

CAPACIDAD ANTIBACTERIAL DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE
AGUACATE (*Persea americana* var. *Hass*) SOBRE *Helicobacter pylori*.

VICTOR JAVIER MARTINEZ COLLAZOS

SEPTIEMBRE 2019

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

TRABAJO DE GRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS

CON ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS

CAPACIDAD ANTIBACTERIAL DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE
AGUACATE (*Persea americana* var. *Hass*) SOBRE *Helicobacter pylori*.

VICTOR JAVIER MARTINEZ COLLAZOS

PRESIDENTE DE TESIS:

ALVARO PAZOS MONCAYO, PhD

SEPTIEMBRE 2019

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
TRABAJO DE GRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
CON ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores” Artículo 1ro N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable

Consejo Superior de la Universidad de Nariño

NOTA DE ACEPTACIÓN

FIRMA DEL JURADO DELEGADO

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez

FIRMA DEL JURADO EVALUADOR

Henry Jurado Gámez

FIRMA DEL JURADO EVALUADOR

Tulio Cesar Lagos

San Juan de Pasto, Septiembre de 2019

Esta investigación se fue acogida por la RED NACIONAL PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE FRUTAS TROPICALES, con financiamiento de COLCIENCIAS, dentro del proyecto No. 3 “Caracterización metabólica, de la actividad biológica y funcional de especies frutales tropicales (*Pasiflora spp*, Aguacate, Tomate de Árbol y Lulo)” Contrato No. 0459-2013 con código 550854332012, suscrito entre la Universidad de Nariño y la Universidad Nacional de Colombia

...Dedicado mis padres, mis hermanas, mi abuela y mi abuelo (QEPD) por ser mi soporte y la motivación que requiero para asumir cualquier reto y culminarlo de la mejor manera en aras de siempre enorgullecerlos

AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS por la financiación del proyecto a través de la Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-Rifrutbio,

A la Universidad de Nariño, a la Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en producción de cultivos y a todos sus profesores por la educación y formación que me brindaron en estos años,

A mi presidente de tesis Álvaro Pazos Moncayo por el apoyo y conocimiento brindado en esta etapa de mi educación,

A mis jurados Nelson Hurtado, Henry Jurado y Tulio Lagos, por evaluar y contribuir con su conocimiento a esta investigación,

A los grupos de investigación GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA (GIPIB) y TECNOLOGÍAS EMERGENTES EN AGROINDUSTRIA (TEA) por su colaboración en el préstamo de equipos para el desarrollo experimental de esta investigación,

A Camilo, Paula Erazo, Tannya, Viviana, Fernanda, Paula Torres y Juan David por su colaboración en la etapa experimental de esta investigación y a todos mis compañeros y futuros magister quienes me acompañaron durante esta extraordinaria etapa de estudio,

RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad crónica a nivel mundial y es la principal causa de muerte por cáncer en Colombia, con una incidencia de las más altas del mundo en la región Andina de Nariño. La infección por *Helicobacter pylori* es el principal factor de riesgo de la enfermedad. Sin embargo, los esquemas convencionales no han sido lo suficientemente efectivos, ya que el fracaso terapéutico de los tratamientos de primera línea a base de claritromicina, amoxicilina y un inhibidor de bomba de protones supera el 30 % de los casos, razón por la cual se busca alternativas que coadyuven los tratamientos actuales. Se ha documentado que polifenoles del aguacate poseen características antioxidativas importantes, las cuales podrían interferir en la colonización o en mecanismos de señalización o regulación celular del crecimiento de *H. pylori*. Por tanto, el interés científico de esta investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de los extractos polifenólicos obtenidos de epicarpio y semilla del aguacate (*Persea americana* var. *Hass*) frente al crecimiento de *H. pylori*. Para probar nuestra hipótesis los extractos fueron obtenidos de aguacates cultivados en el Tambo – Nariño, para lo cual, inicialmente se hizo una maceración química para la obtención de extractos crudos tanto de epicarpio como de semilla del aguacate, de los cuales una parte fue purificada por cromatografía en columna, usando como soporte sólido Amberlita XAD-7 y finalmente se fraccionó el extracto purificado que mejores resultados presentó frente a la inhibición de la bacteria, haciendo uso de la cromatografía de exclusión por tamaño por medio de la resina Sephadex LH-20. Una vez obtenidos los extractos, se aisló la bacteria de cinco biopsias de pacientes con afecciones gástricas del departamento de Nariño, de las cuales cuatro fueron usadas en los ensayos antagónicos de los extractos crudos y purificados y una biopsia para los ensayos con las fracciones. Para llevar a cabo

estos ensayos de inhibición de los extractos sobre el crecimiento de *H. pylori*, se utilizó la prueba de dilución en agar, donde se inoculó la bacteria en siembra masiva en medios de cultivo con agar Muller Hinton, más sangre de cordero, suplemento isovitalex y el respectivo volumen de cada extracto para obtener concentraciones finales de 6000 ppm, 3000 ppm, 1500 ppm, 750 ppm y 375 ppm, realizando el proceso por cuadruplicado, tras un periodo de 7 a 12 días se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), se tabularon los datos y se aplicaron los respectivos análisis estadísticos. Se inhibió el crecimiento de *H. pylori* en una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6000 ppm para extractos crudos y CMI de 3000 ppm para extractos purificados, siendo los extractos de semilla los que mejor resultados presentaron. Razón por la cual estos extractos fueron seleccionados para ser fraccionados haciendo uso de la resina Sephadex LH-20, obteniendo un total de tres fracciones mayoritarias, de las cuales solo dos fracciones (F2 y F3) contaron con el volumen mínimo requerido para realizar los ensayos antagónicos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) encontrada con las fracciones obtenidas de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre el crecimiento de *H. pylori* fue de 1500 ppm, menor a la CMI encontrada con los extractos crudos y purificados de la semilla ($P 0,000 < 0,05$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre fracciones polifenólicas de la semilla ($P 0,940 > 0,05$), dado que ambas fracciones fueron las más pesadas, lo cual, a su vez se relacionan con su actividad frente a *H. pylori*. Además, es muy probable que estas estén constituidas principalmente por procianidinas, las cuales poseen un efecto significativo en la desnaturalización de la enzima Ureasa producida por la bacteria, la enzima es esencial para la supervivencia de *H. pylori* cuando habita las paredes gástricas de un organismo. Se puede concluir que los extractos polifenólicos purificados del aguacate presentaron mayor capacidad inhibitoria de *H. pylori* que los extractos crudos, siendo los extractos de la semilla del aguacate los de mayor efecto inhibitorio

que los del epicarpio. La CMI encontrada con las fracciones obtenidas de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre el crecimiento de *H. pylori* fue menor a la CMI de los extractos crudos y purificados de la semilla.

PALABRAS CLAVES: Cáncer gástrico, *Helicobacter pylori*, extractos polifenólicos, *Persea americana*, CMI.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is a chronic disease worldwide and is the leading cause of cancer death in Colombia, with an incidence of the highest in the world in the Andean region of Nariño. *Helicobacter pylori* infection is the main risk factor for the disease. However, conventional schemes have not been effective enough, since the therapeutic failure of first-line treatments based on claritromycin amoxicillin and a proton pump inhibitor exceeds 30 % of cases, which is why it is sought alternatives that help current treatments. It has been documented that avocado polyphenols possess important antioxidant characteristics, which could interfere with colonization or signaling or cell regulation mechanisms of *H. pylori* growth. Therefore, the scientific interest of this research was aimed to evaluate the inhibitory capacity *in vitro* of polyphenolic extracts obtained from peel and avocado seed (*Persea americana* var. *Hass*) against *in vitro* growth of *H. pylori*. To test our hypothesis, the extracts were obtained from avocados grown in the Tambo - Nariño, for which, a chemical maceration was initially made to obtain raw extracts of both peel and avocado seed, which a part was purified by column chromatography, using Amberlita XAD-7 as a solid support and finally the purified extract was fractionated that showed the best results against bacterial inhibition, using size exclusion chromatography by means of the Sephadex LH-20 resin. Once the extracts were obtained, the bacterium was isolated from five biopsies of patients with gastric conditions of the department of Nariño, of which four were used in the antagonistic tests of the raw and purified extracts and a biopsy for the trials with the fractions. In order to carry out these inhibition tests of the extracts on the growth of *H. pylori*, the agar dilution test was used, where the bacteria were inoculated in mass seeding in culture media with Muller Hinton agar, plus lamb blood, isovitalex supplement and the respective volume of each extract to obtain final

concentrations of 6000 ppm, 3000 ppm, 1500 ppm, 750 ppm and 375 ppm, performing the process in quadruplicate, after a period of 7 to 12 days the colony forming Units (CFU) count was performed, the data and the respective statistical analyzes were applied. The results were satisfactory, the growth of *H. pylori* was inhibited at a minimum inhibitory concentration (MIC) of 6000 ppm for crude extracts and MIC of 3000 ppm for purified extracts, with seed extracts being the best results. Reason why these extracts were selected to be fractionated using the Sephadex LH-20 resin, obtaining a total of three major fractions, of which only two fractions (F2 and F3) had the minimum volume required to perform the tests antagonistic. The MIC found with the fractions obtained from purified extracts of the avocado seed on the growth of *H. pylori* was 1500 ppm, lower than the MIC found with the raw and purified extracts of the seed ($P 0.000 < 0.05$), however, no significant differences were found between the polyphenolic fractions of the seed ($P 0.940 > 0.05$), Since both fractions consist mainly of procyanidins, which have a significant effect on the denaturation of the Ureasa enzyme produced by the bacteria, the enzyme is essential for the survival of *H. pylori* when it inhabits the gastric walls of an organism. It can be concluded that the purified polyphenolic extracts of the avocado have a greater inhibitory capacity of *H. pylori* than the crude extracts, the water seed extracts being the greatest inhibitory effect than those of the peels. The MIC found with the fractions obtained from purified extracts of the avocado seed on the growth of *H. pylori* was lower than the MIC of the raw and purified extracts of the seed.

Key words: Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, polyphenolic extracts, *Persea americana*, MIC.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GENERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	4
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1. CÁNCER GÁSTRICO.....	5
3.1.1. Epidemiología del cáncer gástrico	5
3.1.2. Etiología: lesiones precursoras del cáncer gástrico.	6
3.2. GENERALIDADES DE <i>Helicobacter pylori</i>	6
3.2.1. Factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	7
3.2.2. Esquemas de tratamiento	10
3.3. AGUACATE.....	13
3.3.1. Origen y botánica.....	13
3.3.2. Condiciones agroambientales para el cultivo del aguacate.....	16
3.3.3. Producción mundial y situación del cultivo de Aguacate en Colombia y Nariño ..	19
3.4. USO DE BIOPROSPECCIÓN EN EL CONTROL DE <i>H. pylori</i>	20
3.5. POLIFENOLES	24
3.5.1. Origen, estructura y distribución.....	24
3.5.2. Propiedades terapéuticas de los polifenoles.....	26
3.5.3. Actividad biológica de los polifenoles.....	26
3.6. ANTECEDENTES.....	28
4. MATERIALES Y METODOS.....	31
4.1. Recolección de material vegetal.....	31
4.2. Objetivo específico 1: Extracción, purificación y fraccionamiento de los componentes polifenólicos de la semilla y epicarpio de aguacate (<i>P. americana</i> Var. <i>Has</i>)	33
4.2.1. Obtención de extractos crudos de aguacate	33
4.2.2. Purificación de los extractos crudos de aguacate.....	34
4.2.3. Obtención de fracciones polifenolicas del aguacate	35
4.3. Objetivo específico 2: Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) <i>in vitro</i> de los extractos crudos y los extractos ricos en polifenoles del epicarpio y semilla del aguacate (<i>P. americana</i> Var. <i>Hass</i>) sobre el crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	36

4.3.1.	Activación e identificación de los aislamientos de <i>Helicobacter pylori</i>	36
4.3.2.	Ensayos para detectar la CMI de cada extracto obtenidos de aguacate	41
4.4.	Objetivo específico 3: Determinar la mejor capacidad inhibitoria <i>in vitro</i> de <i>H. pylori</i> de las fracciones polifenolicas obtenidas del extracto de epicarpio o semilla del aguacate (<i>P. americana</i> var. <i>Hass</i>)	44
4.4.1.	Activación de la biopsia para aislamiento de <i>H. pylori</i>	44
4.4.2.	Detección de la CMI de cada fracción obtenida del extracto purificado de aguacate 44	
4.5.	Diseño experimental.....	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1.	Obtención de extractos de aguacate	48
5.2.	Activación e identificación aislados <i>H. pylori</i>	53
5.3.	Inhibición de extractos crudos y purificados de la semilla y epicarpio del aguacate <i>Hass</i> sobre <i>Helicobacter pylori</i>	57
5.4.	Fracciones polifenólicas de extractos purificados de semilla de aguacate sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>	65
6.	CONCLUSIONES.....	74
7.	RECOMENDACIONES	75
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos convencionales para el control de la infección por <i>H. pylori</i>	10
Tabla 2 Primers, Secuencias y Amplicon para PCR <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i>	39
Tabla 3. Mix de reacción para PCR del gen urea de <i>H. pylori</i>	40
Tabla 4. Concentraciones del medio de cultivo para las diluciones de los extractos polifenólicos de aguacate.	43
Tabla 5. Peso promedio de los frutos y porcentaje de semilla y epicarpio presente en cada uno.	49
Tabla 6. Peso liofilizado de los extractos crudos (EC) y purificados (EP) de semilla y epicarpio.	50
Tabla 7. Pesos obtenidos del fraccionamiento de extractos purificados de semilla.	52
Tabla 8. Biopsias elegidas para la realización de los ensayos antagónicos.	54
Tabla 9. Resultados macroscópicos y pruebas bioquímicas para <i>H. pylori</i>	55
Tabla 10. Cuantificación de ADN por espectrofotometría en NanoDrop-2000	56
Tabla 11. Análisis ANOVA de las variables independientes extractos y concentraciones de aguacate frente al crecimiento como variable dependiente.	58
Tabla 12. Suma de cuadrados para las variables tipo de extracto y concentración.	59
Tabla 13. Identificación de compuestos fenólicos de los EPS de aguacate var. <i>Hass</i> identificados por HPLC-MS	62
Tabla 14. Análisis ANOVA de las variables independientes fracciones y concentración frente al crecimiento como variable dependiente.	68
Tabla 15. Suma de cuadrados para las variables tipo de fracción y concentración.	69
Tabla 16. Componentes químicos de las fracciones 2 y 3 obtenidas de EPS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colecta de material vegetal.	32
Figura 2. Maduración de los frutos de aguacate.	32
Figura 3. Maceración química.	34
Figura 4. Perfiles UV-Vis de las tres fracciones mayoritarias obtenidas de los extractos purificados de semilla.	53
Figura 5. Electroforesis del gen estructural <i>UreA H. pylori</i>	57
Figura 6. Efecto inhibitorio de extractos polifenólicos crudos y purificados de la semilla y epicarpio del aguacate sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>	60
Figura 7. Efecto de extractos crudos y purificados de la semilla y epicarpio del aguacate sobre las medias de UFC de <i>H. pylori</i>	61
Figura 8. Concentración de fracciones polifenólicas de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>	66
Figura 9. Efecto inhibitorio de las fracciones polifenolicas 2 y 3 de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>	67
Figura 10. Efecto de las fracciones polifenolicas 2 y 3 de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre las medias de crecimiento en UFC de <i>H. pylori</i>	70

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Pruebas de identificación bioquímica	84
Anexo 2. Crecimiento microscópico de <i>H. pylori</i>	85
Anexo 3. Tabla de datos del conteo de UFC de los extractos crudos y purificados	86
Anexo 4. Tabla de datos del conteo de UFC de las fracciones obtenidas de los EPS.	90

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico (CG) es el cuarto cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer (782.685 muertes por año) a nivel mundial con una incidencia de 1.033.701 (5,7 %) (Bray, et al., 2018). Aunque existe una reducción en las tasas de mortalidad por este cáncer durante los últimos 30 años, el CG persiste como la primera causa de muerte por cáncer en Colombia generando el 13,7 % de muertes por cáncer en el país, afectando a más hombres (61,1 %) que a mujeres (Pardo, de Vries, Buitrago, & Gamboa, 2017).

En las zonas más altas de la cordillera de los Andes del departamento de Nariño, se reporta una incidencia de CG de 150 por 100.000 habitantes, en cuencas de ríos como el Guaitara se estimó en 40 por 100.000 habitantes y en la costa pacífica en 6 por 100.000 habitantes (Correa & Piazuolo, 2010). Estos reportes manifiestan que las tasas de incidencia de esta enfermedad en el departamento de Nariño son altas, lo que conduce a una problemática en salud importante para esta población.

