cual causó aumento de la viabilidad celular.
- Evaluar el efecto de las fracciones y metabolitos aislados sobre la viabilidad celular en los mismos tipos de células utilizados.
- Llevar a cabo estudios biológicos para determinar la actividad apoptótica y la fase del de arresto en el ciclo celular de los extractos CHA, SHA, CCM, CCA y SCA, por su potencial uso como tratamientos para algún tipo de cáncer de mama y cérvix.
- Es importante realizar estudios que evalúen los mecanismos de acción de los extractos con actividad citotóxica, así como del que presentó aumento de la viabilidad celular.
- Realizar estudios de citotoxicidad sobre otras líneas celulares.

XII. REFERENCIAS

1. Sánchez N. C. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. Rev Médica Clínica Las Condes. 2013;24(4):553–62.
2. Akram M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. Biol Res. 2017;50(1):33.
3. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical cancer: An overview of pathophysiology and management. Semin Oncol Nurs. 2019;35(2):166–74.
4. Zhang H-H, Guo X-L. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. Cancer Chemother Pharmacol. 2016;78(1):13–26.
5. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int J Med Sci. 2012;9(3):193–9.
6. Siew Y-Y, Zareisedehizadeh S, Seetoh W-G, Neo S-Y, Tan C-H, Koh H-L. Ethnobotanical survey of usage of fresh medicinal plants in Singapore. J Ethnopharmacol. 2014;155(3):1450–66.
7. Tremocoldi MA, Rosalen PL, Franchin M, Massarioli AP, Denny C, Daiuto ÉR, et al. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. PLoS One. 2018;13(2):e0192577.
8. Amado DAV, Helmann GAB, Detoni AM, de Carvalho SLC, de Aguiar CM, Martin CA, et al. Antioxidant and antibacterial activity and preliminary toxicity analysis of four varieties of avocado (*Persea americana* Mill.). Brazilian J Food Technol. 2019;22:e2018044.
9. D'Ambrosio SM, Han C, Pan L, Douglas Kinghorn A, Ding H. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2011;409(3):465–9.
10. Hennessey-Ramos L, Murillo-Arango W, Guayabo GT. Evaluation of a colorant and oil extracted from avocado waste as functional components of a liquid soap formulation. Rev Fac Nac Agron Medellin. 2019;72(2):8855–62.
11. Calderón-Oliver M, Escalona-Buendía HB, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Pedroza-Islas R, Ponce-Alquicira E. Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. LWT - Food Sci

Technol. 2016;65:46–52.

12. De Oliveira AP, Franco EDS, Rodrigues Barreto R, Cordeiro DP, De Melo RG, De Aquino CMF, et al. Effect of semisolid formulation of *Persea americana* Mill (avocado) oil on wound healing in rats. Evidence-based Complement Altern Med. 2013;2013:472382.
13. Pahua-Ramos ME, Garduño-Siciliano L, Dorantes-Alvarez L, Chamorro-Cevallos G, Herrera-Martínez J, Osorio-Esquivel O, et al. Reduced-calorie avocado paste attenuates metabolic factors associated with a hypercholesterolemic-high fructose diet in rats. Plant Foods Hum Nutr. 2014;69(1):18–24.
14. Park E, Edirisinghe I, Burton-Freeman B. Avocado fruit on postprandial markers of cardio-metabolic risk: A randomized controlled dose response trial in overweight and obese men and women. Nutrients. 2018;10(9):1287.
15. Lu YC, Chang HS, Peng CF, Lin CH, Chen IS. Secondary metabolites from the unripe pulp of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. Food Chem. 2012;135(4):2904–9.
16. Lee TH, Tsai YF, Huang TT, Chen PY, Liang WL, Lee CK. Heptadecanols from the leaves of *Persea americana* var. *americana*. Food Chem. 2012;132(2):921–4.
17. Santana I, Castelo-Branco VN, Guimarães BM, Silva L de O, Peixoto VODS, Cabral LMC, et al. Hass avocado (*Persea americana* Mill.) oil enriched in phenolic compounds and tocopherols by expeller-pressing the unpeeled microwave dried fruit. Food Chem. 2019;286:354–61.
18. Ramos-Jerz MDR, Villanueva S, Jerz G, Winterhalter P, Deters AM. *Persea americana* Mill. seed: Fractionation, characterization, and effects on human keratinocytes and fibroblasts. Evidence-Based Complement Altern Med. 2013;2013:391247.
19. Falodun A, Engel N, Kragl U, Nebe B, Langer P. Novel anticancer alkene lactone from *Persea americana*. Pharm Biol. 2013;51(6):700–6.
20. Campos-Hernández N, Cruz-Castillo JG, Hernández-Montes A, Rubio-Hernández D. Aceite de frutos de *Persea schiedeana* en sobremaduración y cosechados de árboles en estado silvestre. Univ y Cienc. 2011;27(2):179–89.
21. López-Yerena A, Guerra-Ramírez D, Jácome-Rincón J, Espinosa-Solares T, Reyes-

Trejo B, Famiani F, et al. Initial evaluation of fruit of accessions of *Persea schiedeana* Nees for nutritional value, quality and oil extraction. Food Chem. 2018;245:879–84.

22. Bhuyan DJ, Alsherbiny MA, Perera S, Low M, Basu A, Devi OA, et al. The odyssey of bioactive compounds in avocado (*Persea americana*) and their health benefits. Antioxidants. 2019;8(10):426.
23. Ochoa-Zarzosa A, Báez-Magaña M, Guzmán-Rodríguez JJ, Flores-Alvarez LJ, Lara-Márquez M, Zavala-Guerrero B, et al. Bioactive molecules from native mexican avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*): A review. Plant Foods Hum Nutr. 2021;76(2):133–42.
24. Báez-Magaña M, Ochoa-Zarzosa A, Alva-Murillo N, Salgado-Garciglia R, López-Meza JE. Lipid-rich extract from mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. J Immunol Res. 2019;2019.
25. Guzmán-Rodríguez JJ, López-Gómez R, Suárez-Rodríguez LM, Salgado-Garciglia R, Rodríguez-Zapata LC, Ochoa-Zarzosa A, et al. Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Biomed Res Int. 2013;2013.
26. Miñón-Hernández D, Dorantes-Alvarez L, Guzmán-Gerónimo RI, Alvarado-Olivarez M, Herrera-Meza S, Santiago-Roque I, et al. Avocado creole peel ameliorates metabolic alterations caused by a high sucrose fat diet in a wistar rats model. Plant Foods Hum Nutr. 2020;76(1):12–9.
27. Segovia FJ, Hidalgo GI, Villasante J, Ramis X, Almajano MP. Avocado seed: A comparative study of antioxidant content and capacity in protecting oil models from oxidation. Molecules. 2018;23(21):10.
28. SIAP. Anuario estadístico de la producción agrícola [Internet]. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020 [cited 2022 Feb 3]. Available from: https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/
29. WHO. Cancer [Internet]. World Health Organization. 2017 [cited 2019 Aug 15]. Available from: https://www.who.int/topics/cancer/es/
30. GCO. Estimated number of prevalent cases in 2020 [Internet]. Global Cancer Observatory. 2020 [cited 2022 Feb 3]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-

analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=2&statistic=5&prevalence=1&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&i