El CG al igual que la mayoría de los cánceres, es una enfermedad multifactorial, asociada a alteraciones celulares y microambientales de la mucosa gástrica, en consecuencia, de una permanente inflamación producto de señales intracelulares causadas por proteínas citotóxicas propias de la bacteria *Helicobacter pylori* (Figueroa, Cortés, Pazos, & Bravo, 2012). Este microorganismo Gram negativo es uno de los cuatro agentes infecciosos que causan más cáncer en la población mundial, tanto así que en la década de los 90's esta bacteria se la clasificó como agente cancerígeno tipo I (IARC, 1994).

Si bien, existen múltiples terapias de erradicación contra *H. pylori*, como la triple terapia convencional (Marval, et al., 2016), en los últimos estudios se ha observado prevalencia en la tasa de resistencia de *H. pylori* ante distintos antibióticos, lo que ocasiona un fallo en la erradicación de esta bacteria, al mismo tiempo aumenta los costos y tiempos en el tratamiento sobre esta enfermedad (Molina, Corti, Doweck, McNicholl, & Gisbert, 2017). Frente a la ineficacia de los tratamientos convencionales y el subsecuente fracaso terapéutico, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas, que coadyuven la acción de los antimicrobianos y así, poder establecer la erradicación como una estrategia válida de prevención del CG.

Una de estas alternativas es el uso de componentes activos con capacidad bactericida presentes en plantas y frutos. A nivel mundial se han reportado que ciertos componentes activos como los polifenoles, entre otros, poseen la capacidad de degradar la membrana celular de las bacterias e incluso intervenir en proceso de inhibición de enzimas como en el caso de la Ureasa, que funciona activamente en el proceso de colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* (Pastene, Hebel, & García, 2012).

En nuestra región se ha determinado que el fruto del aguacate (*Persea americana* var *Hass*) posee un alto contenido de estos compuestos (Basante, 2016). Este fruto en los últimos años ha tomado una relevancia muy importante en la agricultura colombiana, posicionando al país como el cuarto productor, debido a la alta demanda en mercados nacionales e internacionales (Min. Agricultura, 2018). No obstante, a pesar de ser una planta con un potencial alimenticio elevado, carece de estudios que le otorguen un valor agregado al producto

después de la post-cosecha, en particular a los residuos que deja el fruto, como lo son la cascara y semilla (COLCIENCIAS, 2013).

Las evidencias científicas demuestran que los componentes activos en frutas se almacenan en la cáscara y semilla, lo que permite hipotetizar que los extractos de estas partes vegetales, por sus características químicas, tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori*. No obstante, en nuestro país no se reportan investigaciones que permitan corroborar esta hipótesis.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de los extractos polifenólicos obtenidos de epicarpio y semilla del aguacate (*Persea americana* var. *Hass*) frente al crecimiento de *Helicobacter. pylori*.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extraer, purificar y fraccionar los componentes polifenólicos de la semilla y epicarpio de aguacate (*Persea americana* Var. *Hass*).
- Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de los extractos crudos y los extractos ricos en polifenoles del epicarpio y semilla del aguacate (*Persea americana* Var. *Hass*) sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*.
- Determinar la mejor capacidad inhibitoria *in vitro* de *Helicobacter. pylori* de las fracciones polifenolicas obtenidas del extracto de epicarpio o semilla del aguacate (*Persea americana* var. *Hass*).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. CÁNCER GÁSTRICO

El CG es el adenocarcinoma del estómago que representa un 95 % de los tumores en este órgano, constituyendo la neoplasia maligna más frecuente del aparato digestivo, siendo el cuarto cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Bray, et al., 2018).

El CG es un crecimiento tisular maligno, por lo general el desarrollo celular anormal se presenta en las células de los tejidos que revisten el estómago, con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y órganos, principalmente el esófago e intestino delgado (Arana & Corona, 2003; Contreras, 2014)

3.1.1. Epidemiología del cáncer gástrico

Mundialmente se considera esta enfermedad como un problema de salud pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado que el CG es la segunda causa más frecuente de neoplasias, presentando cada año, aproximadamente 1.033.701 personas diagnosticadas con la enfermedad, de los cuales alrededor de 782.685 mueren, con una supervivencia a 5 años de tan solo 5 a 15 %. La incidencia de esta enfermedad varía en forma importante de un país a otro, Colombia se encuentra entre los países con las tasas más altas, junto a Japón, Costa Rica, Singapur, Corea y Chile. De igual forma dentro de Colombia la incidencia varía, siendo el departamento de

Nariño la región del país con la tasa de muerte e incidencia de CG de las más altas a nivel mundial, con 150 casos por cada 100.000 habitantes por año (Correa & Piazuelo, 2010), seguido de Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Bogotá y Santander, los cuales han presentado mayor mortalidad que los departamentos de Antioquia, Valle y Norte de Santander por tal enfermedad (López, Ospina, Rubiano, & Rey, 2009).

3.1.2. Etiología: lesiones precursoras del cáncer gástrico.

Se conoce que el CG es de etiología multifactorial. La infección por *H. pylori*, es uno de los elementos principales en la patogénesis del CG, siendo así que la agencia internacional para la investigación sobre el cáncer clasificó a este microorganismo como carcinógeno tipo I para los seres humanos (IARC, 1994), sin embargo otras condiciones como la dieta escasa en grasas y proteínas animales, alta cantidad de carbohidratos complejos, bajas cantidades de vegetales y frutas y abundante ingesta de sal, incrementa las condiciones para el desarrollo de la enfermedad (Ceron, Yopez, & Rivas, 2004), así como, otros autores sugieren que existen factores endógenos para padecer CG, como la edad, sexo, herencia, personas de edades entre los 50-70 años, personas con anemia perniciosa o gastritis crónica (Rodas , 2002).

3.2. GENERALIDADES DE *Helicobacter pylori*

H. pylori es una bacteria microaerófila, Gram negativa, de crecimiento lento y forma helicoidal con abundantes flagelos, pertenece al género *Helicobacter spp*, subdivisión

Proteobacterias, orden Campylobacterales, clase Epsilonproteobacteria, familia Helicobacteraceae (Alba R, Toledo R y Viana M, 2006; Fox, 2002).

Este patógeno afecta cerca del 50 % de la población mundial y su prevalencia se relaciona a la región geográfica, etnia, raza, edad, y factores socioeconómicos, por ejemplo, en países en vía de desarrollo afecta a más de 80 % de los adultos, en contraste con 20 a 50 % en países desarrollados (Ferlay, y otros, 2018).

En Colombia, las tasas de infección por *H. pylori* en adultos va del 70 % al 78 %, porcentajes relacionados con factores como la edad, calidad de agua potable, condiciones sanitarias, alimentación y factores socioeconómicos, siendo el departamento de Nariño la región con la mayor prevalencia de la infección por este patógeno, representando a nivel mundial una de las más altas prevalencias de *H. pylori* (Bravo L, y otros, 2003; Ceron, Yopez, & Rivas, 2004)

3.2.1. Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*

H. pylori presenta un conjunto de factores determinantes que le proporcionan la capacidad para colonizar el epitelio gástrico en humanos, adaptarse, sobrevivir y multiplicarse, los mecanismos moleculares de varios de estos factores ya han sido estudiados (Torres & Rodríguez, 2008). Los siguientes se describen a continuación:

- **Flagelos y motilidad**

La movilidad de *H. pylori* se facilita porque posee entre dos a seis flagelos polares cubiertos por una vaina lipoproteica que los protege de los ácidos gástricos y compuestos por dos flagelinas: FlaA y FlaB, que permite su movilidad, colonización y reconocimiento de receptores en las células del tejido. Los flagelos mediante mecanismos indirectos contribuyen con la patogénesis del CG (Torres & Rodríguez, 2008).

- **Proteínas de membrana externa (PME) o adhesinas**

La adherencia del patógeno a las células del epitelio gástrico, favorece la persistencia de la infección y estimula mecanismos de protección frente a la acidez gástrica. Las adhesinas de la membrana externa más importantes son: BabA, SabA, asociadas a la adherencia de AlpA y AlpB, HopZ, Hpa.A, DupA, las cuales están involucradas en la adaptación del hospedero permitiendo colonizar, promoviendo eventos inflamatorios y daños a las células parietales (Cervantes-García, 2016).

- **Ureasa**

La adaptación al pH gástrico de *H. pylori* reside en la producción de ureasa, acumulando gran cantidad de esta enzima en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. Esta enzima (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea proporcionando amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido

carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas, aumentando el pH hasta 6 o 7 en su entorno (Marshall, Barrett, Prakash, McCallum, & Guerrant, 1990).

- **Citotoxinas CagA y VacA de *Helicobacter pylori***

En cuanto a las toxinas, la citotoxina CagA, es el producto de la bacteria al sintetizar el gen *cagA* hace parte de un conjunto de 40 genes denominados isla de patogenicidad (*cag* PAI), no está presente en todas las cepas (Correa, 2011). Pero la infección por cepas CagA+ inducen respuesta inmune y gastritis severa. La presencia de esta citotoxina está asociada con gran frecuencia a ulcera péptica, gastritis atrófica y CG; mientras que la toxina VacA producida por la síntesis del gen *vacA*, induce vacuolización de las células epiteliales, destrucción de la integridad epitelial, apoptosis y muerte celular (Correa, 2011).

- **Sistema de oxidación**

Los factores oxidantes inducen una respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos dañando el tejido por la liberación de agentes inflamatorios como los radicales libres del oxígeno superóxido y sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), que dañan al ADN e impiden la replicación constituyendo el envejecimiento celular (Morinaga, et al., 2005)

3.2.2. Esquemas de tratamiento

La infección por *H. pylori* incrementa nueve veces el riesgo de desarrollar un adenocarcinoma gástrico, por tanto, hace unos años se recomendó su erradicación como estrategia primordial de prevención y/o regresión de lesiones precursoras de cáncer gástrico (Agudo-Peña, 2010). Hasta el momento no se ha determinado un tratamiento óptimo de erradicación (Tabla 1) y la efectividad de los diferentes esquemas de tratamiento se ha visto comprometida por la aparición de cepas resistentes a los antibióticos empleados (Agirrezabala, et al., 2012; Otero, et al., 2015).

Tabla 1. Tratamientos convencionales para el control de la infección por *H. pylori*.

TRATAMIENTO		ESQUEMA TERAPÉUTICO	DURACIÓN
Triple terapia o Terapia estándar	Clásica	IBP*/12h Amoxicilina 1 g/12h Claritromicina 500 mg/12h IBP*/12h	7-14 días**
	Si alergia a penicilinas	Claritromicina 500 mg/12h Metronidazol 500 mg/12h	7-14 días**
	Si resistencia a claritromicina	IBP*/12h Amoxicilina 1 g/12h Metronidazol 500 mg/12h	7-14 días**
Terapia cuádruple	Alternativa a triple terapia	IBP*/12h Bismuto 120 mg/6h Tetraciclina 500 mg/6h Metronidazol 250 mg/6h	10-14 días
Terapia secuencial	Si resistencia a claritromicina	IBP*/12h+amoxicilina 1g/12h -----	Días 1 a 5
		IBP*/12h+claritromicina 500 mg/12h+tinidazol o metronidazol 500 mg/12h	Días 6 a 10

Fuente: (Agirrezabala, et al., 2012)

El tratamiento triple incluyendo IBP-claritromicina y amoxicilina o metronidazol propuesto en la primera conferencia del consenso de Maastricht para tratar la infección por *H. pylori* ha llegado a ser universal al tener acogida en todas las conferencias del consenso llevadas a cabo alrededor del mundo. Sin embargo, los datos más recientes demuestran que esta combinación ha perdido cierta eficacia y a menudo permite la curación de solamente un máximo de 70 % de los pacientes, que es menos del mínimo valor esperado del 80 % de eficacia del tratamiento, propuesto en un principio y muy por debajo de lo que debe esperar (Malfertheiner, y otros, 2012).

Anteriormente según todos los consensos españoles y europeos se había establecido que una tasa de curación igual o superior al 80 % de los casos podía ser considerada suficiente para el tratamiento contra *H. pylori*, sin embargo, en el último consenso de Maastrich IV se recomienda que un tratamiento erradicador sea considerado efectivo cuando su capacidad de curar la infección por esta bacteria este alrededor de un porcentaje próximo o preferiblemente superior al 90 % de los pacientes. Para conseguir este objetivo, todos los tratamientos deben estar optimizados en términos de duración, dosis e intervalo de administración de inhibidores de la bomba de protones (IBP) y antibióticos (Malfertheiner, y otros, 2012).

No obstante, la resistencia de las bacterias a los antibióticos ha incrementado en los últimos años, esto está ligado a la susceptibilidad *in vitro* definida por la concentración mínima inhibitoria (CMI) es decir la capacidad del antibiótico de impedir el crecimiento del cultivo de un inóculo estándar de la bacteria (Pajares, Pajares-Villaroya, & Gisbert , 2007). Cuando la capacidad inhibitoria no es efectiva puede deberse por dos tipos de resistencia: La resistencia

natural o primaria, es decir la imposibilidad del antibiótico para erradicar la infección por características que no permiten la interacción del antibacteriano con la bacteria y el segundo tipo es por resistencia adquirida, esta aparece frente a antibióticos a los que la bacteria era susceptible en un principio, pero por modificaciones en el material genético de la bacteria aparecen por mutación cromosómica o transferencia genética; la resistencia farmacológica (Pajares, Pajares-Villaroya, & Gisbert , 2007; Pérez-Cano & Robles-Conteras, 2013). Explicando así el fracaso de las terapias actuales utilizadas en la erradicación *H. pylori*, lo cual ha llevado a pensar en buscar nuevas estrategias para tratar la infección por este patógeno.

Los productos naturales vegetales constituyen fuentes de interés para el descubrimiento y desarrollo de agentes efectivos contra la infección de esta bacteria, como coadyuvantes dietéticos, es decir, que ayuden a optimizar los tratamientos ya existentes activando o mejorando mecanismos de acción contra el patógeno o como alternativa directa de erradicación de la bacteria (Palacios, Escobedo, & Romero, 2011; Pastene, Hegel, & García, 2012). Dentro de estos productos se encuentran los coadyuvantes polifenólicos, que poseen propiedades que podrían ayudar a mejorar el desempeño de los tratamientos convencionales contra *H. pylori* (Palacios, Escobedo, & Romero, 2011)

3.3. AGUACATE

3.3.1. Origen y botánica

El origen del aguacate procedió en las partes altas de las montañas de Mesoamérica, donde también sucedió el proceso de domesticación de este cultivo, el cual ocurrió en el periodo clásico Maya, esto se evidencia en los restos arqueológicos y lingüísticos encontrados en esta área (Barrietos-Priego & López-López, 2002).

Los datos arqueológicos, paleontológicos y geológicos demuestran que el aguacate surgió hace cinco a ocho millones de años y paulatinamente fue migrando hacia las zonas del sur donde se dieron diferentes procesos de domesticación y adaptación de las variedades que se conocen en la actualidad (Galindo & Arzate-Fernandez, 2010). La evidencia más antigua del consumo de aguacate fue encontrada en una cueva en México (condado de Puebla); la evidencia data entre los años 8,000 - 7,000 A.C donde estaba en auge la cultura prehispánica, esta tenía un amplio conocimiento del aguacate (Smith, 1966).

Actualmente la clasificación botánica agrupa a los aguacates en una sola especie: *Persea americana* Mill. El género *Persea*, pertenece a la familia de las Lauraceas, dentro del cual se destacan tres subgéneros: *Persea*, *Eriodaphne* y *Machilus* (Chanderbali, Soltis, & Wolstenholme, 2013).

P. americana Mill, es un árbol polimórfico con diversas formas que van desde columnar hasta piramidales que en condiciones adecuadas sobrepasa los 30 m de altura, con una copa amplia. Sin embargo, los árboles injertados reducen su tamaño en distinta intensidad, dependiendo del vigor del patrón o portainjerto y de las condiciones donde se desarrolla. Normalmente, se mantienen a un máximo de altura de 7 u 8 m, mediante técnicas de poda periódicas, puesto que a una mayor altura dificulta el manejo y control fitosanitario, así como también para las labores de cosecha (Bernal, et al., 2014).

Su sistema radicular dependerá de los suelos y el agua que estén sustentando al árbol. En los cultivos se reportan arboles con un sistema radicular pivotante, con raíces laterales muy ramificadas, poco flexibles y en todos los casos carente de pelos absorbentes. La mayoría de las raicillas (secundarias y terciarias), se distribuyen superficialmente, algunas se asocian a micorrizas, estas promueven el crecimiento y la nutrición de la planta (Mejía, 2011).

Posee un único tallo principal, más grueso que los de niveles superiores y estos más gruesos que los subsiguientes, la superficie del tronco es rugosa, su ramificación es intensiva y la distribución de las ramas es verticulada. El color de las ramas jóvenes es rojo cobrizo, más intenso hacia el ápice. La superficie es pubescente y presenta lenticelas de color verde (ICA, 2012).

Se encuentran diferentes tipos de hojas debido a la múltiple variedad de clones y cultivares que existen de estas especies, hojas desde redondeadas hasta lanceoladas, pasando por todas sus variaciones, con pubescencias presentes en haz y envés del folíolo, con nervaduras

prominentes en el envés y pecioladas, su distribución es alterna y helicoidal en el terminal. El color de la hoja varía de acuerdo no solo a la variedad sino también al estado de desarrollo de la misma y van desde tonos marrones o rojizos pasando por verdes claros hasta verdes oscuros en hojas maduras. Se les ve capa cerosa en el haz de la hoja lo que le da apariencia brillante (Mejía, 2011).

Las inflorescencias, están dispuestas en panículas que pueden albergar hasta 450 flores, que maduran en el transcurso de seis meses. Cada árbol puede llegar a producir hasta un millón de flores y solo entre el 0,01 % y el 1 % se transforma en fruto, ocasionado por la extirpación de numerosas flores, que suelen ser anormales o estériles y de frutos pequeños en desarrollo (Bernal, et al., 2014).

Las flores del aguacate son perfectas, posee estambres y pistilos; son trímeras, pequeñas (3 a 7 mm de longitud), hermafroditas, pubescentes, con pedicelos cortos. Tienen un pistilo con un solo carpelo y el ovario con un solo ovulo. Es una especie que presenta dicogamia y protoginia, es decir, que las flores abren dos veces, actuando primero como flores femeninas y posteriormente, como masculinas (Gazit & Degani, 2007).

El fruto del aguacate es una baya que de acuerdo con la raza y diferentes variedades presenta múltiples tamaños y formas como redondas, aovados, piriformes, ovoides, claviformes, abotellados, alargados, achatados y más. El color del epicarpio de estos frutos varía desde verde oscuro a verde claro y amarillo y los hay que en su maduración cambian a marrones, rojizos, púrpuras y negros. El color de la pulpa también varía desde tonos blanquecinos, pálidos,

pasando por verdes, verde-amarillos, amarillos pálidos y amarillos fuertes (Mejía, 2011). Cada fruto presenta una sola semilla la cual es de diferentes tamaños y formas dependiendo del material e incluso de condiciones climáticas y factores como fertilización, estas se caracterizan por ser duras y grandes con respecto al tamaño del fruto (ICA, 2012).

3.3.2. Condiciones agroambientales para el cultivo del aguacate.

Durante las etapas de desarrollo y producción en el cultivo de aguacate los factores con mayor incidencia son la temperatura, el viento y las precipitaciones. Elementos como vientos fuertes, precipitaciones intensas y heladas pueden causar la pérdida directa de la fruta durante la poscosecha, debido a las cicatrices que causan sobre la misma, el aumento de los organismos patógenos como insectos, hongos, entre otros que proliferan en época de floración (DANE, 2016).

En Colombia las zonas para el cultivo de aguacate presentan grandes variaciones en altitud, radiación solar, humedad relativa, temperatura y precipitación, entre otros factores, esto ocasiona que haya una gran variedad de respuestas en los cultivos lo que afecta al comportamiento agronómico, productividad, rendimiento y calidad de la fruta.

- **Temperatura:** Las temperaturas óptimas para el cultivo oscilan entre los 5 y los 19 °C, con variedades que pueden soportar climas fríos de hasta 2,2 °C, Las temperaturas durante el desarrollo del fruto y la maduración pueden afectar también la calidad del fruto, ya sea acelerando o retrasando la madurez hortícola. (Whiley, Schafer, & Wolstenholme, 2002).

Los frutos de aguacate *Hass* obtenidos de cultivos ubicados en zonas bajas temperaturas cálidas, a 1.300 msnm, presentan formas más redondeadas y epidermis o cáscaras más rugosas, comparados con los obtenidos en condiciones de climas más fríos a alturas de 2.400 msnm, cuya forma es más alargada y la cáscara más lisa (Bernal, et al., 2014).

- **Humedad relativa:** La adaptación de este cultivo es en climas húmedos y semihúmedos, esto depende de la raza de aguacate cultivado, por ejemplo, la raza mexicana presenta baja tolerancia a la humedad ambiental, prefiriendo climas más secos, y la guatemalteca es de tolerancia media, pues se adapta a climas semihúmedos (Whiley, Schafer, & Wolstenholme, 2002).

- **Precipitación:** El aguacate tiene una amplia adaptación a la pluviosidad; se cultiva sin riego en zonas con precipitaciones que varían entre 665 milímetros y más de 2.000 milímetros de lluvia anuales (mm/año) (Alfonso, 2008). Sin embargo, es a su vez muy sensible al encharcamiento, que produce asfixia radical, también favorece el desarrollo del hongo *Phytophthora cinnamomi* Rand., causante de la pudrición de la raíz. El exceso de precipitación durante la floración y el fructificación reduce la producción y provoca la caída de los frutos (ICA, 2012). En resumen, el aguacate requiere entre 1.200 y 1.600 mm de lluvia bien distribuidos durante el año.

- **Viento:** Es un factor que afecta la producción en el cultivo, dado que las ramas de la planta son, muy quebradizas y se rompen fácilmente por acción de este, Es así, que el cultivo debe ubicarse en lotes para la siembra que posean zonas con vientos suaves o establecer barreras

rompevientos. Los vientos no deben ser constantes, ni alcanzar velocidades por encima de los 20 kilómetros por hora, ya que esto provoca ruptura de ramas, caída de flores y frutos, quemazón de las hojas y de los nuevos brotes del árbol, además de deshidratación, la cual impide la fecundación y la formación de los frutos (Whiley, Schafer, & Wolstenholme, 2002).

- **Altitud:** En Colombia, el rango altitudinal óptimo va desde los 1.800 hasta los 2.000 msnm, que corresponden al clima frío moderado; solo si las condiciones microclimáticas son buenas, se puede establecer hasta los 2.500 msnm, Bernal y colaboradores (2014) encontraron que existe una influencia de la altura sobre el período de floración a cosecha, en aguacate cv. *Hass* en Antioquia, Colombia. De esta forma encontró que los árboles sembrados a 2.410 msnm tardaron 12 meses en producir después de la floración, mientras que aquellos a 2.180 msnm, tardaron entre 10 a 11 meses, a 1.900 entre 9 y 10 meses y a 1.340 msnm, este período fue de 7 a 8 meses.

- **Requerimientos nutricionales del suelo:** El aguacate requiere suelos muy bien drenados, dado que sus raíces son altamente susceptibles a condiciones de inundación, lo que le trae problemas sanitarios o de enfermedades; suelos con profundidad efectiva y nivel freático superiores a 1,0 metro, con texturas livianas que favorezcan la formación de un sistema radicular denso y muy ramificado, son los más recomendados (DANE, 2016). El aguacate se adapta a una gran gama de suelos, desde los arenosos (A) hasta los franco-arcilloarenosos (FArA); el contenido de arcilla en los suelos no debe superar el 28 %; además, deberán contar con buena estructura y buen drenaje interno, factores que son de mucha importancia para garantizar la vida útil del árbol. En general, se considera como un pH óptimo el rango

comprendido entre 5,5 y 6,5; pues en suelos de reacción alcalina o con pH por encima de 7 se originan deficiencias nutricionales importantes de hierro y zinc (Bernal, et al., 2014).

3.3.3. Producción mundial y situación del cultivo de Aguacate en Colombia y Nariño

De acuerdo a estadísticas de FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) el aguacate se produce en los cinco continentes, siendo el continente americano el más importante en producción; en el año 2016 representó el 74,8 % del total de aguacates producidos en el mundo, seguido por África (11,3 %), Asia (10,5 %), Europa y Oceanía (1,7 %). Los mayores productores de aguacate son México (1.889.354 Ton), República Dominicana (601.349 Ton), Perú (455.394 Ton), Colombia (309.431 Ton) e Indonesia (304.938 Ton) (Faostat, 2018).

Según las estadísticas del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Social, el aguacate en Colombia, para el 2018, presentó una producción de 403.184 Ton en un área cultivable de 73.986 Ha, estos datos indican que el cultivo en el país ha tenido un crecimiento de 49 % en su área sembrada en los últimos 4 años, lo cual está asociado al incremento en el interés de los productores por establecer la variedad “*Hass*” en el país, debido a la enorme demanda de esta fruta en mercados internacionales (Min. Agricultura, 2018).

La variedad *Hass*, por su sabor y su textura, es la principal variedad cultivable a nivel mundial, llegando a aportar el 80 % de los aguacates que se consumen, debido a la alta calidad

de su pulpa, a su mayor productividad, a su madurez más tardía y a la capacidad de almacenamiento por periodos relativamente largos. Los frutos son de tamaño mediano, de 8 a 10 centímetros de largo, con un peso que va de 150 a 400 gramos, de forma ovoide a piriforme; la cáscara es mediana a gruesa, de textura rugosa y corchosa, superficie áspera y granulosa, de color verde que se oscurece al madurar, tornándose morada a negra. La pulpa es cremosa de color amarillo con un contenido de grasa del 17 % al 21 % y de un rico sabor a nuez. Esta variedad se adapta a clima frío moderado, comprendido entre los 1.800 y los 2.600 msnm; en Colombia muestra rendimientos promedio por hectárea de 10,8 toneladas, que la posicionan en el segundo lugar a nivel mundial en este aspecto. Por lo tanto, se hace interesante el cultivo de esta variedad, tanto para el mercado nacional, como para el internacional (Bernal, et al., 2014).

De acuerdo con las estadísticas de Agronet, en el año 2016, se reporta que para el departamento de Nariño el área sembrada de este producto correspondió a 547 Ha, con un área cosechada de 234 Ha y una producción de 974 Ton, lo que representan un 14,4 % de crecimiento de este cultivo con respecto a los años anteriores (Agronet, 2018)

3.4. USO DE BIOPROSPECCIÓN EN EL CONTROL DE *H. pylori*.

La triple terapia que consiste en el uso de dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones, es el tratamiento más común para infecciones de *H. pylori*. Sin embargo, el prolongado uso de antibióticos puede otorgar resistencia en la infección del organismo además de alterar la biota normal del sistema gastrointestinal (Murali, 2014). La búsqueda de alternativas para esta infección en las propiedades anti-*H. pylori* en plantas es reciente, el primer

reporte que se tiene ocurrió ocho años después de ser descrita por primera vez esta bacteria (Cassel-Beraud, Le Jan, Mouden, Andriantsoa, & Adriantsiferana, 1991).

La bioprospección se define como la exploración de componentes naturales y organismos completos de la biodiversidad cuyo fin sea concederles un valor comercial para el desarrollo de múltiples productos relacionados con industria farmacéuticas, biotecnológicas, de agro insumos y de medicina botánica, entre otras (Torres & Velho, 2009).

Un ejemplo de estos estudios en el tratamiento de la infección por *H. pylori* con la planta el Olivo, del cual se extrae el aceite de Oliva. En el mundo hay plantados más de 1.500 millones de olivos que se extienden en 11.512.015 de hectáreas repartidas por todo el planeta, hay cerca de 56 países del mundo que producen aceite de oliva. El aceite es producido a través de la presión de aceitunas del olivo enteras y es usualmente usado en la cocina, cosméticos, farmacéuticos y jabones (Vilar & Pereira, 2018).

Romero y colaboradores (2007), examinaron el efecto del aceite de oliva en ocho diferentes aislados clínicos de *H. pylori*, incluyendo tres muestras resistentes a antibióticos y observaron un potencial positivo en la actividad anti-*H. pylori* del aceite de Oliva. En adición, los compuestos fenólicos del aceite de oliva pueden permanecer estables durante varias horas bajo fuertes ambientes ácidos, los autores consideraron a estos compuestos sumamente importantes para ensayos *in vivo* sobre la actividad anti *H. pylori*.

Basados en estos resultados, Castro y colaboradores (2012), realizaron dos estudios pilotos clínicos diferentes comparando 30 individuos en dos intervalos de tiempo, en el primer intervalo los 30 individuos recibieron 30 g de aceite de Oliva virgen lavado durante 14 días, se esperó un espacio de un mes y se continuó con el segundo intervalo donde se les administró por 14 días aceite de Oliva virgen sin lavar. Los investigadores observaron que en las primeras 4 semanas la infección por *H. pylori* fue eliminada en ocho de los 30 pacientes (27 %), al finalizar el estudio, 12 de 30 individuos no presentaron infección.

Otra planta investigada para el tratamiento de *H. pylori* es el brócoli. Los principales países exportadores de brócoli son: España (240,61 mil/TM), Francia con 19,26 % (182,39 mil/TM), China con 13,92 % (131,86 mil/TM) y Estados Unidos con 8,95 % (84,80 mil/TM). Según la FAO, de este cultivo se importa 662 millones de toneladas, siendo los principales importadores: Reino Unido (18 %), Alemania (9,44 %) y Canadá (9,20 %) (Escobar, 2016). El brócoli tiene un alto contenido en vitamina C y fibra alimentaria; también contiene múltiples nutrientes con potentes propiedades anticancerígenas, como diindolimetano y pequeñas cantidades de selenio. El diindolimetano que se encuentra es un potente modulador de la respuesta del sistema inmunitario innato con actividad antiviral, antibacteriana y anticancerígena (Ohio State University Medical Center, 2019).

Galán y colaboradores (2004), en un estudio piloto usando nueve pacientes revelaron que *H. pylori* fue erradicada en el 33,33 % de los pacientes quienes consumieron brócoli en dosis de 14 g, 28 g y 56 g durante 7 días, cuando se realizó el test de antígeno en heces, siete de nueve pacientes mantuvieron los resultados negativos de *H. pylori*, sin embargo, después de

35 días de evaluación, seis de 9 pacientes no tenían a *H. pylori* en su sistema, lo que indica que esta alternativa de tratamiento para la infección se mantiene en el tiempo, y con un análisis de biopsias gástricas se determinó que en solo tres de nueve pacientes se erradicó completamente a la bacteria.

En otro estudio con brócoli, Fahey y colaboradores (2013), aislaron de esta planta sulfarafano y un glucosinolato precursor y observaron que estos compuestos fueron efectivos contra 45 aislados clínicos en una CMI menor a 4 ug mL^{-1} para el 90 % de las muestras, en adición el ensayo fue realizado con diferentes niveles de pH y se observó que la CMI permanece inalterable a pH de 5,8, lo que asemeja las condiciones de la mucosa gástrica, los autores concluyen que el sulfarafano podría ser útil en ensayos *in vivo* contra *H. pylori*. Sumado a esto, ellos trabajaron diferentes estratos usando cloroformo, metanol, acetato etílico, butanol y agua, encontrando que los extractos obtenidos con metanol presentaron los resultados más potentes contra *H. pylori*.

Los arándanos son otro cultivo de importancia en el tratamiento frente a la infección causada por esta bacteria. El arándano es un cultivo que se desarrolla a nivel mundial, el mayor productor de este fruto es Estados Unidos, sin embargo, como existe una necesidad de proveer la fruta durante todo el año, Estados Unidos pese a ser el mayor productor del mundo, solo puede sostener una época productiva durante el año, y es entonces donde se contempla al abastecimiento por parte de otros países como Suramérica, convirtiendo a Chile en el segundo país con mayor producción a nivel mundial y el principal productor Suramericano con alrededor de 14.000has (Farfán, 2016). Los arándanos se componen de un 90 % de agua y son un gran

recurso de flavonoides, incluyendo antocianinas y protocianidinas con alto potencial antioxidante que se ha documentado que presenta beneficios para la salud humana (Pedersen, Kyle, Kinson, Gardner, & Mc Phail, 2000).

En el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2005), 97 pacientes positivos para *H. pylori* recibieron 250 mL de jugo de arándanos rojos durante 90 días, la eficacia en la eliminación de *H. pylori* a los 45 y 90 días fue del 14,43 % respectivamente, además se observó que tres participantes fueron positivos para *H. pylori* a los 45 días, pero cambiaron a negativos para *H. pylori* a los 90 días de evaluación, lo que sugiere que una larga intervención con este tratamiento a base de arándanos rojos puede proveer una mayor eficacia en la erradicación de la bacteria

3.5. POLIFENOLES

3.5.1. Origen, estructura y distribución.

El término polifenol es utilizado para definir metabolitos secundarios derivados de rutas metabólicas shikimato-fenilpropanoide y/o policétidos, que presenten más de un anillo fenólico y estén desprovistos de nitrógeno en su estructura (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouységu, 2011).

Las plantas sintetizan estos productos en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario, se han relacionado en diversos papeles, incluyendo la resistencia de

las plantas contra microorganismos patógenos y animales herbívoros, como los insectos. Los polifenoles son importantes, también, en la protección del ADN frente a las radiaciones solares, en especial, la radiación UV-B, lo que probablemente fue un factor determinante en la evolución de las plantas terrestres (Carrasco-Ríos, 2009).

Como se mencionó anteriormente la biosíntesis de los polifenoles surge de dos rutas metabólicas primarias: la ruta del ácido shikimico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shikimico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikimico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), la mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina (García & Carril, 2009).