31. Bukhtoyarov OV, Samarin DM. Pathogenesis of cancer: Cancer reparative trap. J Cancer Ther. 2015;6(5):399–412.
32. García Carrancá A. La célula cancerosa. In: Jiménez García LF, Merchant Larios H, editors. Biología Celular y Molecular. Primera ed. México: Pearson Educación; 2003. p. 663–75.
33. Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. An Med Interna. 2001;18(6):326–35.
34. de la Garza Salazar JG, Juárez Sánchez P. ¿Qué sabemos del cáncer en el momento actual? In: de la Garza Salazar JG, Juárez Sánchez P, editors. El Cáncer. Primera ed. Monterrey, Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014. p. 33–45.
35. Bryan S, Masoud H, Weir HK, Woods R, Lockwood G, Smith L, et al. Cancer in Canada: Stage at diagnosis. Heal Reports. 2018;29(12):21–5.
36. Ligresti G, Libra M, Militello L, Clementi S, Donia M, Imbesi R, et al. Breast cancer: Molecular basis and therapeutic strategies (review). Mol Med Rep. 2008;1(4):451–8.
37. Wyld L, Audisio RA, Poston GJ. The evolution of cancer surgery and future perspectives. Nat Rev Clin Oncol. 2014;12(2):115–24.
38. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the immune system: The history and background of immunotherapy. Semin Oncol Nurs. 2019;35(5).
39. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. Nat Rev Cancer. 2014;12(4):237–51.
40. Trayes KP, Cokenakes SEH. Breast cancer treatment. Am Fam Physician. 2021;104(2):171–8.
41. Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Rev Mex Ciencias Farm. 2010;41(4):18–27.
42. Liu YQ, Wang XL, He DH, Cheng YX. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic

opportunities of phytochemicals. Phytomedicine. 2021;80:153402.

43. Metri KG, Bhargav H, Chowdhury P, Koka PS. Ayurveda for chemo-radiotherapy induced side effects in cancer patients. J Stem Cells. 2013;8(2):115–29.

44. Subramani R, Lakshmanaswamy R. Complementary and alternative medicine and breast cancer. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;151:231–74.

45. Instituto Nacional del Cáncer. Medicina complementaria y alternativa [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 3]. Available from: https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca

46. Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, SánchezGutiérrez M, Betanzos-Cabrera G, Sosa-Delgado SM, Sumaya-Martínez MT, et al. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 1: Fruits and polysaccharides. Nutrients. 2017;9(2).

47. López-Romero D, Izquierdo-Vega J, Morales-González J, Madrigal-Bujaidar E, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M, et al. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: Plants, vegetables, and natural resin. Nutrients. 2018;10(12):1954.

48. Subedi L, Timalsena S, Duwadi P, Thapa R, Paudel A, Parajuli K. Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. J Tradit Chinese Med. 2014;34(5):584–90.

49. Berger RG, Lunkenbein S, Ströhle A, Hahn A. Antioxidants in food: Mere myth or magic medicine? Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(2):162–71.

50. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants -double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxid Med Cell Longev. 2010;3(4):228–37.

51. Arvaniti OS, Samaras Y, Gatidou G, Thomaidis NS, Stasinakis AS. Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. Food Res Int. 2019;119:244–67.

52. Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. The case for anthocyanin consumption to promote human ealth: A review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2013;12(5):483–508.

53. Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. Molecules. 2020;25(17):3809.

54. Rahimi P, Abedimanesh S, Mesbah-Namin SA, Ostadrahimi A. Betalains, the nature-inspired pigments, in health and diseases. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(18):2949–78.

55. Madadi E, Mazloum-Ravasan S, Yu JS, Ha JW, Hamishehkar H, Kim KH. Therapeutic application of betalains: A review. Plants. 2020;9(9):1–27.

56. Eghbali S, Askari SF, Avan R, Sahebkar A. Therapeutic effects of *Punica granatum* (pomegranate): An updated review of clinical trials. J Nutr Metab. 2021;2021.

57. Díaz-de-Cerio E, Verardo V, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Health effects of *Psidium guajava* L. leaves: An overview of the last decade. Int J Mol Sci. 2017;18(4).

58. Cristóbal-Luna JM, Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E, Chamorro-Cevallos G. Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. Food Chem Toxicol. 2018;112:224–34.

59. Mohd Ali M, Hashim N, Abd Aziz S, Lasekan O. Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. Food Res Int. 2020;137.

60. Lauricella M, Emanuele S, Calvaruso G, Giuliano M, D'Anneo A. Multifaceted health benefits of *Mangifera indica* L. (mango): The inestimable value of orchards recently planted in Sicilian rural areas. Nutrients. 2017;9(5).

61. Hoseini SM, Khosravi-Darani K, Mozafari MR. Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. Mini Rev Med Chem. 2013;13(8):1231–7.

62. Šamec D, Urlić B, Salopek-Sondi B. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(15):2411–22.

63. Miraj S, Alesaeidi S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuitta chamomile* (chamomile). Electron Physician. 2016;8(9):3024–31.

64. Araujo QR De, Gattward JN, Almoosawi S, Parada Costa Silva M das GC, Dantas PADS, Araujo Júnior QR De. Cocoa and human health: From head to foot--a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56(1):1–12.

65. Patrakar R, Mansuriya M, Patil P. Phytochemical and pharmacological review on *Laurus nobilis*. Int J Pharm Chem Sci. 2012;1(2):595–602.

66. Alam A, Ferdosh S, Ghafoor K, Hakim A, Juraimi AS, Khatib A, et al. *Clinacanthus nutans*: A review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry. Asian Pac J Trop Med. 2016;9(4):402–9.
67. Ramadhani V. Overview of phytochemicals and pharmacological activity of keji beling plant (*Strobilanthes crispus* Bl.). Int J Pharm Sci Med. 2021;6(7):25–39.
68. Zareisedehizadeh S, Tan CH, Koh HL. A review of botanical characteristics, traditional usage, chemical components, pharmacological activities, and safety of *Pereskia bleo* (kunth) DC. Evidence-Based Complement Altern Med. 2014;2014.
69. Gao Y, Kuok KI, Jin Y, Wang R. Biomedical applications of *Aloe vera*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(sup1):S244–56.
70. Mao QQ, Xu XY, Cao SY, Gan RY, Corke H, Beta T, et al. Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Foods. 2019;8(6).
71. Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2012;11(2):148–73.
72. Kumari M, Jain S. Tannin: An antinutrient with positive effect to manage diabetes. Res J Recent Sci. 2012;1(12):1–8.
73. Osbourn A, Goss RJM, Field RA. The saponins-polar isoprenoids with important and diverse biological activities. Nat Prod Rep. 2011;28(7):1261–8.
74. Biswas T, Dwivedi UN. Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, *in vitro* production, and pharmacological relevance. Protoplasma. 2019;256(6):1463–86.
75. Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. Eur J Clin Nutr. 2007;61 Suppl 1:S5–18.
76. Franconetti A, López Ó, Fernandez-Bolanos JG. Carbohydrates: Potential sweet tools against cancer. Curr Med Chem. 2020;27(8):1206–42.
77. Vargas VML, Iturbe PS, Canché BC, Pacheco LCG, Ávalos RMG, Valenzuela OM. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. J Mex Chem Soc. 2004;48(1):67–94.
78. Liu C, Yang S, Wang K, Bao X, Liu Y, Zhou S, et al. Alkaloids from traditional chinese medicine against hepatocellular carcinoma. Biomed Pharmacother. 2019;120:109543.