La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas. Comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas, estas a su vez pueden combinarse con precursores del ácido shikimico y poliacetatos y generan moléculas biológicamente activas denominadas flavonoides (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

3.5.2. Propiedades terapéuticas de los polifenoles

Los beneficios del consumo de compuestos polifenólicos radican en su potencial antioxidante, puesto que estos fitoquímicos tienen la capacidad de neutralizar a las especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya acumulación en el organismo desencadena la degradación de biomoléculas esenciales para la funcionalidad del organismo. Cabe resaltar que la función biológica de los compuestos polifenólicos se restringe al tipo de especie vegetal que los contenga, tal es el caso de los ácidos fenólicos que ayudan a inhibir agentes mutagénicos y a la vez promover la actividad bactericida en las células del organismo, o por ejemplo los flavonoides que han demostrado tener capacidad antiviral y proteger moléculas como proteínas, lípidos y ADN (Mercado-Mercado, Cariilo, Wall-Medrano, López, & Álvarez, 2013).

Estos compuestos bioactivos reducen el riesgo de muchas enfermedades, entre ellas, padecimientos crónicos como aquellos cardiovasculares, hipertensión, cáncer y diabetes. Estos polifenoles ayudarían a la inhibición de la tasa metabólica de los carcinógenos por las enzimas de fase I, así como la inducción de enzimas antioxidantes y enzimas destoxicadoras (Vallejo-Zamudio, Rojas, & Torres, 2017).

3.5.3. Actividad biológica de los polifenoles

Una característica de los polifenoles es su comportamiento quelante, puesto que favorecen a la retención en las proteínas de los iones, de metales como hierro y cobre, evitando así reacciones que catalizan la producción de radicales libres. También intervienen directamente

en los procesos celulares, específicamente crecimiento, proliferación y apoptosis. Muchos de los efectos biológicos de los polifenoles consisten en intervenir en la funcionalidad de los mecanismos de reconocimiento celular, incluyendo las proteínas fosfatasa, cinasa y los receptores de membrana (Paredes & Clemente, 2005).

Los mecanismos implicados en la inhibición de las bacterias por los compuestos polifenólicos dependen de su estructura química y concentración, así como de las características intrínsecas de la cepa bacteriana (Pastene, Hebel, & García, 2012). El uso de los polifenoles como antimicrobianos, puede deberse a que sus ácidos orgánicos ejercen una reducción en el pH extracelular sobre los microorganismos, aumentando la turgencia celular, provocando así un aumento de la presión mecánica sobre la pared de las bacterias, alterando su estructura (Sotelo, Casas, & Camelo, 2010).

Estudios de microscopía electrónica de transmisión demuestran que los polifenoles generan daños en la integridad de la membrana celular de microorganismos. Lo que sugiere la implicación de interacciones hidrofóbicas entre los compuestos fenólicos y la fracción lipídica de la membrana bacteriana, que con llevarían la pérdida de su integridad y muerte celular. Polifenoles presentes aceites esenciales de plantas, permeabilizan la membrana celular, lo que provoca la pérdida de iones, el colapso de la bomba de protones y a la disminución del ATP lo cual conduce a la muerte celular (Pastene, Hebel, & García, 2012).

3.6. ANTECEDENTES

El aguacate, es una especie que presenta cerca de 500 variedades para Colombia esta presenta un gran potencial debido a la demanda por la fruta en mercados nacionales e internacionales, esta especie es utilizada en programas de sustitución de cultivos ilícitos y además hace parte de la canasta familiar colombiana (Red nacional para la bioprospección de frutas tropicales "COLCIENCIAS", 2013). Su pulpa contiene cerca de un 30 % de grasa; proteína, calcio, hierro, sales minerales, vitaminas E, B1, B2, y D; es una excelente fuente de compuestos bioactivos tales como ácidos grasos monoinsaturados y esteroides; hidrocarburos alifáticos saturados, alcoholes alifáticos y terpenicos; aminoácidos como el ácido aspártico y glutámico, también leucina, valina y lisina; así como carotenoides y fenoles (Dembitsky, et al., 2011; Olaeta, Schwartz, Undurraga, & Contreras, 2007).

Según la recopilación realizada por Rincón (2014), sobre la actividad biológica de la familia Lauraceae, reporta actividad citotóxica, tripanocida, hipotensora, antifúngica, hipolipidémica, antioxidante, antibacterial, vaso relajante, hipoglicémica, antidiabética, analgésica y antiinflamatoria, antiespasmódica, antialimentaria, antimicobacteriana, toxica, inhibición de la acetil-CoA carboxilasa, supresión de la lesión en el hígado, inhibición de la generación de superóxido y óxido nítrico.

Estudios previos demostraron que residuos de *Persea americana* var *Hass* como la cáscara y la semilla presentan actividad antimicrobiana y además posee una buena cantidad de moléculas activas como los polifenoles. La semilla del aguacate posee componentes como

ácidos grasos, alcoholes, protocianidinas, carnitina y carotenoides, demostrando capacidad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus glaucus* y *Penicillium notarum*, mientras que la cascara presenta buenos componentes nutricionales, se ha utilizado como laxante casero para tratar digestión lenta y colon irritable (Bressani, Rodas, & Ruiz, 2009; Olaeta, Schwartz, Undurraga, & Contreras, 2007).

Según el estudio de Chávez et al., (2011), reporta que en el aguacate se destacan productos polifenólicos que tienen potencial en la inhibición de *H. pylori*. Los resultados de su investigación demuestran que los polifenoles extraídos de epicarpio de aguacate inhiben la actividad de enzimas como la ureasa, la cual es esencial para la colonización de la bacteria en el cuerpo humano. El extracto obtenido fue rico en procianidinas, las cuales al fraccionarlas se observó una relación entre el tamaño molecular y la capacidad de inhibir ureasa.

Los estudios realizados por Kosinska et al., (2012), reportan la capacidad antioxidante y el contenido polifenólico en las semillas de dos variedades de aguacate (var. *Hass* y var. *Shepar*), determinando que la variedad *Hass* presenta más compuestos polifenólicos con respecto a otras variedades evaluadas; lo que refleja su mayor capacidad antioxidante, estos resultados generan interés particular por el empleo de estas moléculas activas extraídas de la cascara y semilla del aguacate estructuras reconocidos como "desechos" del fruto.

El estudio más reciente fue realizado por Ramos y colaboradores (2019), quienes estudiaron el potencial protector de fracciones extraídas del aguacate contra úlceras gástricas inducidas por métodos químicos en ratones. Ellos reportan que estos extractos fueron efectivos

en mitigar el estrés oxidativo incrementando la enzima súper oxido dismutasa, lo cual previno la formación de úlceras en un 92%, el análisis por HPLC-DAD reveló la presencia de (-) epicatequina y (+) catequina.

4. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio es de tipo experimental, se incluyeron cinco biopsias de pacientes sintomáticos de gastritis donadas por el grupo de investigación en Salud Pública de la Universidad de Nariño, de las cuales se obtuvieron aislados de *H. pylori* con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos de semilla y cáscara del aguacate (*P. americana* var *Hass*) sobre el crecimiento de la bacteria.

El proyecto fué financiado por COLCIENCIAS en el marco de la interacción con la Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-Rifrutbio, en convenio con la Universidad Nacional de Colombia, la Universidad de Nariño y cinco instituciones adicionales

4.1. Recolección de material vegetal

Los frutos de aguacate para la extracción de sus componentes polifenólicos, se recolectaron en el municipio del Tambo (1° 23' 21.286" N 77° 22' 59.75" O). Esta zona se caracteriza por tener un clima templado, con temperaturas promedio que oscilan entre los 15 a 20 °C, la pluviosidad tiene dos picos máximos en los meses de mayo y noviembre (392 mm) y durante los meses de junio a septiembre se presenta la menor precipitación (2,60 mm), las características de suelo son de tipo limo-arcilloso (Barrera, et al., 2016).

La recolección del material vegetal se realizó mediante un muestreo aleatorio simple, en total se recolectaron entre 38 frutos caracterizados por tener un tamaño uniforme, coloración

verde brillante, libres de hongos, bacterias, parásitos, daños mecánicos y que presenten un estado óptimo fisiológico para su cosecha (Figura 1).



Figura 1. Colecta de material vegetal. Se puede observar un cultivo de aguacate variedad Hass y sus respectivos frutos, en el municipio del Tambo-Nariño. Fuente. Este estudio

Posteriormente, estos frutos fueron cubiertos en papel periódico durante cinco días para acelerar su maduración, una vez adquirieron una coloración verde oscura a morada y una firmeza suave al tacto fueron llevados al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la universidad de Nariño para su posterior uso (Figura 2).



Figura 2. Maduración de los frutos de aguacate. Se puede Observar frutos óptimos para proceso de extracción. Fuente. Este estudio

4.2. Objetivo específico 1: Extracción, purificación y fraccionamiento de los componentes polifenólicos de la semilla y epicarpio de aguacate (*P. americana* Var. *Has*)

4.2.1. Obtención de extractos crudos de aguacate

Los frutos fueron procesados con el fin de obtener los extractos crudos tanto de semilla como epicarpio mediante maceración química. Inicialmente cada fruto fue lavado con agua destilada, secado y pesado, luego se separó el epicarpio y la semilla de la pulpa, estas partes vegetales fueron pesadas por separado, los datos obtenidos fueron tabulados en el programa Excel. Posteriormente, se cortó la semilla en pedazos pequeños, los cuales fueron colocados en un procesador de alimentos marca Black and Decker con el fin de fragmentar lo mejor posible las semillas, este material se colocó en un recipiente forrado con papel plástico negro y fue cubierto hasta el tope con una solución de Metanol – Agua (80:20). Para el caso de epicarpio, este se cortó finamente con un bisturí y se repitió el proceso. Ambos contenidos se dejaron reposar por 24 horas. Transcurrido este tiempo se realizó el filtrado del material con ayuda de una bomba de vacío (Figura 3), el material fue colocado en botellas ámbar y se refrigeró a 4°C.



Figura 3. Maceración química. Se puede observar parte del proceso de maceración química de los extractos crudos de semilla y epicarpio. Fuente. Este estudio

Posteriormente a este filtrado se eliminó el solvente en el equipo rotaevaporador Marca Heidolph y fue colocado en cajas petri cubiertas en su totalidad con papel plástico color negro y con perforaciones sobre la tapa, posteriormente se congeló a -20°C y se liofilizó en el equipo liofilizador Marca Fanbolun, el cual realiza un proceso de sublimación que consiste en eliminar el agua de una muestra pasando directamente de estado sólido a gaseoso por medio de presiones cercanas al vacío. El contenido liofilizado fue pesado y raspado para posteriormente guardarlo en viales de vidrio a 4°C .

4.2.2. Purificación de los extractos crudos de aguacate

Los extractos crudos de epicarpio (ECE) y semilla (ECS), se purificaron utilizando una resina polimérica (Amberlita XAD-7) empacada en una columna cromatográfica de dimensiones: largo 23,5 cm y diámetro interno 2 cm. Este proceso se realizó con el fin de

eliminar compuestos co-extraídos durante la maceración como azúcares, aminoácidos, proteínas entre otros. Para la purificación en Amberlita XAD-7, inicialmente se activó la resina con 400 mL de agua acidificada (Ácido clorhídrico al 0,01 %), luego se cargaron 4 gramos de la respectiva muestra a purificar y se realizaron lavados con agua destilada hasta que el pH obtenido de la purificación por amberita fue igual o muy similar al del agua de lavado. Luego el contenido retenido en la resina fue eluido con 420 mL de una solución de Metanol – Ácido acético (19:1), el cual se colectó en botellas ambar. Este proceso se repitió cuatro veces, con el fin de purificar en total 16 gramos de cada extracto crudo. Finalmente se repitió el proceso de rotaevaporación y liofilización pesando y conservando a 4 °C el contenido seco de estos extractos purificados (Rosero, Cruz, Osorio, & Hurtado, 2019). Este material se utilizó para obtener las fracciones polifenolicas y para los ensayos antagónicos de estos extractos sobre *H. pylori*.

4.2.3. Obtención de fracciones polifenolicas del aguacate

Los extractos purificados con mejor capacidad anti- *H.pylori* fueron fraccionados por la cromatografía de exclusión por tamaño, haciendo uso de la resina de Sephadex LH-20, inicialmente esta fue activada con 500 mL de agua acidificada (Ácido clorhídrico al 0,01 %). El flujo para la activación y el resto del proceso fue de 0,7 mL por minuto. Al igual que el proceso anterior se realizó un lavado con agua tipo II hasta equilibrar los pH, una vez se terminó el lavado de esta columna se procedió a cargar el extracto purificado de semilla, el cual se disolvió en 30 mL del solvente inicial, Metanol al 30 %, el volumen de este primer solvente fue de 400 mL, culminado esta elución, se continuo eluyendo con 450 mL del segundo solvente

(Metanol 60 %) y finalmente se eluyó el resto del contenido fraccionado con 250 mL de acetona al 60 % acidificada con 0,01 % de ácido fórmico. El contenido de cada elución fue almacenado cada 10 mL en frascos plásticos de 30 mL envueltos en papel vinipel color negro.

Las muestras de 10 mL de cada solvente fueron medidas en un espectrofotómetro marca Spectroquant Prov 300, el cual permitió realizar la medición en un barrido desde 200 a 700 nm, estos resultados fueron registrados y se usaron para comparar muestras similares; es decir, muestras que presentaban similitud en sus espectros fueron colectadas en una misma botella ambar para luego ser rotaevaporadas, liofilizadas y almacenadas a 4 °C (Rosero, Cruz, Osorio, & Hurtado, 2019).

4.3. Objetivo específico 2: Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de los extractos crudos y los extractos ricos en polifenoles del epicarpio y semilla del aguacate (*P. americana* Var. *Hass*) sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*

4.3.1. Activación e identificación de los aislamientos de *Helicobacter pylori*

Para los ensayos antagónicos de los EC y los EP se usaron cuatro biopsias, AP016, AP026, AP028 y AP030, y para los ensayos antagónicos correspondientes a las fracciones polifenolicas se hizo uso de la biopsia AP018. Las cinco biopsias usadas en esta investigación fueron donadas por el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad de Nariño a cargo del profesor Alvaro Pazos Moncayo.

4.3.1.1. Activación: Cada biopsia seleccionada se descongeló a temperatura ambiente y se colocó en un ependorff de 1.5 ml estéril con la ayuda de una micropipeta, luego se agregó 200 µl de solución salina estéril al 0.89 % de NaCl y con un microbolillo estéril y un rotor se maceró hasta homogenizar completamente el tejido. Parte del macerado se sembró para el aislamiento e identificación y el resto se utilizó para los ensayos antagónicos con los polifenoles.

Para el aislamiento e identificación de *H. pylori*, La siembra se realizó con un asa de argolla calibrada a 10µl, por siembra masiva, en agar Columbia con sangre desfibrinada de cordero al 10 %, más suplemento Dent. Luego de la siembra se preservó el macerado restante en una solución de tioglicolato con glicerol al 20 % y se conservó en el freezer a -70 °C (Pazos, Figueroa, Cortés, & Bravo, 2012).

La incubación de las cajas petri se realizó en una incubadora de CO₂ a 37°C, con atmósfera de CO₂ al 10 % y 90 % de humedad. Se verificó el crecimiento a las 72 h y luego se realizó evaluaciones periódicas de 7 a 10 días hasta observar colonias características de *H. pylori* con buen crecimiento. Por último, de las cajas que presentaron crecimiento positivo y puro se les tomó una muestra para identificación bioquímica, molecular y para ser preservadas a -70 °C en medio tioglicolato más 20 % de glicerol.

4.3.1.2. Identificación bioquímica: A nivel macroscópico se identificó colonias pequeñas, traslúcidas, a manera de gotas de rocío (Alarcón, Baquero, Domingo, Lopéz, & Royo, 2004) las cuales se identificaron por las siguientes pruebas bioquímicas.

- **Prueba de oxidasa:** Con una tira de oxidasa se tomó directamente del cultivo en caja petri colonias aisladas de *H. pylori*, observando el cambio en la coloración de la zona reactiva de la banda. La prueba es positiva para *H. pylori* cuando la tira presenta cambio de coloración (blanco a color azul oscuro) (Alarcón, Baquero, Domingo, Lopéz, & Royo, 2004).

- **Prueba de Catalasa:** Se emulsionó colonias del cultivo en porta objetos con dos gotas de peróxido de hidrógeno al 10 %. La presencia de burbujas indicó una reacción positiva *H. pylori* (Alarcón, Baquero, Domingo, Lopéz, & Royo, 2004).

- **Prueba de detección Ureasa:** Del cultivo se tomó una colonia y con un asa se inoculó un tubo Nunc con 1 ml de solución de urea con rojo de fenol al 10 %, como indicador de pH. La prueba fue positiva para *H. pylori* al presentarse un cambio de coloración de amarillo a fucsia (Alarcón, Baquero, Domingo, Lopéz, & Royo, 2004).

- **Tinción de Gram:** En un portaobjetos se realizó un frotis de colonias de *H. pylori* en agua destilada con posterior fijación al calor. Se utilizó un protocolo estándar de coloración de Gram y en el microscopio con un objetivo de 100X se evaluó la presencia de bacilos Gram negativos (coloración rosada) como resultado positivo para la identificación de *H. pylori* (Alarcón, Baquero, Domingo, Lopéz, & Royo, 2004).

4.3.1.3. Identificación molecular: Para la identificación molecular se utilizó la técnica de PCR con primers específicos para la determinación de la especie de *H. pylori*. Esta técnica requiere los siguientes pasos

- **Extracción y control de calidad de ADN de *H. pylori*:** La extracción de ADN de *H. pylori* se realizó con el Kit Extracción de ADN genómico “GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit Protocol (NA2100)”.

Para verificar la pureza y concentración del DNA extraído, se hizo uso de lecturas por espectrofotometría en el equipo NanoDrop™ - One/OneC, donde se utilizó la solución Elute del kit de extracción como blanco para la calibración del equipo y a continuación 1uL de cada muestra de ADN extraído. Se utilizó una cepa de referencia ATCC 43504 de *H. pylori* como control positivo.

- **Técnica de PCR:** La identificación molecular de *H. pylori* se verificó por la amplificación del gen esencial *urea* (Tabla 2), ya que su detección confirma la especie. Para esto se siguió el protocolo propuesto en el Manual de Genotipificación de *H. pylori* (Pazos, Cerón , & Bravo, 2011).

Tabla 2 Primers, Secuencias y Amplicon para PCR *ureA* de *H. pylori*

Gen y región de ADN amplificada	Secuencias del iniciador (5`→ 3`)	Primer	Tamaño del amplicon x PCR
<i>UreA</i> PCR 1	<u>GCCAATGGTAAATTAGTT</u> CTCCTTAATTGTTTTTAC	HPU 1 HPU 2	167 pb

Fuente: Este estudio

Inicialmente se preparó el mix de reacción en la zona exclusiva de PCR en el laboratorio, los reactivos y concentraciones requeridas serán tomadas del protocolo del producto comercial *Go taq* DNA Polymerasa, como se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Mix de reacción para PCR del gen urea de *H. pylori*.

REACTIVOS	Concentración [Final]	Vol Final 1 Reacción	Vol Final 10 Reacción
1 H2O MQ	----	31,25µl	312,5 µl
2 Buffer 5X Colorless Go Taq	1x	10 µl	100 µl
3 Solución de MgCl ² 20 Mm	1 mM	2 µl	20 µl
4 DNTPS 10 Mm	2 mM cada uno	1 µl	10 µl
5 HPUI-Forward 20pmol/µl	0,5 pmol	1,25 µl	12,5 µl
6 HPUI-Reverse 20pmol/µl	0,5 pmol	1,25 µl	12,5 µl
7 Go Taq Polymerasa (5U/µl)	1,25 U	0,25 µl	2,5 µl
8 ADN	<500 ng/µl	3 µl cada muestra	3 µl cada muestra
9 Volumen Total		50 µl	500 µl

Fuente: Este estudio.

- **Electroforesis en gel de agarosa:** Esta técnica permitió la visualización de los amplificados, para lo cual se empleó un gel de agarosa al 1,5 %, disolviendo 1,5 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1X (40mM Tris acetato, 1 mM EDTA pH: 8,0), este fue teñido con 5uL de intercalante SYBR Green y una vez solidificado se sumergió completamente en buffer TAE1X dentro de la cámara de electroforesis.

Cada pozo del gel se inoculó con 6uL de la muestra de ADN junto con 2uL de buffer de carga 6X, se utilizó un marcador de 100pb como referencia, el control positivo fue los amplificadores obtenidos del ADN de una cepa de referencia para *H. pylori* ATCC 43504 y el blanco un amplificado del mix de reacción con agua grado molecular en lugar de ADN. Las condiciones de corrida fueron: una precorrida de 20 min a 30 V y una corrida final de 1 h y 40 min a 60 V. El gel se observó bajo luz ultravioleta UV en un transiluminador UV y fotografiado con una cámara digital para su posterior análisis (Pazos, Cerón , & Bravo, 2011).

4.3.2. Ensayos para detectar la CMI de cada extracto obtenidos de aguacate

El siguiente protocolo se realizó según las descripciones del manual: Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución (MIC testing) (Malbrán, 2012). El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) la cual en este estudio será definida como concentración más baja del extracto del aguacate que puede inhibir el crecimiento visible de *H. pylori* después de seis días de incubación en condiciones de microaerofilia.

4.3.2.1. Preparación de soluciones STOCK: Se preparó una solución STOCK para cada extracto crudo y purificado obtenido, la concentración de esta solución inicial para cada extracto fue de 24.000 ppm, para lo cual se pesó 0,6 g de la muestra en una balanza analítica y se disolvieron inicialmente en un beaker de 50 mL con 10 mL de agua destilada estéril, esto se hizo con la ayuda de un magneto sobre la plancha de agitación sin aumentar la temperatura. Una vez disuelto se pasó el contenido a un balón aforado de 25 mL y se completó

el aforo con agua destilada estéril, se trasvasó el contenido a un tubo falcón estéril y se lo colocó en luz UV toda la noche para esterilizar el contenido. Al día siguiente, estos tubos se los cubrió en papel aluminio y para evitar algún tipo de degradación ocasionado por la luz ambiental y finalmente se conservaron estas muestras a -80 °C en el Freezer del laboratorio.

4.3.2.2. Preparación de medios de cultivo: se preparó el medio agar Mueller Hinton este se suplementó con el 10 % de sangre desfibrinada de cordero, 1 % del suplemento Isovitalax y la cantidad en mililitros requerida de cada extracto para cada concentración que se desea analizar (Tabla 4). Inicialmente se prepararon los agares y se llevaron a esterilización en autoclave a 121°C y 15 PSI durante 15 minutos, luego en la cabina con los mecheros de gas encendidos se añadieron al medio la cantidad de volumen indicada para Isovitalax, extracto y finalmente la sangre de cordero, para finalizar se sirvieron en cajas petri pequeñas desechables (10 mL por caja) y se dejó solidificar los medios. Para realizar el control de esterilidad de los medios se tomaron cajas al azar y se colocaron en incubación a 37° C por 24h con el fin de evaluar la presencia de contaminantes.

Tabla 4. Concentraciones del medio de cultivo para las diluciones de los extractos polifenólicos de aguacate.

Dilución	Agar Mueller Hinton	Vol de Agua destilada	Vol del extracto	Vol del suplemento Isovitalex	Vol de Sangre de cordero	Concentración final de los extractos en ppm	Vol final*
1	1,4 g	19,5 mL	7,5 mL	0,3 mL	3 mL	6.000 ppm	30,3 mL
2	1,4 g	23,25 mL	3,75 mL	0,3 mL	3 mL	3.000 ppm	30,3 mL
3	1,4 g	25,12 mL	1,87 mL	0,3 mL	3 mL	1.500 ppm	30,3 mL
4	1,4 g	26,06 mL	0,93 mL	0,3 mL	3 mL	750 ppm	30,3 mL
5	1,4 g	26,53 mL	0,468 mL	0,3 mL	3 mL	375 ppm	30,3 mL

* El volumen final fue de 10 mL en cada caja Petri, logrando así que cada dilución se evalué por triplicado. Fuente: Este estudio.

4.3.2.3. Inoculación de los aislados de *H. pylori*: La inoculación de estos medios se llevó a cabo con el sobrante de las biopsias utilizadas en el procedimiento de activación de *H. pylori* explicado anteriormente. Con un asa de argolla calibrada (10uL) se toma la muestra y se la extiende en el agar, realizando un sembrado masivo. Estas cajas se incubaron en condiciones de microaerofilia en incubadora de CO₂ a 37 °C durante seis días, se realizó una revisión a los cuatro y seis días para evaluar la CMI de cada extracto ensayado. Como control positivo se tomó una cepa ATCC 43504 de *H. pylori*, como control de crecimiento una caja con medio base sin el extracto e inoculada con las biopsias ensayadas.

4.4. Objetivo específico 3: Determinar la mejor capacidad inhibitoria *in vitro* de *H. pylori* de las fracciones polifenolicas obtenidas del extracto de epicarpio o semilla del aguacate (*P. americana* var. *Hass*)

4.4.1. Activación de la biopsia para aislamiento de *H. pylori*.

Se seleccionó la biopsia AP018 para obtener los aislados de *H. pylori* y poder probar el efecto inhibitorio de las fracciones obtenidas del extracto purificado de semilla. Este material biológico fue descongelado a temperatura ambiente y colocado en un ependorff de 1.5 ml estéril que contenía previamente 200 µl de solución salina estéril al 0.89 % de NaCl y se procedió a su respectiva maceración. Este contenido sirvió para los ensayos antagónicos e identificación de los aislados. La identificación se realizó de manera bioquímica y molecular, como se explicó anteriormente.

4.4.2. Detección de la CMI de cada fracción obtenida del extracto purificado de aguacate

Se prepararon soluciones STOCK de cada fracción obtenida a una concentración de 24.000 ppm, como solo se trabajó con una biopsia, el volumen de esta solución fue menor que el preparado para los anteriores ensayos con los extractos crudos y purificados. Una vez preparada y esterilizada las soluciones stock se almacenaron en nevera a 4 °C hasta su posterior uso. Se hizo uso de medio agar Muller Hinton para la preparación de los medios de cultivo,

suplementado con 10 % de sangre desfibrinada de cordero, 1 % de isovitalex, más el volumen requerido para cada dilución teniendo en cuenta la Tabla 4.

Posteriormente se inoculo la biopsia en los medios preparados, para lo cual se hizo uso de un asa de argolla calibrada (10uL) para tomar la muestra y extenderla sobre el agar, realizando un sembrado masivo. Estas cajas se incubaron en condiciones de microaerofilia en incubadora de CO₂ a 37 °C durante seis días, se realizó una revisión a los cuatro y seis días para evaluar la CMI de cada fracción ensayada.

4.5. Diseño experimental.

El diseño experimental para la detección de la CMI de los extractos crudos y purificados de epicarpio y semilla del aguacate sobre *H. pylori*, consistió en el uso de la caja de Petri como unidad experimental, se hizo el uso de dos factores, el primer factor fue Tipo de Extracto con cuatro niveles, Extracto Crudo de Epicarpio (ECE), Extracto Crudo de Semilla (ECS), Extracto Purificado de Epicarpio (EPE) y Extracto Purificado de Semilla (EPS) y el segundo factor fue la Concentración con 5 niveles, 6000, 3000, 1500, 750 y 375 en unidades de partes por millón (ppm) y por último, la variable dependiente fue el crecimiento de cuatro aislados de *H. pylori* AP026, AP016, AP028 y AP030 evaluados sobre la unidad experimental y medidos en unidades formadoras de colonia (UFC), cada interacción de los factores se hizo por cuadruplicado.

El diseño experimental para la detección de la CMI de las fracciones obtenidas del estrato con mejor inhibición de *H. pylori*, consistió en el uso como unidad experimental de la

caja Petri, se hizo el uso de dos factores, el primer factor fue Tipo de fracción con dos niveles, Fracción 2 (F2) y Fracción 3 (F3) y el segundo factor fue la Concentración con 5 niveles, 6000, 3000, 1500, 750 y 375 en unidades de partes por millón (ppm) y por último, la variable dependiente fue el crecimiento del aislado de *H. pylori* AP018 evaluado sobre la unidad experimental y medido en unidades formadoras de colonia (UFC), cada interacción de los factores se hizo por cuadruplicado.

Para el conteo de las colonias bacterianas tanto de las diluciones de cada extracto y fracciones para semilla y epicarpio se hizo uso de la aplicación APD Colony Counter App Liteel (Wong, Yeo, & Gan, 2016) y se reportó en unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos de las UFC por dilución, extracto y fracción se organizarán en tablas del programa Excel 2010, se determinó la actividad antibacterial de los extractos, donde se tuvo como variable respuesta o dependiente la actividad antibacterial (Y), que representa la CMI y como variable independiente (X), la estructura de origen de los extractos con cinco niveles: 1. Semilla 2. Epicarpio 3 Extracto crudo 4 Extracto Rico en Polifenoles y 5 Fracciones Polifenolicas. Las diluciones de los polifenoles son la unidad experimental en este ensayo.

Para determinar los efectos de las interacciones entre las variables dependiente e independientes (Y y X), se empleó una prueba estadística ANOVA con el fin de establecer diferencias significativas entre las varianzas del efecto antibacterial según origen de los polifenoles en el crecimiento de *H. pylori*. Se realizó gráficos de interacciones con barras de error al 95% de confianza para explicar las diferencias encontradas entre las variables independientes y una prueba de Tukey para evaluar la representatividad de las diferencias entre

las variables con respecto al número de colonias de *H. pylori*, estas pruebas se ejecutaron en el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 2.4.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La gran variedad de climas, condiciones ambientales, gradientes altitudinales, la topografía, la exposición al sol, entre otras variables que posee el departamento de Nariño, han permitido el desarrollo agronómico de diferentes cultivos con importancia económica y social. Uno de ellos es el cultivo de aguacate, el cual, en los últimos años ha manifestado una relevancia en ámbitos de producción y exportación tanto para el departamento como para el país. De esta manera, se ha impulsado el desarrollo de investigaciones encaminadas al aprovechamiento de este fruto en diferentes ámbitos, cuyo objeto permita encontrar un valor agregado a este producto con el fin de seguir promoviendo la producción y el crecimiento económico de este cultivo. Bajo este contexto, los resultados obtenidos en esta investigación fueron exitosos, dado que se pudo inhibir la actividad de *H. pylori* con los diferentes extractos obtenidos de aguacate, siendo los extractos obtenidos de la semilla los que mejores resultados presentaron. A continuación, se describen los resultados obtenidos en esta investigación.

5.1. Obtención de extractos de aguacate

Para la obtención de los extractos se recolectaron en total 38 frutos de aguacate en estado óptimo de cosecha, los cuales correspondieron con la descripción botánica de Bernal y otros (2014), Es un fruto ovalado, de tamaño pequeño a mediano, posee corteza gruesa con textura de corcho y superficie áspera. Presenta un color verde oscuro cuando está en el árbol, al madurar se torna de color púrpura. La semilla tiene un tamaño mediano y es redondeada; a su vez, la pulpa, a mediados y finales del proceso de maduración, es de color crema amarilla. El peso de

los 38 frutos evaluados fue de 7.229,253 g, de los cuales el 70 % de este peso correspondió a la pulpa del fruto, estos resultados se pueden observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Peso promedio de los frutos y porcentaje de semilla y epicarpio presente en cada uno.

Peso Fruto (g)	Peso semilla (g)	Peso epicarpio (g)	% semilla	% epicarpio
180,131	29,11	23,80	17,1	13,21

Fuente: Este estudio.

En las muestras de aguacate colectadas se determinó que en el fruto el porcentaje promedio en peso de semilla fue de 17,1 % y el 13,21 % para epicarpio, un porcentaje significativo, que se considera relevante ya que dichos tejidos vegetales son considerados como producto de desecho, pero pueden ser una potencial fuente de compuestos bioactivos. Estos resultados son acordes con los valores reportados para aguacates producidos en alturas mayores a 2000 m.s.n.m que tiene mayor contenido de pulpa (60 a 70 %) y se caracterizan por tener una menor proporción de semilla y epicarpio (Bernal, 2016).

Tras procesar el material por maceración química durante 24 horas, en una solución de Metanol – Agua (80:20) y realizar su respectiva liofilización se obtuvo aproximadamente 24 g de ECS y 21 g de ECE. De cada uno de estos extractos crudos se usó 16 gramos para purificación y se obtuvo 3,707 g de EPS y 6,665 g de EPE, en la tabla 6 se observan con más detalle los resultados.

Tabla 6. Peso liofilizado de los extractos crudos (EC) y purificados (EP) de semilla y epicarpio.

Tejido vegetal	EC (g)	Rendimiento cada		Rendimiento cada 1 g extracto crudo liofilizado
		100 g material crudo procesado	EP (g)	
Semilla	24,995	2,15 g	3,707	0,24g
Epicarpio	21,621	2,05 g	6,665	0,42

EC: Extractos crudos; EP: Extractos purificados. Fuente: Este estudio

Los resultados obtenidos después del proceso de liofilización concuerdan con los reportados por Basante (2016), sin embargo, el peso obtenido en esta investigación fue mayor que el obtenido por Basante, esto se debe al proceso de secado de las muestras, en la investigación citada se reporta el uso de plancha de calentamiento, el cual es mucho menos eficiente que el proceso de liofilización usado en esta investigación. La liofilización es un proceso que consiste en la eliminación de agua de un determinado producto a través de la sublimación, esto consiste de tres pasos: El primer paso es la congelación previa del producto, para posteriormente sublimar el hielo, a baja presión, y finalmente terminar de eliminar el agua no congelada por evaporación; el uso de bajas presiones permite que ambos procesos ocurran a bajas temperaturas, lo que conlleva la disminución de la actividad del agua del producto, manteniendo significativamente inalteradas las propiedades físicas y fisicoquímicas (Hurtado, 2015).