79. Cahlíková L, Breiterová K, Opletal L. Chemistry and biological activity of alkaloids from the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). Molecules. 2020;25(20).
80. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). 2009;2(3):119–45.
81. Abubakar ANF, Achmadi SS, Suparto IH. Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. Asian Pac J Trop Biomed. 2017;7(5):397–400.
82. Maia Corrêa G, Takahashi J, De Sousa Fontoura H, Carmona Cara D, Gomes Costa Abreu V DA, Alois Abreu Martins D DE, et al. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). Int J Pharm Pharm Sci. 2014;6(6):75–81.
83. Peñarrieta JM, Tejeda L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA. Phenolic compunds in food. Rev Boliv Química. 2014;31(2):68–81.
84. Diaz-Muñoz G, Miranda IL, Sartori SK, de Rezende DC, Diaz MAN. Anthraquinones: An overview. Stud Nat Prod Chem. 2018;58:313–38.
85. Malik EM, Müller CE. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. Med Res Rev. 2016;36(4):705–48.
86. Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, Balkansky S, S. Parmar V, K. Prasad A, et al. Coumarins as antioxidants. Curr Med Chem. 2012;18(25):3929–51.
87. Rosero JC, Cruz S, Osorio C, Hurtado N. Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (*Persea americana* Mill.) cultivated in Colombia. Molecules. 2019;24(17):3209.
88. Rincón-Hernández CA, Sánchez-Pérez JDLL, Espinosa-García FJ. Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. Rev Mex Biodivers. 2011;82(2):395–412.
89. Pérez-Álvarez S, Ávila-Quezada G, Coto-Arbelo O. El aguacatero (*Persea americana* Mill). Cultiv Trop. 2015;36(2):111–23.
90. Cowan AK, Wolstenholme BN. Avocado. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá E, editors. Encyclopedia of Food and Health. Oxford, UK: Academic Press; 2016. p. 294–300.

91. Kumoro AC, Alhanif M, Wardhani DH. A critical review on tropical fruits seeds as prospective sources of nutritional and bioactive compounds for functional foods development: A case of Indonesian exotic fruits. Int J Food Sci. 2020;2020.
92. Wang W, Bostic TR, Gu L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. Food Chem. 2010;122(4):1193–8.
93. Corrales-García JE, del Rosario García-Mateos M, Martínez-López E, Barrientos-Priego AF, Ybarra-Moncada MC, Ibarra-Estrada E, et al. Anthocyanin and oil contents, fatty acids profiles and antioxidant activity of mexican landrace avocado fruits. Plant Foods Hum Nutr. 2019;74(2):210–5.
94. Cruz-Castillo JG, Tinoco-Rueda JÁ, Famiani F. Distribution of *Persea schiedeana* in Mexico and potential for the production of fruits with high-quality oil. HortScience. 2017;52(4):661–6.
95. George BP, Chandran R, Abrahamse H. Role of phytochemicals in cancer chemoprevention: Insights. Antioxidants. 2021;10(9):1455.
96. Kim C, Kim B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review. Nutrients. 2018;10(8).
97. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med. 2002;113 Suppl(9 Suppl. 2):71–88.
98. Subramaniam S, Selvaduray KR, Radhakrishnan AK. Bioactive compounds: Natural defense against cancer? Biomolecules. 2019;9(12).
99. Lechner JF, Stoner GD. Red beetroot and betalains as cancer chemopreventative agents. Molecules. 2019;24(8).
100. Jafari S, Saeidnia S, Abdollahi M. Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle. Curr Pharm Biotechnol. 2014;15(4):409–21.
101. Katsori A-M, Hadjipavlou-Litina D. Chalcones in cancer: Understanding their role in terms of QSAR. Curr Med Chem. 2009;16(9):1062–81.
102. Repanas A, Katsori AM, Hadjipavlou-Litina D. Chalcones in cancer: Understanding their role in terms of QSAR. II part. Mini Rev Med Chem. 2013;13(7):952–70.
103. Alsaif G, Almosnid N, Hawkins I, Taylor Z, Knott DLT, Handy S, et al. Evaluation

of fourteen aurone derivatives as potential anti-cancer agents. Curr Pharm Biotechnol. 2017;18(5).

104. Grattan BJ. Plant sterols as anticancer nutrients: Evidence for their role in breast cancer. Nutrients. 2013;5(2):359–87.

105. Menezes JCJMDS, Diederich M. Translational role of natural coumarins and their derivatives as anticancer agents. Future Med Chem. 2019;11(9):1057–82.

106. Kaur M, Kohli S, Sandhu S, Bansal Y, Bansal G. Coumarin: A promising scaffold for anticancer agents. Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(8):1032–48.

107. Chopra B, Dhingra AK, Dhar KL, Nepali K. Emerging role of terpenoids for the treatment of cancer: A review. Mini Rev Med Chem. 2021;21(16):2300–36.

108. Teodor ED, Ungureanu O, Gatea F, Radu GL. The potential of flavonoids and tannins from medicinal plants as anticancer agents. Anticancer Agents Med Chem. 2020;20(18):2216–27.

109. Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. Br J Pharmacol. 2017;174(11):1226–43.

110. Man S, Gao W, Zhang Y, Huang L, Liu C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. Fitoterapia. 2010;81(7):703–14.

111. Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, Atanasov AG, Bishayee A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. Eur J Pharmacol. 2019;858:172472.

112. Grigalius I, Petrikaite V. Relationship between antioxidant and anticancer activity of trihydroxyflavones. Molecules. 2017;22(12).

113. Lara-Márquez M, Báez-Magaña M, Raymundo-Ramos C, Spagnuolo PA, Macías-Rodríguez L, Salgado-Garciglia R, et al. Lipid-rich extract from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) induces apoptosis and modulates the inflammatory response in Caco-2 human colon cancer cells. J Funct Foods. 2020;64:103658.

114. Saavedra J, Córdova A, Navarro R, Díaz-Calderón P, Fuentealba C, Astudillo-Castro C, et al. Industrial avocado waste: Functional compounds preservation by convective drying process. J Food Eng. 2017;198:81–90.

115. Araújo RG, Rodriguez-Jasso RM, Ruiz HA, Pintado MME, Aguilar CN. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. Trends Food Sci Technol.

2018;80:51–60.