Como se observa en la Tabla 6, las cantidades obtenidas de los EC fueron mayores a las EP, tanto para semilla como para epicarpio. Esto se debe a que, los procesos de extracción

implican la co-extracción de sustancias no fenólicas, como azúcares, sales, ácidos orgánicos, proteínas, grasas y clorofilas, que pueden interferir con los análisis posteriores y por lo tanto es necesario eliminarlos (Ignat , Volf , & Popa , 2013). Razón por la cual, se hizo uso de un proceso de retención selectiva sobre Amberlita XAD-7, así, se pudo eliminar gran parte de estos componentes y se pudo obtener extractos de menor masa, pero con una composición menos compleja y de mayor concentración de estos compuestos de interés.

La resina amberlita XAD-7, es un polímero adsorbente no iónico constituido por etilen glicol- dimetacrilato, el tamaño de partícula es de 20-60 mallas con un área superficial de 450 m²g⁻¹ y un diámetro de poro de 90 Å. Presenta una estructura moderadamente hidrofílica y estructura macroporosa con carácter moderadamente polar, que se utiliza para la recuperación de compuestos polares (Nuñez, Saucedo, Navarro, Avila, & Guibal , 2008).

Los resultados del fraccionamiento de los extractos purificados de semilla, se observan en la Tabla 7. El número de fracciones mayoritarias obtenidas en esta investigación, coincide con las reportadas por Basante (2016) y Rosero et al., (2019). Sin embargo, solo dos de las tres fracciones mayoritarias obtenidas (F2 y F3) contaron con el peso mínimo requerido para la preparación de las soluciones STOCK utilizadas en los respectivos ensayos antagónicos, razón por la cual solo se comparó la capacidad inhibitoria de *H. pylori* de estas dos fracciones.

Tabla 7. Pesos obtenidos del fraccionamiento de extractos purificados de semilla.

EP semilla (g)	F1 (g)	Porcentaje de rendimiento	F2 (g)	Porcentaje de rendimiento	F3 (g)	Porcentaje de rendimiento
3,707	0,126	3,4 %	0,3638	9,81 %	0,531	14,32 %

F1: Fracción 1 (Metanol 30 %); F2: Fracción 2 (Metanol 60 %) y F3: Fracción 3 (Acetona 60 %). Fuente: Este estudio.

La obtención de fracciones fue a través de la técnica de cromatografía de exclusión por tamaño, esta consiste en la separación de moléculas de acuerdo a su tamaño a través de un gel como fase estacionaria, este gel dextrano tiene alta afinidad por moléculas polares, en este tipo de técnica quedarán mayormente retenidas las moléculas de mayor tamaño mientras que moléculas más pequeñas migran rápidamente a través de los espacios entre las partículas del gel. La retención de las partículas se da por afinidad, entre más grandes sean las moléculas mayormente serán retenidas en la fase estacionaria (Gutiérrez-Bouzán, Burdó, & Cegarra, 2009). De esta manera la fracción F3 es la fracción más pesada seguida de por F2 y F1. En la figura 4 se observan los respectivos perfiles UV-Vis de las tres fracciones mayoritarias obtenidas en este estudio.

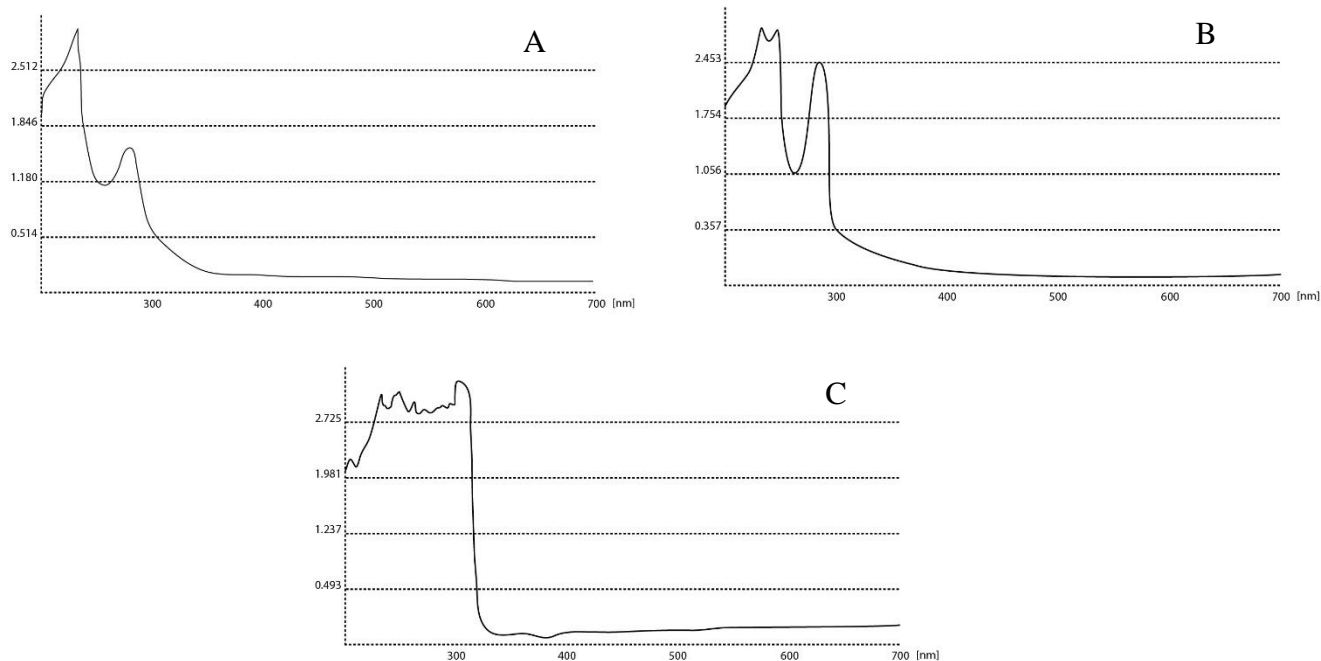


Figura 4. Perfiles UV-Vis de las tres fracciones mayoritarias obtenidas de los extractos purificados de semilla. Se puede distinguir patrones UV- Vis claramente diferenciables entre las fracciones mayoritarias obtenidas, con un máximo de absorción de 280 nm para la Fracción 1, 300 nm para la Fracción 2 y 320 nm para la fracción 3. A: Fracción 1; B: Fracción 2; C: Fracción 3. Fuente. Este estudio.

5.2. Activación e identificación aislados *H. pylori*.

Las biopsias usadas en esta investigación contaron con los criterios mencionados en el Manual de Genotipificación de *H. pylori* (Pazos, Cerón , & Bravo, 2011), a partir de estas se pudo obtener satisfactoriamente los aislados de *H. pylori* usados para los ensayos antagónicos de esta investigación (Tabla 8).

Tabla 8. Biopsias elegidas para la realización de los ensayos antagónicos.

MUESTRA	CODIGO	DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO	TINSIÓN GIEMSA	CRECIMIENTO	ENSAYO ANTAGÓNICOS
1	AP016	Gastritis crónica activa asociada a <i>H. pylori</i>	Positivo para <i>H. pylori</i>	Abundante y puro	Extractos crudos y purificados
2	AP026	Gastritis crónica activa asociada a <i>H. pylori</i>	Positivo para <i>H. pylori</i>	Abundante y puro	Extractos crudos y purificados
3	AP028	Gastritis crónica activa asociada a <i>H. pylori</i>	Positivo para <i>H. pylori</i>	Abundante y puro	Extractos crudos y purificados
4	AP030	Gastritis crónica activa asociada a <i>H. pylori</i>	Positivo para <i>H. pylori</i>	Abundante y puro	Extractos crudos y purificados
5	AP018	Gastritis crónica activa asociada a <i>H. pylori</i>	Positivo para <i>H. pylori</i>	Abundante y puro	Fraciones de semilla

Fuente: Este estudio

Las cinco muestras seleccionadas dieron positivo en las pruebas bioquímicas (Anexo 1: Pruebas de identificación bioquímica) y el crecimiento bacteriano macroscópico fue compatible con *H. pylori* (Anexo 2: Crecimiento microscópico de *H. pylori*). A continuación, los resultados se exponen en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados macroscópicos y pruebas bioquímicas para *H. pylori*.

Biopsia (código)	Resultado macroscópico del aislado	Resultados pruebas bioquímicas de los aislados			
		Prueba Ureasa	Prueba Oxidasa	Prueba Catalasa	Tinción de Gram
AP016	Colonias pequeñas, translúcidas, a manera de gotas de rocío	Positivo	Positivo	Positivo	Bacilos Gram negativos pleomorficos curvos abundantes compatibles con <i>H. pylori</i>
AP026	Colonias pequeñas, translúcidas, a manera de gotas de rocío	Positivo	Positivo	Positivo	Bacilos Gram negativos pleomorficos curvos abundantes compatibles con <i>H. pylori</i>
AP028	Colonias pequeñas, translúcidas, a manera de gotas de rocío	Positivo	Positivo	Positivo	Bacilos Gram negativos pleomorficos curvos abundantes compatibles con <i>H. pylori</i>
AP030	Colonias pequeñas, translúcidas, a manera de gotas de rocío	Positivo	Positivo	Positivo	Bacilos Gram negativos pleomorficos curvos abundantes compatibles con <i>H. pylori</i>
AP018	Colonias pequeñas, translúcidas, a manera de gotas de rocío	Positivo	Positivo	Positivo	Bacilos Gram negativos pleomorficos curvos abundantes compatibles con <i>H. pylori</i>
ATCC	Colonias pequeñas, translúcidas, a manera de gotas de rocío	Positivo	Positivo	Positivo	Bacilos Gram negativos pleomorficos curvos abundantes compatibles con <i>H. pylori</i>

Fuente: Este estudio

En la anterior tabla se describen los resultados de identificación de los aislados provenientes de las cinco biopsias anteriormente elegidas junto con los resultados de la cepa ATCC control, mostrando resultados positivos para *H. pylori*, en cuanto a la descripción macroscópica de las colonias, la morfología visual es compatible con las realizadas por Pazos y colaboradores (2011).

En cuanto a la identificación molecular, inicialmente se extrajo ADN haciendo uso del kit: Extracción de ADN genómico “GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit Protocol (NA2100)” el cual permitió extraer 200 uL de ADN de cada aislado y que se encuentra conservado a -20 °C en freezer de laboratorio para investigaciones futuras. Un pequeño volumen

de este ADN fue usado para medir su pureza y concentración en el equipo NanoDrop-2000 (Thermo Scientific®) (Tabla 10) y otra parte para la realización de la identificación molecular por técnica de PCR.

Tabla 10. Cuantificación de ADN por espectrofotometría en NanoDrop-2000

Aislado	Concentración (ng/uL)	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
AP016	28,2	1,84	1,77
AP026	32,0	1,79	1,82
AP028	35,3	1,83	1,76
AP030	31,7	1,82	1,79
AP018	29,4	1,83	2,00
ATCC	30,2	1,85	1,82

Fuente: Este estudio

Los resultados obtenidos de la cuantificación por espectrofotometría de ADN de los aislados de *H. pylori* indican que las muestras corresponden a moléculas de ADN, esto se observa en los valores de absorbancia obtenidos cercanos a 1,8 dentro del rango de absorbancia 260/280, tal como lo describen Desjardins, P & Conklin, D, (2010) , además estos autores sugieren que la pureza del material genético debe evaluarse en el rango de absorbancias 260/230, cuyos valores de pureza deben oscilar entre 1,8 y 2,2, como se puede ver en la tabla los valores estan dentro de este rango de pureza, concluyendo que las muestras analizadas no presentan contaminantes como proteínas o fenoles derivados del proceso de extracción.

En cuanto a la identificación por PCR los resultados fueron positivos, dado que en el gel de electroforesis se pudo revelar bandas unicas para cada aislado, incluido la cepa ATCC (Control positivo), con un tamaño de 167 pb (Figura 5) tamaño específico del fragmento esperado del gen *UreA* (Pazos, Cerón , & Bravo, 2011).

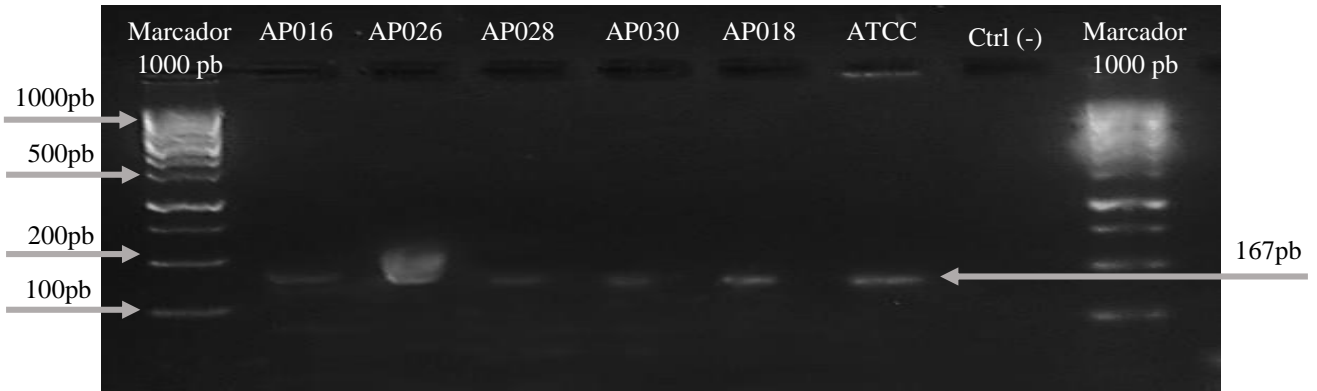


Figura 5. Electroforesis del gen estructural *UreA* *H. pylori*. Gel de agarosa al 1.5 %, teñido con SYBR Green, Marcador molecular de 100 pb (Hyper Ladder™ 100 pb Bioline); blanco agua grado molecular MoBio™ (MiliQ). Región amplificada Gen *ureA* de *H. pylori* (167 pb). Pb: pares de bases. Fuente: Este estudio.

5.3. Inhibición de extractos crudos y purificados de la semilla y epicarpio del aguacate *Hass* sobre *Helicobacter pylori*.

Tras realizar el conteo de las colonias de bacterianas que crecieron en las cajas Petri (Anexo 3: Tabla de datos del conteo de UFC de los extractos crudos y purificados), se evidencia que tanto los extractos crudos como purificados de semilla y epicarpio tienen un efecto inhibitorio sobre *H. pylori*, teniendo como referencia el crecimiento de la bacteria en un medio sin extractos cuyos valores fueron superiores a 300 colonias (UFC >300), siendo los extractos

purificados los que más inhibición presentaron, al reducir a cero el crecimiento de *H. pylori* en concentraciones de 3000 ppm. Los análisis estadísticos ANOVA (Tabla 11), Suma de cuadrados para las variables independientes (Tabla 12), y la prueba de HSD Tukey (Figura 7) empleados evidencian diferencias significativas entre la capacidad inhibitoria de los extractos y frente al control, siendo el extracto purificado de semilla (EPS), el que más redujo el crecimiento de la bacteria, la CMI de este extracto fue de 3000 ppm, menor a la CMI obtenida de los extractos crudos la cual fue de 6000 ppm.

Tabla 11. Análisis ANOVA de las variables independientes extractos y concentraciones de aguacate frente al crecimiento como variable dependiente.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	5,7356E6	24	238983,	641,39	0,0000
Residuo	139725,	375	372,601		
Total (Corr.)	5,87533E6	399			

R-Cuadrada = 97,6218 %. Fuente. Este estudio.

Esta tabla resume los resultados de ajustar el modelo estadístico que relaciona la variable dependiente Crecimiento con los dos factores predictivos, Concentración y Tipo de Extracto. Dado que el valor-P es menor que 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre Crecimiento y las variables Concentración y Tipo de Extracto con un nivel de confianza del 95,0%. Con lo cual se confirma la hipótesis de investigación, es decir los extractos presentan un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori*. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 97,6218% de la variabilidad en Crecimiento. Este análisis fue complementado con la prueba estadística conocida como Suma de Cuadrados tipo III, (Tabla 12).