116. Araújo RG, Rodriguez-Jasso RM, Ruiz HA, Govea-Salas M, Pintado ME, Aguilar CN. Process optimization of microwave-assisted extraction of bioactive molecules from avocado seeds. Ind Crops Prod. 2020;154:112623.

117. Salazar-López NJ, Domínguez-Avila JA, Yahia EM, Belmonte-Herrera BH, Wall-Medrano A, Montalvo-González E, et al. Avocado fruit and by-products as potential sources of bioactive compounds. Food Res Int. 2020;138:109774.

118. Kosińska A, Karamać M, Estrella I, Hernández T, Bartolomé B, Dykes GA. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. J Agric Food Chem. 2012;60(18):4613–9.

119. López-Cobo A, Gómez-Caravaca AM, Pasini F, Caboni MF, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. LWT. 2016;73:505–13.

120. Athaydes BR, Alves GM, Assis ALEM de, Gomes JVD, Rodrigues RP, Campagnaro BP, et al. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. Food Res Int. 2019;119:751–60.

121. Figueroa JG, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A. Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. Food Res Int. 2018;105:752–63.

122. Velderrain-Rodríguez GR, Quero J, Osada J, Martín-Belloso O, Rodríguez-Yoldi MJ. Phenolic-rich extracts from avocado fruit residues as functional food ingredients with antioxidant and antiproliferative properties. Biomolecules. 2021;11(7):977.

123. Figueroa JG, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A. Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass Q-TOF. Food Chem. 2018;245:707–16.

124. Ramos-Aguilar AL, Ornelas-Paz J, Tapia-Vargas LM, Gardea-Bejar AA, Yahia EM, Ornelas-Paz J de J, et al. Metabolomic analysis and physical attributes of ripe fruits from mexican creole (*Persea americana* var. *drymifolia*) and “Hass” avocados. Food

Chem. 2021;354:129571.

125. Ramos-Aguilar AL, Ornelas-Paz J, Tapia-Vargas LM, Gardea-Béjar AA, Yahia EM, Ornelas-Paz J de J, et al. Effect of cultivar on the content of selected phytochemicals in avocado peels. Food Res Int. 2021;140:110024.
126. Ashton OBO, Wong M, McGhie TK, Vather R, Wang Y, Requejo-Jackman C, et al. Pigments in avocado tissue and oil. J Agric Food Chem. 2006;54(26):10151–8.
127. Cox KA, McGhie TK, White A, Woolf AB. Skin colour and pigment changes during ripening of "Hass" avocado fruit. Postharvest Biol Technol. 2004;31(3):287–94.
128. Shikwambana K, Mafeo TP, Mathaba N, Shikwambana K, Mafeo TP, Mathaba N. Effect of postharvest methyl jasmonate treatment on early-matured "hass" avocado fruit exocarp colour development during ripening. Agric Sci. 2021;12(8):875–87.
129. Bertling I, Tesfay SZ, Bower JP. Antioxidants in "Hass" avocado. South African Avocado Grow Assoc Yearb. 2007;30:17–9.
130. Salmerón MLR. Fracción indigestible, bioaccesibilidad *in vitro* y actividad antioxidante de compuestos fenólicos de cáscara de aguacate CV. "Hass." Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.; 2014.
131. Alkhalaf MI, Alansari WS, Ibrahim EA, ELhalwagy MEA. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. J King Saud Univ - Sci. 2019;31(4):1358–62.
132. Barrera López RE, Arrubla Vélez JP. Análisis de fitoesteroles en la semilla de *Persea americana* miller (var. Lorena) por cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. Rev Fac Ciencias Básicas. 2017;13(1):35–41.
133. Gobierno de México. Información Estadística Cáncer de Mama | Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva [Internet]. 2016 [cited 2019 Aug 28]. Available from: https://www.gob.mx/salud%7Ccnegsr/acciones-y-programas/informacion-estadistica-cancer-de-mama
134. Spandidos DA, Dokianakis DN, Kallergi G, Aggelakis E. Molecular basis of gynecological cancer. Ann N Y Acad Sci. 2006;900(1):56–64.
135. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. Cancer. 2017;123(13):2404–12.
136. Zappacosta R, Rosini S. Cervical cancer screening: From molecular basis to diagnostic

practice, going through new technologies. Technol Cancer Res Treat. 2008;7(3):161–74.

137. López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. Cancerol 1. 2006;31–55.

138. Dabas D, Elias RJ, Ziegler GR, Lambert JD. *In vitro* antioxidant and cancer inhibitory activity of a colored avocado seed extract. Int J Food Sci. 2019;2019:6509421.

139. Vo TS, Le Uyen P, Ngo DH. Free radical scavenging and anti-proliferative activities of avocado (*Persea americana* Mill.) seed extract. Asian Pac J Trop Biomed. 2019;9(3):91–7.

140. Widiyastuti Y, Pratiwi R, Riyanto S, Wahyuono S. Cytotoxic activity and apoptosis induction of avocado *Persea americana* Mill. seed extract on MCF-7 cancer cell line. Indones J Biotechnol. 2018;23(2):61–7.

141. Rodríguez-Martínez B, Ferreira-Santos P, Gullón B, Teixeira JA, Botelho CM, Yáñez R. Exploiting the potential of bioactive molecules extracted by ultrasounds from avocado peels-food and nutraceutical applications. Antioxidants. 2021;10(9).

142. Martínez-Cruz N del S, Arévalo-Niño K, Verde-Star MJ, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Núñez-González MA, et al. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). Rev Mex Ciencias Farm. 2005;42(4):66–71.

143. Valadez-Vega MDC, Izquierdo-Vega JA, Sanchez-Gutierrez M, Villagomez-Ibarra JR, Madrigal Santillan EO, Morales-Gonzalez JA, et al. Assessments of antioxidant content and the anti-carcinogenic effect of extracts of *Solanum rostratum* dunal in human cancer cells. Acta Pol Pharm - Drug Res. 2019;76(3):493–502.

144. Girón MC. Determinación semi cuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. UNAM; 1992.

145. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956;28(3):350–6.

146. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999;26(9–10):1231–7.

147. Sirivibulkovit K, Nouanthavong S, Sameenoi Y. Paper-based DPPH Assay for

Antioxidant Activity Analysis. Anal Sci. 2018;34(7):795–800.

148. Tramer F, Da Ros T, Passamonti S. Screening of fullerene toxicity by hemolysis assay. In: Reineke J, editor. Nanotoxicity Méthods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 203–17.

149. American Type Culture Collection (ATCC). MDA-MB-231 ATCC ® CRM-HTB-26™ [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 28]. Available from: https://www.atcc.org/products/all/CRM-HTB-26.aspx#generalinformation

150. American Type Culture Collection (ATCC). SiHa ATCC ® HTB-35™ [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 28]. Available from: https://www.atcc.org/products/all/HTB-35.aspx#generalinformation

151. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods. 1989;119(2):203–10.

152. Noorul N, Mujahid M, Badruddeen, Khalid M, Vartika S, Nesar A, et al. Physico-phytochemical analysis & estimation of total phenolic, flavonoids and proanthocyanidin content of *Persea americana* (avocado) seed extracts. World J Pharm Sci. 2017;5(4):70–70.

153. Lee SG, Yu M hee, Lee S, Lee I. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008;37(3):269–75.

154. Ramírez Contreras JM, Mariezcurrena Berasain MD, Pinzón Martínez DL, Archundia Velarde ED, Roque Otero AM. Ethanol and aqueous extracts characterization from guava (*Psidium guajava* L.) and avocado (*Persea americana* Mill.) residues. Food Sci Technol. 2020;41(3):596–602.

155. Kamaraj M, Dhana Rangesh Kumar V, Nithya TG, Danya U. Assessment of antioxidant, antibacterial activity and phytoactive compounds of aqueous extracts of avocado fruit peel from Ethiopia. Int J Pept Res Ther. 2019;26(3):1549–57.

156. Lister INE, Amiruddin HL, Fachrial E, Girsang E. Anti-aging effectiveness of avocado peel extract ointment (*Persea americana* Mill.) against hydration, collagen, and elasticity levels in wistar rat. J Pharm Res Int. 2021;33(32B):173–84.

157. Zavala-Guerrero BM. Determinación del efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiartrítico del aceite de semilla de aguacate mexicano (*Persea americana* var.

drymifolia). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2020.

158. Alagbaoso CA, Osakwe OS, Tokunbo II. Changes in proximate and phytochemical compositions of *Persea americana* Mill. (avocado pear) seeds associated with ripening. J Med Biomed Res. 2018;16(1):28–34.

159. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food Nutr Res. 2017;61(1):1361779.

160. García-Cruz L, Salinas-Moreno Y, Valle-Guadarrama S. Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). Rev Fitotec Mex. 2012;35(SPE5):01–5.

161. Rocchetti G, Tomas M, Zhang L, Zengin G, Lucini L, Capanoglu E. Red beet (*Beta vulgaris*) and amaranth (*Amaranthus* sp.) microgreens: Effect of storage and *in vitro* gastrointestinal digestion on the untargeted metabolomic profile. Food Chem. 2020;332:127415.

162. Vargas-Campos L, Valle-Guadarrama S, Martínez-Bustos F, Salinas-Moreno Y, Lobato-Calleros C, Calvo-López AD. Encapsulation and pigmenting potential of betalains of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit. J Food Sci Technol. 2018;55(7):2436–45.

163. Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F. Biological activities of plant pigments betalains. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56(6):937–45.

164. Ezejiofor AN, Okorie A, Ebere O. Hypoglycaemic and tissue-protective effects of the aqueous extract of *Persea americana* seeds on alloxan-induced albino rats. Malays J Med Sci. 2013;20(3):31–9.

165. Oboh G, Odubanjo VO, Bello F, Ademosun AO, Oyeleye SI, Nwanna EE, et al. Aqueous extracts of avocado pear (*Persea americana* Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities *in vitro*. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2016;27(2):131–40.

166. Torres RC, Garbo AG, Walde RZML. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. Asian Pac J Trop Med. 2014;7(S1):S167–70.

167. Ernawati, Sari K. Kandungan senwaya kimia dan aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana* P.Mill) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*. J Kaji

Vet. 2015;3(2):203–11.

168. Valadez-Vega C, Lugo-Magaña O, Morales-González JA, Delgado-Olivares L, Izquierdo-Vega JA, Sánchez-Gutiérrez M, et al. Phytochemical, cytotoxic, and genotoxic evaluation of protein extract of *Amaranthus hypochondriacus* seeds. CyTA - J Food. 2021;19(1):701–9.

169. Martysiak-Zurowska D, Wenta W. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. Acta Sci Pol Technol Aliment. 2012;11(1):83–9.

170. Foti MC. Antioxidant properties of phenols. J Pharm Pharmacol. 2007;59(12):1673–85.

171. González E, Vaillant F, Pérez A. *In vitro* cell-mediated antioxidant protection of human erythrocytes by some common tropical fruits. J Nutr Food Sci. 2012;2(3):139.

172. Nicolella HD, Neto FR, Corrêa MB, Lopes DH, Rondon EN, dos Santos LFR, et al. Toxicogenetic study of *Persea americana* fruit pulp oil and its effect on genomic instability. Food Chem Toxicol. 2017;101:114–20.

173. Villa-Rodriguez JA, Yahia EM, González-León A, Ifie I, Robles-Zepeda RE, Domínguez-Avila JA, et al. Ripening of "Hass" avocado mesocarp alters its phytochemical profile and the *in vitro* cytotoxic activity of its methanolic extracts. South African J Bot. 2020;128:1–8.

174. Ding H, Han C, Guo D, Chin YW, Ding Y, Kinghorn AD, et al. Selective induction of apoptosis of human oral cancer cell lines by avocado extracts via a ROS-mediated mechanism. Nutr Cancer. 2009;61(3):348–56.

175. Kulkarni P, Paul R, Ganesh N. *In vitro* evaluation of genotoxicity of avocado (*Persea americana*) fruit and leaf extracts in human peripheral lymphocytes. J Environ Sci Heal. 2010;28(3):172–87.

176. Bissinger R, Modicano P, Alzoubi K, Honisch S, Faggio C, Abed M, et al. Effect of saponin on erythrocytes. Int J Hematol. 2014;100(1):51–9.

177. Guzmán-Rodríguez JJ, López-Gómez R, Salgado-Garciglia R, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. Biomed Pharmacother. 2016;82:620–7.

178. Flores-Álvarez LJ, Guzmán-Rodríguez JJ, López-Gómez R, Salgado-Garciglia R, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. Int J Biochem Cell Biol. 2018;99:10–8.
179. Jiménez-Alcántar P, López-Gómez R, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), a plant antimicrobial peptide, triggers apoptosis, and induces global epigenetic modifications on histone 3 in an acute lymphoid leukemia cell line. Front Mol Biosci. 2022;9.
180. Wahle KWJ, Brown I, Rotondo D, Heys SD. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. Adv Exp Med Biol. 2010;698:36–51.
181. Rajasekar N, Sivanantham A, Ravikumar V, Rajasekaran S. An overview on the role of plant-derived tannins for the treatment of lung cancer. Phytochemistry. 2021;188.
182. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: Occurrence, dietary intake and pharmacological effects. Br J Pharmacol. 2017;174(11):1244–62.
183. Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula S V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutr J. 2016;15(1):1–16.
184. Xie Z, Guo Z, Wang Y, Lei J, Yu J. Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. Phyther Res. 2018;32(11):2256–63.
185. Changizi Z, Moslehi A, Rohani AH, Eidi A. Chlorogenic acid inhibits growth of 4T1 breast cancer cells through involvement in Bax/Bcl2 pathway. J Cancer Res Ther. 2020;16(6):1435–42.
186. Wang ZX, Ma J, Li XY, Wu Y, Shi H, Chen Y, et al. Quercetin induces p53-independent cancer cell death through lysosome activation by the transcription factor EB and reactive oxygen species-dependent ferroptosis. Br J Pharmacol. 2021;178(5):1133–48.
187. Pereyra-Vergara F, Olivares-Corichi IM, Perez-Ruiz AG, Luna-Arias JP, García-Sánchez JR. Apoptosis induced by (-)-epicatechin in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species. Molecules. 2020;25(5).
188. García-Sols P, Yahia EM, Morales-Tlalpan V, Díaz-Muñoz M. Screening of

antiproliferative effect of aqueous extracts of plant foods consumed in Mexico on the breast cancer cell line MCF-7. Int J Food Sci Nutr. 2009;60(Suppl 6):32–46.

189. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15(10):7313–52.

190. Bonilla-Porras AR, Salazar-Ospina A, Jimenez-Del-Rio M, Pereañez-Jimenez A, Velez-Pardo C. Pro-apoptotic effect of *Persea americana* var. Hass (avocado) on Jurkat lymphoblastic leukemia cells. Pharm Biol. 2013;52(4):458–65.

191. Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the hallmarks of cancer. Cancer Cell. 2018;34(1):21–43.

192. Fainstein K, Fainstein MK. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. Rev Educ Bioquímica. 2007;26(1):18–25.

193. Probst BL, McCauley L, Trevino I, Wigley WC, Ferguson DA. Cancer cell crowth is differentially affected by constitutive cctivation of NRF2 by KEAP1 deletion and pharmacological activation of NRF2 by the synthetic triterpenoid, RTA 405. PLoS One. 2015;10(8).

194. Sajadimajd S, Khazaei M. Oxidative stress and cancer: The role of Nrf2. Curr Cancer Drug Targets. 2017;18(6):538–57.

195. Liu B, Li B, Zhou D, Wen X, Wang Y, Chen G, et al. Steroidal saponins with cytotoxic effects from the rhizomes of *Asparagus cochinchinensis*. Bioorg Chem. 2021;115:105237.

196. Meng FC, Wei XD, Sun Y, Zeng QH, Wang G, Lan XZ, et al. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Thalictrum atriplex*. Nat Prod Res. 2021;35(24):5757–64.

197. Singh S, Verma M, Malhotra M, Prakash S, Singh TD. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Argemone mexicana* on SW480 human colon cancer cell line. Pharm Biol. 2016;54(4):740–5.

198. Payon V, Kongsaden C, Ketchart W, Mutirangura A, Wonganan P. Mechanism of cepharanthine cytotoxicity in human ovarian cancer cells. Planta Med. 2019;85(1):41–7.

199. Cevatemre B, Erkısa M, Aztopal N, Karakas D, Alper P, Tsimplouli C, et al. A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells *in vitro* and xenografts *in vivo* through apoptosis and an incomplete

autopaghy in breast cancer. Pharmacol Res. 2018;129:500–14.

200. Martucciello S, Paolella G, Muzashvili T, Skhirtladze A, Pizza C, Caputo I, et al. Steroids from *Helleborus caucasicus* reduce cancer cell viability inducing apoptosis and GRP78 down-regulation. Chem Biol Interact. 2018;279:43–50.

XIII. ANEXOS

13.1. Dictamen del Comité de Ética

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Coordinación de Investigación
Area of Research

San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo a 15 de octubre de 2021
Oficio Comiteei.icsa *9/2021*
Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN.

VELAZQUEZ MORALES BELINDA
Investigador Principal
Correo electrónico l.n.belindavelmor@gmail.com
PRESENTE

Título del Proyecto: Efecto anticarcinogénico de los extractos de semilla y cáscara de dos variedades de Persea mexicano (Hass y criollo) sobre líneas celulares de mama y cérvix

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto de Ciencias de la Salud y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

Decisión
Aprobado

Este protocolo tiene vigencia del 10 de octubre del 2021 al 10 de octubre del 2022.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso de avance de su proyecto al menos 60 días antes de la fecha de término de su vigencia.

Le rogamos atender las indicaciones realizadas por el revisor, y enviar nuevamente una versión corregida de su protocolo para una nueva evaluación.

Atentamente

Dra. María del Refugio Acuña Gurrola
Presidenta del Comité

Para la validación de este documento, informe el siguiente código en la sección Validador de documentos del sitio web del Comité de Ética e Investigación del Instituto de Ciencias de la Salud: z7-v55uQ-J
https://sites.google.com/view/comiteei-icsa/validador-de-documentos

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n
Carretera Pachuca Actopan, San Agustín
Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4306
investigacion_icsa@uaeh.edu.mx

13.2. Consentimientos informados firmados

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, ALELÍ JULIETA IZQUIERDO VEGA manifiesto que se me ha informado la naturaleza del estudio **Efecto anticarcinogénico de los extractos de semilla y cáscara de dos variedades de Persea mexicano (Hass y criollo) sobre líneas celulares de mama y cérvix,** he leído y comprendido la información del proyecto y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, y doy voluntariamente mi consentimiento para donar muestras de sangre durante el periodo que dura la investigación. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

ALELÍ JULIETA IZQUIERDO VEGA — 7-ABRIL-2021
Nombre y firma del participante — Fecha

PATRICIA MORALES PATIÑO — 7-ABRIL-2021
Nombre y firma del testigo 1 — Fecha

Dante Valadez Gutiérrez — 7-ABRIL-2021
Nombre y firma del testigo 2 — Fecha

He explicado al Sr(a). Alelí Julieta Izquierdo Vega la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Belinda Patricia Velázquez Morales — 07/Abr/2021
Nombre y firma del investigador — Fecha

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308.2361.4346.4310
medicina@uaeh.edu.mx
www.uaeh.edu.mx

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, ALELÍ JULIETA IZQUIERDO VEGA manifiesto que se me ha informado la naturaleza del estudio **Efecto anticarcinogénico de los extractos de semilla y cáscara de dos variedades de Persea mexicano (Hass y criollo) sobre líneas celulares de mama y cérvix,** he leído y comprendido la información del proyecto y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, y doy voluntariamente mi consentimiento para donar muestras de sangre durante el periodo que dura la investigación. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

ALELÍ JULIETA IZQUIERDO VEGA — 28-ABRIL-2021

Nombre y firma del participante — Fecha

Dante Valadez Gutiérrez — 28-ABRIL-2021

Nombre y firma del testigo 1 — Fecha

PATRICIA MORALES PATHAN — 28-ABRIL-2021

Nombre y firma del testigo 2 — Fecha

He explicado al Sr(a). Aleli Julieta Izquierdo Vega la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Belinda Patricia Velázquez Morales — 28/Abr/2021

Nombre y firma del investigador — Fecha

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308,2361,4346,4310
medicina@uaeh.edu.mx
www.uaeh.edu.mx

13.3. Análisis estadísticos de los ensayos biológicos

Anexo 12.3.1. Análisis estadístico del ensayo de actividad hemolítica causada por los extractos de aguacate Hass y criollo