Tabla 12. Suma de cuadrados para las variables tipo de extracto y concentración.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tipo de extracto	4,88064E6	4	1,22016E6	3274,71	0,0000
Concentración	610554,	4	152638,	409,66	0,0000
Tipo de extracto* Concentración	244409,	16	15275,6	41,00	0,0000
Residuo	139725,	375	372,601		
Total (corregido)	5,87533E6	399			

Con este análisis para la variable dependiente Crecimiento se prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0,0000, que corresponde a Tipo de extracto* Concentración. Dado que el valor-P es menor que 0,05, ese término es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0%. De esta manera se confirma que las interacciones de ambas variables independientes aportan significativamente a la inhibición de *H. pylori*. La reducción del crecimiento bacteriano se hace evidente en la figura 6, referente al Crecimiento en UFC Eje (Y) Vs. Concentración de polifenoles en ppm eje (X), de los extractos crudos y purificados tanto de la semilla como del epicarpio del aguacate.

Gráfica de Interacciones

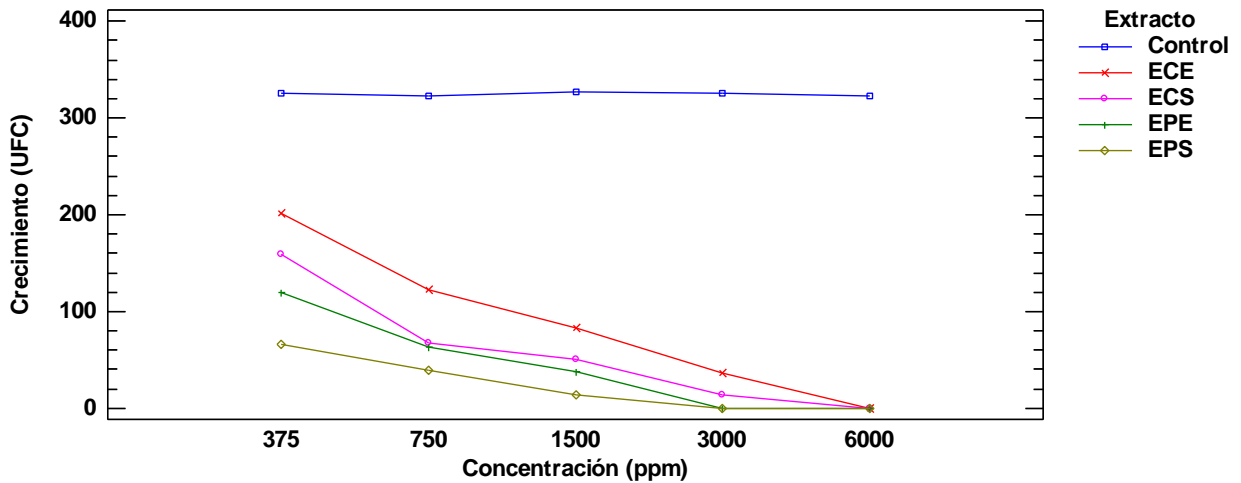


Figura 6. Efecto inhibitorio de extractos polifenólicos crudos y purificados de la semilla y epicarpio del aguacate sobre el crecimiento de *H. pylori*. Se puede observar una reducción del número de UFC con cada tipo de extracto a medida que aumenta su concentración, siendo los extractos purificados los que presentaron una inhibición significativamente mayor ($P < 0,05$ a partir del análisis estadístico ANOVA y la suma de cuadrados para las variables) que los extractos crudos con respecto a un control del crecimiento de los aislados de *H. pylori* en medios de cultivo sin concentraciones polifenolicas. ppm: partes por millón; UFC: unidades formadoras de colonias; ECE: extracto crudo de epicarpio; ECS: extracto crudo de semilla; EPE: extracto purificado de epicarpio; EPS: extracto purificado de semilla. Fuente. Este estudio.

Medias y 95,0% Intervalos HSD de Tukey

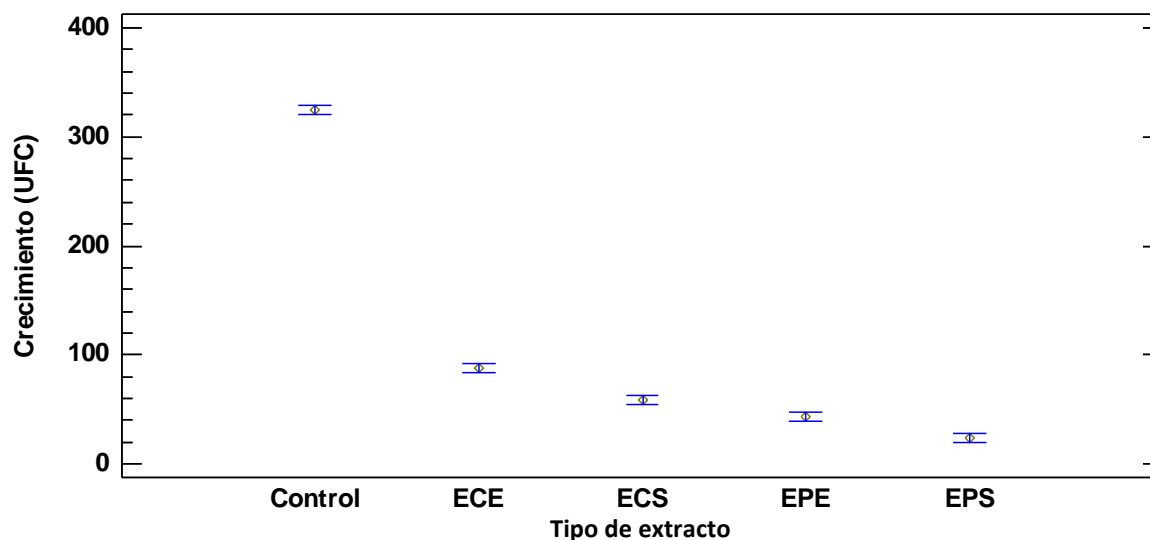


Figura 7. Efecto de extractos crudos y purificados de la semilla y epicarpio del aguacate sobre las medias de UFC de *H. pylori*. Se evidencia que todos los tipos de extractos se diferencian significativamente entre sí ($P < 0,05$ a partir del análisis estadístico HSD Tukey). Siendo el EPS los que más inhiben a *H. pylori* (Media de UFC = 20), seguida de EPE (Media de UFC = 35), ECS (Media de UFC = 60) y ECE (Media de UFC = 90) con respecto a un control del crecimiento de los aislados de *H. pylori* en medios de cultivo sin concentraciones polifenolicas. UFC: unidades formadoras de colonias; ECE: extracto crudo de epicarpio; ECS: extracto crudo de semilla; EPE: extracto purificado de epicarpio; EPS: extracto purificado de semilla. Fuente. Este estudio.

En el presente estudio los EC y EP de semilla y epicarpio de aguacate inhibieron a *H. pylori*, siendo los EPS los de mayor capacidad inhibitoria del crecimiento del microorganismo y, por ende, estos fueron seleccionados para el proceso de fraccionamiento. Probablemente la composición química de estos extractos es similar a la reportada por Basante (2016) y Rosero

et al (2019), quienes reportan los siguientes compuestos fenólicos identificados por HPLC-MS en los EPS de aguacate variedad *Hass* (Tabla 13).

Tabla 13. Identificación de compuestos fenólicos de los EPS de aguacate var. *Hass* identificados por HPLC-MS

Compuesto	Formula molecular	Compuesto	Formula molecular	Compuesto	Formula molecular
Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido 5-O-cafeoilquínico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido ferulico 2 menor	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Ácido protocatético	C ₇ H ₆ O ₄	Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Procianidina dimérica (B1)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Vainillina	C ₈ H ₈ O ₃	Quercetina-3-O-Glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Catequima	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Acido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	Phloridzin	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀
Procianidina dimérica (B2)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Ácido ferulico1 mayor	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅

Fuente: Basante, 2016; Rosero, Cruz, Osorio, & Hurtado, 2019

De los anteriores compuestos, según literatura se reporta al ácido quínico, ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido p-cumarico con características antibacterianas. El ácido quínico es un poliol que unido a esteres del ácido elágico forman elagitaninos, Se han reportado más de 500 estructuras de elagitaninos, cuya fuente principal es la corteza de árboles como el roble (*Quercus* sp) y dentro frutos de baya como fresas, arandanos, frambuesas, moras, nueces y raíces de diferentes plantas los cuales, han sido estudiados por su potencial antimicrobiano (Sepúlveda, y otros, 2013)

Govindarajan y otros (2006), realizaron un estudio sobre la actividad antiúlceras y antimicrobiana de la planta *Anogeissus latifolia* en el este de Camerún, inicialmente

encontraron por análisis HPTLC un 0,25 % de p/p de elagitaninos en el material procesado, los resultados del estudio indican una actividad de protección gástrica que se manifestó en la inhibición de la formación de úlceras inducidas por métodos químicos y físicos, además de presentar una buena actividad antimicrobiana sobre *Micrococcus luteus.*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Cryptococcus albidus*, *Aspergillus flavus* y *Trycophyton rubrum*.

El ácido cafeico es el ácido hidroxicinámico de mayor distribución en la naturaleza al estar presentes en una gran variedad de plantas, inclusive en algunos hongos como *Phellinus linteus*, su enorme distribución se debe a que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, una de las principales formas de biomasa en el planeta. Los hidroxinámicos pertenecen al grupo de compuestos fenólicos simples (C3-C6) que tienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo (OH), El ácido cafeico tiene una variedad de efectos farmacológicos potenciales en estudios *in vitro*, uno de ellos el potencial antimicrobiano (Granado, 2010).

En un estudio similar a esta investigación donde se evaluó la CMI de un extracto de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), Prado y colaboradores (2013), reportan la evidencia de actividad antimicrobiana de extractos etanolicos y metanolicos de esta planta contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* y *Escherichia coli*. Todos los microorganismos a excepción de *E. coli* fueron inhibidos con estos extractos, siendo el extracto etanolic con mayor cantidad de contenido fenólico total (193,9 g. EAG/kg)

el que mayor inhibición presento. Al realizar un análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CG-EM) a este extracto, se determinó que estaba compuesto principalmente de ácido cafeico y 3-O-cafeoilquínico.

El ácido 5-O-cafeoilquínico o ácido clorogénico pertenece a un vasto grupo de ácidos hidroxicinámicos presentes en la pared celular vegetal, que por lo general se encuentran esterificados a esta, lo que les otorga una baja solubilidad, a menos, de que se presenten en forma de ácido clorogénico cuya solubilidad aumenta. Se ha descrito que extractos de diferentes frutas con contenidos de ácidos clorogénicos poseen una importante actividad antimicrobiana contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Chaves-Ulate & Esquivel-Rodríguez, 2019).

Cabe resaltar que si bien, hace tiempo se tenía evidencia científica del efecto antimicrobiano de estos compuestos, fue hace poco que Lou y colaboradores (2011) establecieron que dicha actividad es el resultado de intercambios irreversibles en la permeabilidad de la membrana celular, lo que conlleva a la pérdida de potencial de la misma, desencadenando apoptosis celular.

Por último, el ácido p-cumarico se encuentra esterificado o de forma libre en muchas frutas, vegetales y gramíneas, este ácido ha adquirido gran interés por sus propiedades quimioprotectoras, antioxidantes y antibacterianas. Lou y colaboradores (2012), encontraron en su investigación que este componente inhibió completamente la actividad bacteriana de patógenos, con una CMI de 10 a 80 ug / mL, el mecanismo de acción de este ácido es el

incremento significativo de la permeabilidad de la membrana, resultando en la pérdida de las funciones de barrera de esta, además encontraron que el ácido p- cumarico se une al anión fosfato del ADN, intercalándose entre las hebras de esta molécula afectando los procesos de replicación, transcripción y expresión del ADN bacteriano.

5.4. Fracciones polifenólicas de extractos purificados de semilla de aguacate sobre el crecimiento de *H. pylori*.

Como se describió anteriormente, se hizo uso de las dos fracciones mayoritarias de EPS que cumplieron con el peso mínimo requerido para preparar las soluciones STOCK y poder realizar los ensayos inhibitorios con las fracciones. Se evidenció una reducción de las UFC y su tamaño (Figura 8) en las concentraciones de 350 ppm y 750 ppm, lo cual, permite afirmar que las fracciones por separado tuvieron una inhibición mucho mayor en comparación a los EP de donde fueron aisladas.

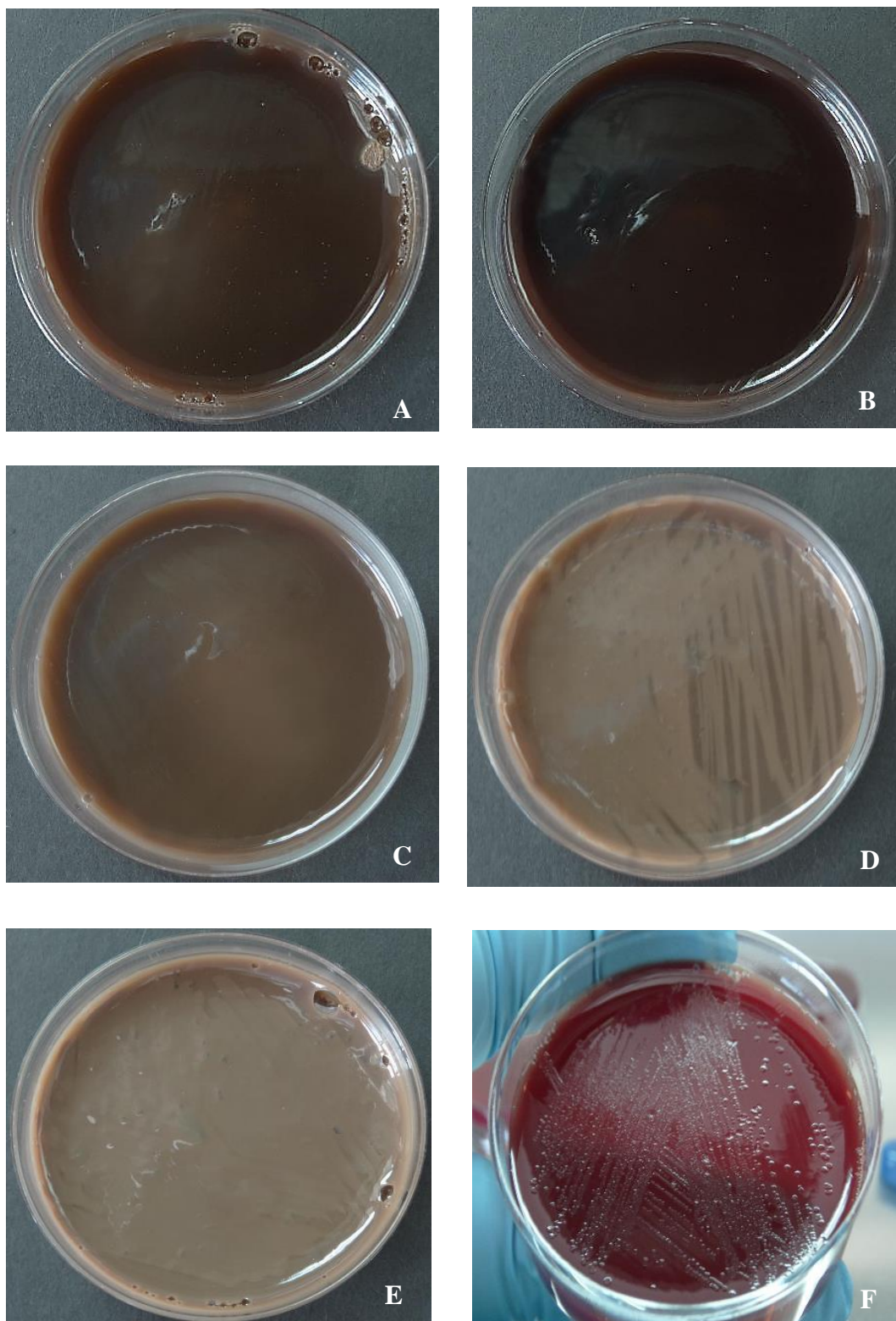


Figura 8. Concentración de fracciones polifenólicas de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre el crecimiento de *H. pylori*. Se puede evidenciar la reducción del crecimiento de la bacteria hasta los valores de cero UFC en 1500 ppm. A: 375 ppm; B: 750 ppm; C: 1500 ppm; D: 3000 ppm; E: 6000 ppm. ppm: partes por millón. Fuente. Este estudio.

La CMI para cada una de las fracciones por separado fue de 15000 ppm cada una (Anexo 4. Tabla de datos del conteo de UFC de las fracciones obtenidas de los EPS) un valor de concentración mucho menor que la CMI encontrada con los EPS (CMI = 3000 ppm) de donde se obtuvieron, teniendo como referencia un control de crecimiento de la bacteria en medio de cultivo sin las fracciones, el cual presentó un crecimiento de más 300 colonias (UFC >300) (Figura 9).