	% de hemólisis					
Extracto	**100 (µg/mL)**	**200 (µg/mL)**	**400 (µg/mL)**	**600 (µg/mL)**	**800 (µg/mL)**	**1000 (µg/mL)**
CHM	$8.85\pm0.81^{a}_{u}$	$17.31\pm0.21^{a}_{v}$	$33.73\pm3.05^{a}_{w}$	$52.58\pm0.34^{a}_{x}$	$64.86\pm0.42^{a}_{y}$	$73.24\pm1.48^{a}_{z}$
CHA	$4.73\pm0.65^{b}_{u}$	$11.97\pm0.11^{b}_{v}$	$22.68\pm0.46^{bd}_{w}$	$31.82\pm0.88^{b}_{x}$	$41.78\pm1.16^{b}_{y}$	$47.96\pm0.26^{b}_{z}$
SHM	$1.41\pm0.24^{c}_{u}$	$5.60\pm0.24^{c}_{v}$	$7.83\pm0.33^{c}_{w}$	$10.46\pm0.49^{c}_{x}$	$11.60\pm1.59^{c}_{x}$	$11.81\pm0.89^{c}_{x}$
SHA	$9.83\pm0.29^{d}_{u}$	$15.10\pm2.53^{d}_{v}$	$24.65\pm0.22^{d}_{w}$	$32.50\pm0.91^{b}_{x}$	$39.80\pm1.00^{d}_{y}$	$41.30\pm0.53^{d}_{y}$
CCM	$15.33\pm0.73^{e}_{u}$	$26.11\pm0.66^{e}_{v}$	$46.35\pm0.84^{e}_{w}$	$61.28\pm0.97^{d}_{x}$	$72.90\pm0.64^{e}_{y}$	$81.43\pm0.21^{e}_{z}$
CCA	$10.83\pm0.61^{f}_{u}$	$17.13\pm0.35^{a}_{v}$	$30.93\pm0.40^{f}_{w}$	$43.35\pm1.07^{e}_{x}$	$53.23\pm0.96^{f}_{y}$	$63.06\pm0.12^{f}_{z}$
SCM	$7.15\pm0.46^{g}_{u}$	$12.72\pm0.45^{b}_{v}$	$21.79\pm1.80^{b}_{w}$	$30.34\pm0.45^{f}_{x}$	$38.89\pm0.53^{d}_{y}$	$44.34\pm1.04^{g}_{z}$
SCA	$5.42\pm0.16^{b}_{u}$	$8.24\pm0.64^{f}_{v}$	$12.72\pm0.88^{g}_{w}$	$17.01\pm0.41^{g}_{x}$	$19.90\pm0.21^{g}_{y}$	$23.83\pm0.66^{h}_{z}$

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol, CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo, SHM = semilla de aguacate Hass en metanol, SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo, CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol, CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo, SCM = semilla de aguacate criollo en metanol y SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e, f, g, h en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos y las letras u, v, w, x, y, z en subíndice diferencias entre concentraciones, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.2. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto CHM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
100	$97.55\pm1.43^{b}_{x}$	$86.40\pm1.25^{b}_{y}$	$74.59\pm1.11^{b}_{z}$
250	$27.89\pm1.50^{c}_{x}$	$20.63\pm0.59^{c}_{y}$	$15.12\pm1.61^{c}_{z}$
300	$32.45\pm1.38^{d}_{x}$	$21.91\pm0.84^{c}_{y}$	$17.12\pm0.68^{c}_{z}$
500	$41.71\pm0.41^{e}_{x}$	$29.23\pm1.15^{d}_{y}$	$22.78\pm1.84^{d}_{z}$

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.3. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto CHA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
250	$79.87\pm1.86^{b}_{x}$	$68.73\pm1.11^{b}_{y}$	$46.55\pm1.94^{b}_{z}$
375	$57.19\pm1.06^{c}_{x}$	$26.26\pm1.90^{c}_{y}$	$8.65\pm0.45^{c}_{z}$
500	$42.04\pm1.64^{d}_{x}$	$16.64\pm1.78^{d}_{y}$	$7.88\pm0.28^{c}_{z}$
750	$22.70\pm1.44^{e}_{x}$	$15.59\pm1.47^{d}_{y}$	$7.34\pm0.14^{c}_{z}$

CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.4. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto SHM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
10	$104.11\pm2.10^{a}_{x}$	$112.28\pm3.59^{b}_{y}$	$119.88\pm2.93^{b}_{z}$
50	$115.09\pm4.03^{b}_{x}$	$127.13\pm2.15^{c}_{y}$	$133.73\pm2.94^{c}_{z}$
100	$130.52\pm2.39^{c}_{x}$	$139.17\pm4.74^{d}_{y}$	$143.00\pm3.43^{d}_{z}$
250	$140.56\pm3.50^{d}_{x}$	$152.39\pm3.41^{e}_{y}$	$162.80\pm3.82^{e}_{z}$

SHM = semilla de aguacate Hass en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.5. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto SHA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
50	$77.27\pm1.35^{b}_{x}$	$52.76\pm0.40^{b}_{y}$	$46.06\pm1.64^{b}_{z}$
75	$67.60\pm1.05^{c}_{x}$	$48.08\pm1.42^{c}_{y}$	$8.76\pm1.46^{c}_{z}$
100	$60.01\pm1.18^{d}_{x}$	$26.80\pm0.75^{d}_{y}$	$7.05\pm0.36^{cd}_{z}$
250	$24.40\pm1.16^{e}_{x}$	$11.03\pm0.85^{e}_{y}$	$6.51\pm0.65^{d}_{z}$

SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.6. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto CCM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
10	$99.05\pm0.60^{a}_{x}$	$97.27\pm1.18^{b}_{y}$	$92.42\pm0.49^{b}_{z}$
50	$89.07\pm1.40^{b}_{x}$	$58.87\pm1.37^{c}_{y}$	$32.91\pm1.57^{c}_{z}$
75	$69.57\pm1.00^{c}_{x}$	$41.54\pm1.12^{d}_{y}$	$8.26\pm0.30^{d}_{z}$
100	$53.11\pm1.19^{d}_{x}$	$19.37\pm1.03^{e}_{y}$	$7.54\pm0.19^{d}_{z}$

CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.7. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto CCA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
10	$99.18\pm0.22^{a}_{x}$	$98.10\pm1.21^{a}_{x}$	$92.37\pm1.28^{b}_{z}$
50	$83.02\pm1.20^{b}_{x}$	$67.64\pm0.84^{b}_{y}$	$49.76\pm1.21^{c}_{z}$
100	$68.75\pm1.17^{c}_{x}$	$45.59\pm1.86^{c}_{y}$	$7.52\pm0.38^{d}_{z}$
250	$24.94\pm1.43^{d}_{x}$	$12.42\pm0.32^{d}_{y}$	$6.84\pm0.41^{d}_{z}$

CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.8. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto SCM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
50	$94.03\pm0.44^{b}_{x}$	$87.27\pm0.95^{b}_{y}$	$74.91\pm1.20^{b}_{z}$
100	$83.48\pm1.05^{c}_{x}$	$76.29\pm0.36^{c}_{y}$	$12.01\pm1.23^{c}_{z}$
250	$41.42\pm1.39^{d}_{x}$	$29.95\pm0.95^{d}_{y}$	$17.82\pm1.09^{d}_{z}$
500	$58.69\pm1.36^{e}_{x}$	$52.56\pm1.34^{e}_{y}$	$31.31\pm1.05^{e}_{z}$

SCM = semilla de aguacate criollo en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.9. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células SiHa tratadas con el extracto SCA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
50	$77.47\pm1.00^{b}_{x}$	$53.08\pm1.65^{b}_{y}$	$19.67\pm0.54^{b}_{z}$
75	$67.60\pm0.97^{c}_{x}$	$35.99\pm1.53^{c}_{y}$	$7.04\pm0.44^{c}_{z}$
100	$57.00\pm1.28^{d}_{x}$	$13.07\pm1.48^{d}_{y}$	$6.68\pm0.32^{c}_{z}$
250	$24.63\pm1.45^{e}_{x}$	$11.30\pm1.56^{d}_{y}$	$5.82\pm0.43^{d}_{z}$

SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.10. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto CHM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
50	$66.96\pm1.29^{b}_{x}$	$58.31\pm1.00^{b}_{y}$	$31.50\pm0.75^{b}_{z}$
100	$37.58\pm1.52^{c}_{x}$	$25.02\pm0.56^{c}_{y}$	$16.50\pm0.83^{c}_{z}$
250	$47.59\pm1.16^{d}_{x}$	$35.97\pm1.58^{d}_{y}$	$21.86\pm1.32^{d}_{z}$
500	$57.44\pm1.72^{e}_{x}$	$51.07\pm1.98^{e}_{y}$	$28.83\pm0.33^{e}_{z}$

CHM = cáscara de aguacate Hass en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.11. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto CHA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
100	$76.83\pm1.16^{b}_{x}$	$70.53\pm1.29^{b}_{y}$	$61.24\pm2.04^{b}_{z}$
250	$38.62\pm0.60^{c}_{x}$	$30.41\pm0.93^{c}_{y}$	$14.24\pm1.37^{c}_{z}$
500	$30.19\pm1.34^{d}_{x}$	$23.30\pm0.68^{d}_{y}$	$11.41\pm1.31^{d}_{z}$
750	$24.78\pm1.08^{e}_{x}$	$19.40\pm1.61^{e}_{y}$	$9.88\pm1.23^{d}_{z}$

CHA = cáscara de aguacate Hass en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.12. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto SHM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
10	$104.45\pm2.16^{a}_{x}$	$116.61\pm3.71^{b}_{y}$	$122.48\pm4.58^{b}_{y}$
50	$111.58\pm2.05^{b}_{x}$	$145.11\pm5.60^{c}_{y}$	$158.10\pm5.02^{c}_{z}$
100	$127.42\pm2.97^{c}_{x}$	$159.07\pm2.79^{d}_{y}$	$191.37\pm4.00^{d}_{z}$
250	$147.03\pm5.64^{d}_{x}$	$194.62\pm4.56^{e}_{y}$	$214.13\pm5.35^{e}_{z}$

SHM = semilla de aguacate Hass en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.13. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto SHA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
10	$98.94\pm0.40^{a}_{x}$	$96.67\pm0.80^{b}_{y}$	$95.59\pm1.30^{b}_{y}$
50	$88.16\pm1.26^{b}_{x}$	$82.38\pm0.79^{c}_{y}$	$71.70\pm1.73^{c}_{z}$
100	$57.29\pm1.73^{c}_{x}$	$40.84\pm1.42^{d}_{y}$	$10.45\pm1.14^{d}_{z}$
250	$21.64\pm1.14^{d}_{x}$	$17.21\pm1.34^{e}_{y}$	$9.16\pm0.77^{d}_{z}$

SHA = semilla de aguacate Hass en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.14. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto CCM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
10	$98.57\pm1.35^{a}_{x}$	$96.62\pm0.89^{b}_{x}$	$91.43\pm1.94^{b}_{y}$
50	$85.76\pm1.13^{b}_{x}$	$69.12\pm1.51^{c}_{y}$	$43.46\pm1.64^{c}_{z}$
100	$61.24\pm0.88^{c}_{x}$	$44.16\pm1.87^{d}_{y}$	$8.84\pm0.81^{d}_{z}$
250	$33.02\pm1.57^{d}_{x}$	$14.28\pm0.35^{e}_{y}$	$7.41\pm0.84^{d}_{z}$

CCM = cáscara de aguacate criollo en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.15. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto CCA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
50	$83.40\pm1.58^{b}_{x}$	$79.03\pm1.20^{b}_{y}$	$66.95\pm1.55^{b}_{z}$
100	$44.02\pm1.82^{c}_{x}$	$31.93\pm1.42^{c}_{y}$	$17.39\pm2.14^{c}_{z}$
250	$28.63\pm1.27^{d}_{x}$	$25.17\pm1.46^{d}_{y}$	$12.58\pm0.66^{d}_{z}$
500	$19.22\pm1.63^{e}_{x}$	$16.16\pm0.21^{e}_{y}$	$11.46\pm0.59^{d}_{z}$

CCA = cáscara de aguacate criollo en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.16. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto SCM

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
50	$98.69\pm0.53^{a}_{x}$	$96.28\pm0.37^{b}_{y}$	$92.51\pm1.63^{b}_{z}$
100	$89.78\pm0.91^{b}_{x}$	$83.20\pm1.46^{c}_{y}$	$58.52\pm1.46^{c}_{z}$
250	$44.16\pm1.32^{c}_{x}$	$39.23\pm2.07^{d}_{y}$	$27.79\pm1.49^{d}_{z}$
500	$84.83\pm1.55^{d}_{x}$	$71.73\pm1.42^{e}_{y}$	$63.39\pm1.68^{e}_{z}$

SCM = semilla de aguacate criollo en metanol. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).

Anexo 12.3.17. Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad sobre las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto SCA

Concentración (µg/mL)	% de viabilidad celular		
	24 h	48 h	72 h
0	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$	$100.00\pm0.00^{a}_{x}$
50	$91.74\pm0.81^{b}_{x}$	$86.17\pm0.96^{b}_{y}$	$80.16\pm1.32^{b}_{z}$
100	$67.59\pm1.15^{c}_{x}$	$52.82\pm1.85^{c}_{y}$	$10.25\pm1.34^{c}_{z}$
250	$27.46\pm1.20^{d}_{x}$	$22.81\pm1.64^{d}_{y}$	$9.12\pm1.36^{cd}_{z}$
500	$19.97\pm0.53^{e}_{x}$	$16.83\pm1.45^{e}_{y}$	$8.02\pm1.29^{d}_{z}$

SCA = semilla de aguacate criollo en acetato de etilo. Las letras a, b, c, d, e en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y las letras x, y, z en subíndice denotan diferencias entre los tiempos para cada concentración, halladas en pruebas post hoc de Tukey ($p<0.05$). Los valores representan la media de tres repeticiones independientes $\pm$ desviación estándar (DE).