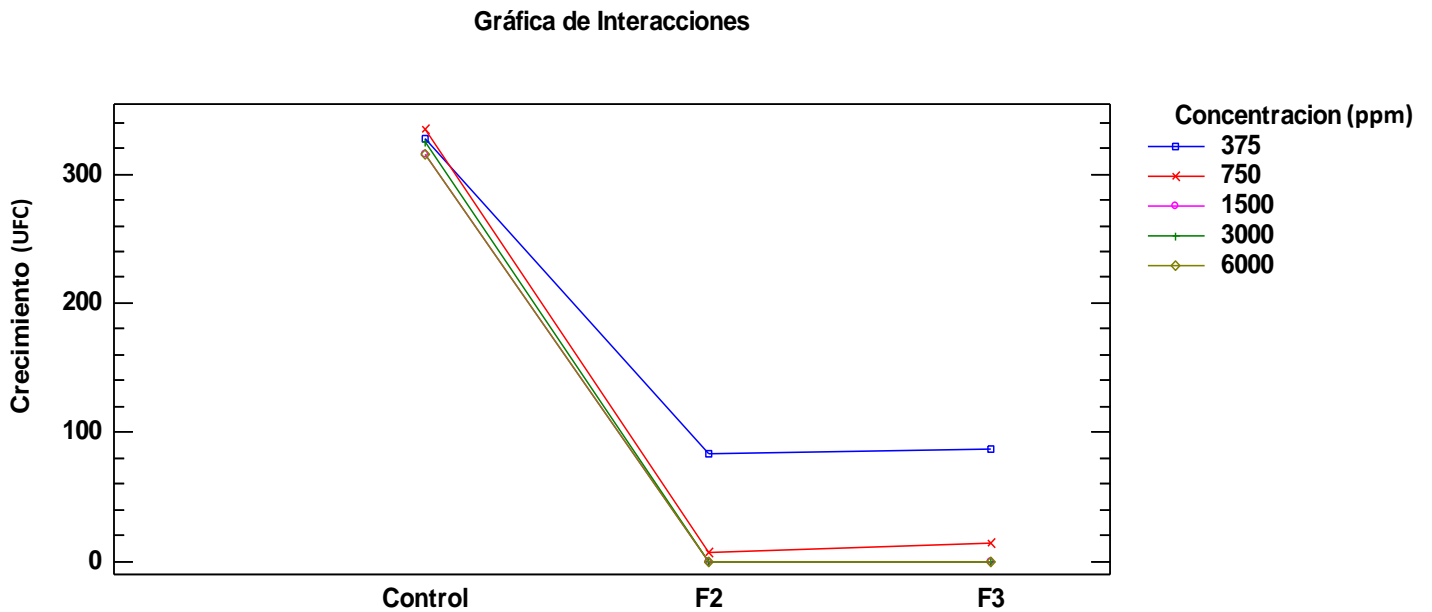


Figura 9. Efecto inhibitorio de las fracciones polifenolicas 2 y 3 de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre el crecimiento de *H. pylori*. Se puede observar que las UFC con ambas fracciones se redujeron a cero a una concentración de 1500 ppm ($P < 0,05$ a partir del análisis estadístico ANOVA y la suma de cuadrados para las variables) con respecto a un control del crecimiento de los aislados de *H. pylori* en medios de cultivo sin concentraciones polifenolicas. ppm: partes por millón; UFC: unidades formadoras de colonias; F2: Fracción 2 (Metanol 60%); F3: Fracción 3 (Acetona 60%). Fuente. Este estudio

Los resultados obtenidos fueron validados estadísticamente ($P = 0,000 < 0.05$) a través de un análisis ANOVA, el cual confirma el potencial inhibitorio de las fracciones obtenidas del extracto purificado de semilla frente al crecimiento de *H. pylori*, (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis ANOVA de las variables independientes fracciones y concentración frente al crecimiento como variable dependiente.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,28042E6	14	91458,7	232,48	0,0000
Residuo	17703,5	45	393,411		
Total (Corr.)	1,29813E6	59			

R-Cuadrada = 98,6362 %. Fuente. Este estudio.

Esta tabla resume los resultados de ajustar un modelo estadístico lineal general donde se relaciona el Crecimiento con los factores Tipo de fracción y Concentración. Dado que el valor-P en la tabla es menor que 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre Crecimiento y las variables Tipo de fracción y Concentración, con un nivel de confianza del 95,0%. Lo que permite confirmar que estas fracciones presentan un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori*. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 98,6362% de la variabilidad en Crecimiento Este análisis fue complementado con la prueba estadística conocida como Suma de Cuadrados tipo III, (Tabla 16).

Tabla 15. Suma de cuadrados para las variables tipo de fracción y concentración.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Fracción	1,23469E6	2	617347,	1569,22	0,0000
Concentración	32512,1	4	8128,03	20,66	0,0000
Fracción*	13215,4	8	1651,93	4,20	0,0008
Concentración					
Residuo	17703,5	45	393,411		
Total (corregido)	1,29813E6	59			

Esta tabla para Crecimiento prueba la significancia estadística de cada factor Tipo de fracción y concentración conforme fue introducido al modelo. Se puede observar que el valor-P más alto es 0,0008, que corresponde a Tipo de fracción * Concentración. Dado que el valor-P es menor que 0,05, ese término es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0%. Consecuentemente, se afirma que existe una relación significativa entre las interacciones de los factores frente al crecimiento de *H. pylori*. Con el fin de evaluar estadísticamente si entre las fracciones hubo diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey (Figura 10).

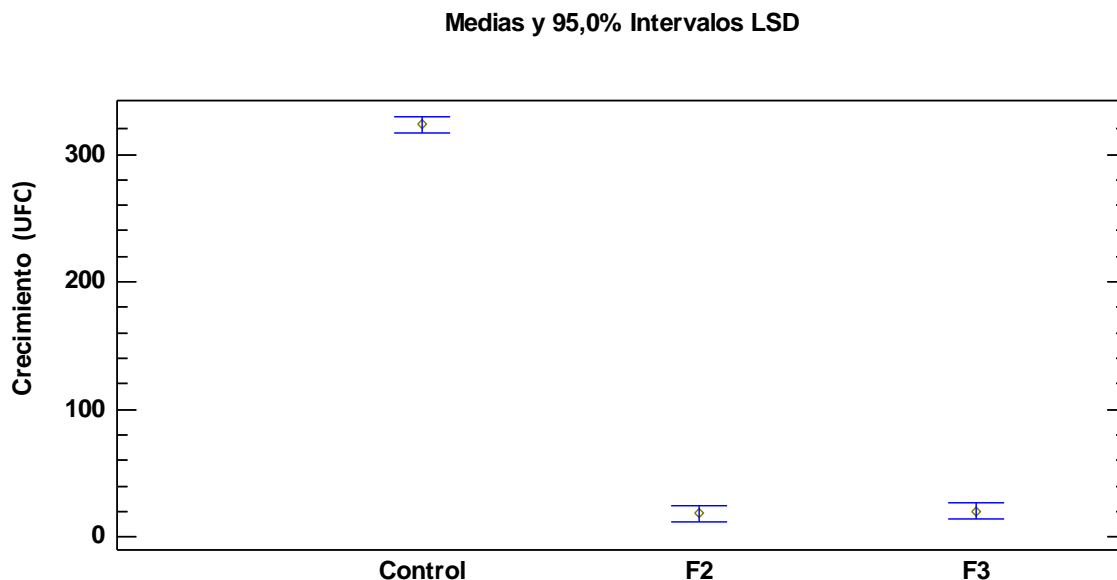


Figura 10. Efecto de las fracciones polifenolicas 2 y 3 de extractos purificados de la semilla del aguacate sobre las medias de crecimiento en UFC de *H. pylori*. Se evidencia que las fracciones no tienen diferencias significativas entre sí, ($P > 0,05$ a partir del análisis estadístico HSD Tukey). Sin embargo, ambas presentan el mismo efecto inhibitorio sobre la bacteria, Fracción 2 (Media de UFC = 12) y Fracción 3 (Media de UFC = 17) con respecto a un control del crecimiento de los aislados de *H. pylori* en medios de cultivo sin fracciones polifenolicas. UFC: unidades formadoras de colonias; F2: Fracción 2 (Metanol 60%); F3: Fracción 3 (Acetona 60%). Fuente. Este estudio

En los resultados de la figura 10 se observa que la fracción F2 y F3 tienen diferencias significativas frente al control. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre ellas, dado que ambas tienen el mismo efecto inhibitorio sobre la bacteria, con una CMI de 1500 ppm mucho menor que la CMI de 3000 ppm obtenida de los EPS. El hecho de que estas fracciones

no presentan diferencias significativas entre sí, probablemente se deba a que ambas fracciones fueron mayormente retenidas en la resina dada su alta polaridad relacionada a su mayor tamaño. Como lo menciona Basante (2016), las moléculas con mayores tamaños presentan mayor actividad antioxidante y por ende pueden tener mayor efecto bactericida.

Otra posible explicación, se puede entender a partir de los componentes químicos que las conforman. Probablemente las fracciones de obtenidas en este estudio cuenten con la misma composición química reportada por Basante (2016) y Rosero *et al.*, (2019) (Tabla 16).

Tabla 16. Componentes químicos de las fracciones 2 y 3 obtenidas de EPS

Fracción 2 (Metanol 60 %)		Fracción 3 (Acetona 60 %)	
Compuesto	Formula molecular	Compuesto	Formula molecular
Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Procianidina dimerica B1	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Procianidina trimerica B	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Diglucósido de quercetina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Procianidina dimerica B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Quercetina 3 O-aribinosil	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Procianidina trimerica B	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈
Quercetina 3 O-ramnosido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇		

Fuente: Basante, 2016; Rosero, Cruz, Osorio, & Hurtado, 2019

Dentro de estos los más importantes son las catequinas, epicatequinas y procianidas, cuyas propiedades antioxidantes han sido objeto de investigación en los últimos años, todos estos pertenecen a un grupo de polifenoles conocido como flavonoles, estos se caracterizan por poseer el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C3. Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. Epicatequina y catequina son los compuestos mayoritarios en frutas (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

En cuanto a las procianidinas, no se ha determinado exactamente el contenido en los alimentos, dado a que poseen pesos moleculares variables, los registros de caracterización de estas hacen referencia principalmente a dímeros y trímeros de catequinas, que representan las formas mayoritarias (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouységu, 2011).

Particularmente en la acción inhibitoria de aguacate sobre *H. pylori* Chávez y col (2011), reportan que las procianidinas obtenidas de *Persea americana* tuvieron un efecto significativo en la desnaturalización de ureasa, principalmente los compuestos de procianidinas con alto peso molecular, inhibiendo un máximo de 61 % de ureasa con los polímeros de epicatequina totales, en este estudio se propone que a medida que aumenta la unión de monómeros formando dímeros, trímeros y polímeros en estas moléculas activas, aumenta el porcentaje de inhibición de ureasa preformada de *H. pylori*.

Parada-Contreras (2016) reporta la actividad inhibitoria de proacianidinas en la ureasa producida por *H. pylori*, concluyendo que el grado de polimerización de todos los tipos de procianidinas provenientes de catequina y epicatequina son factores que influyen en el efecto inhibitorio de uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria, lo que generaría un desbalance en el manejo de la acidez gástrica causándole la muerte. Adicionalmente, los investigadores reportan que estas moléculas causan inhibición en el proceso de adhesión de las bacterias a células gástricas, afectando directamente a las adhesinas que permiten la colonización de las diferentes zonas dentro del estómago.

Similares investigaciones han comprobado que los extractos de productos vegetales que presentan flavonoides y procianidinas mejoran la inflamación gástrica producida por la infección de *H. pylori*, a su vez, las propiedades fenólicas ayudan a controlar la producción de radicales libres de forma natural, también estabilizan la peroxidación lipídica inhibiendo diversos tipos de enzimas oxidantes, reduciendo daños tisulares causados por los radicales libres generados en la infección por la bacteria patógena (Parada-Contreras, V, 2016; Chávez , Aranda , García , & Pastene , 2011; Pastene, Hebel, & García, 2012). Con todos estos múltiples mecanismos de acción de los compuestos polifenólicos del aguacate se abren las puertas a nuevas alternativas de manejo para esta enfermedad y a su vez el impulso productivo y económico a este fruto.

6. CONCLUSIONES

Los extractos polifenólicos crudos y purificados tanto de la semilla como del epicarpio de aguacate (*Persea americana* var. *Hass*) tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro de *Helicobacter pylori*.

Los extractos polifenólicos del aguacate presentaron mayor capacidad inhibitoria de *Helicobacter pylori* que los extractos crudos, siendo los extractos de la semilla del aguacate los de mayor efecto inhibitorio que los del epicarpio.

Las fracciones polifenólicas de la semilla del aguacate presentaron mayor capacidad inhibitoria del crecimiento de *Helicobacter pylori* (CIM=1500 ppm), en comparación a la observada en los ensayos antagónicos con extractos purificados (CIM= 3000 ppm) y extractos polifenólicos crudos (CIM=6000 ppm).

7. RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto citotóxico de las CMI determinadas en esta investigación.

Optimizar a nivel industrial los procesos de obtención de extractos purificados y fracciones de la semilla del aguacate.

Realizar y comparar esta investigación con otras variedades de aguacates cultivados en Nariño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agirrezabala, J., Aizpurua, I., Albizuri, M., Alfonso, I., Armendáriz, M., Barrondo, S., . . . Valverde, E. (2012). Helicobacter Pylori (Hp):Puesta al Día. *INFAC. Información Farmacoterapéutica de la Comarca*, 20(4), 19-24.
- Agronet*. (25 de Julio de 2018). Obtenido de <http://www.agronet.gov.co/Documents/AGUACATE2016.pdf>
- Agudo-Peña, S. (2010). Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por Helicobacter pylori . *Tesis doctoral, Dept, Microbiología*. Madrid: Universidad complutense de Madrid.
- Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., Lopéz, M., & Royo, G. (2004). diagnóstico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori. En L. Manuel, *Procedimientos en microbiología clínica* (págs. 75-105). Madrid: SEIMC.
- Alba R, Toledo R y Viana M. (2006). Helicobacter Pylori: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento. *Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina*(158), 9-12.
- Alfonso, B. (2008). *Manual técnico del cultivo de Aguacate Hass (Persea americana L)*. Tegucigalpa: Centro de comunicación agrícola de la fundación Hondureña de investigación agrícola.
- Arana, J., & Corona, A. (2003). *Cáncer gástrico*. . Cirugía general, centro médico Nacional ISSSTE.
- Barrera, J., Ortega, X., Herrera, J., Zambrano, Y., Benavides, A., Sosapanta, A., . . . Zambrano, L. (2016). *Plan de ordenamiento territorial Municipio Tambo - Nariño*. Tambo: Alcaldía del Tambo -Nariño.
- Barrietos-Priego, A. F., & López-López, L. (2002). Historia y genética del aguacate. En L. L, *Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín*. (págs. 100-121). México: Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate.
- Basante, J. (2016). Estudio de la composición y actividad antioxidante in vitro de la fracción polifenólica de subproductos de aguacate (Persea americana Mill), emilla y epicarpio. *Tesis de pregrado*. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño.
- Bernal, J. (2016). Estudios ecofisiológicos en aguacates cv. Hass en diferentes ambientes como alternativa productiva en Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Bernal, J., Díaz, C., Osorio, C., Tamayo, A., Osorio, W., Cordoba, O., . . . Forero, F. (2014). *Actualización Tecnológica y Buenas Prácticas en el Cultivo de Aguacate*. Bogotá: Corpoica.

- Bravo L, C. A., Bravo, L., Cortés , A., Carrascal, E., Jaramillo, R., García, L., . . . Bravo, P. (2003). *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Medica*, 34(3).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer Journal Clinic*, 1-31.
- Bressani, R., Rodas, B., & Ruiz, A. (2009). *La composición química, capacidad antioxidativa y valor nutritivo de la semilla de variedades de aguacate*. Proyecto FODECYT No 02-2006. Guatemala.
- Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *Idesia*, 27(3), 59-76.
- Cassel-Beraud, A., Le Jan, J., Mouden, J., Andriantsoa, M., & Adriantsiferana, R. (1991). Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity in vitro of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Archives Institut Pasteur Madagascar*, 59, 9-23.
- Castro, M., Romero, C., De Castro, A., Vargas, J., Medina, E., & Mill, R. (2012). Assessment of *Helicobacter pylori* eradication by virgin olive oil. *Helicobacter*, 17(4), 30-41.
- Ceron, C., Yepez, M., & Rivas, G. (2004). Estilos de vida y factores protectores y de riesgo para enfermedad gástrica. Municipio de Nariño Colombia. *Revista Del Centro de Estudios en Salud*, 1(5), 9-24.
- Cervantes-García, E. (2016). *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. . *Revista Latinoamericana de patología clinica y medicina de laboratorio*.
- Chanderbali, A., Soltis, D., & Wolstenholme, B. (2013). Taxonomy and Botany. En B. Schaffer, B. Wolstenholme, & A. Whiley, *The avocado: Botany, Production and Uses* (págs. 2-9). Oxford: CABI Publishing.
- Chaves-Ulate, E., & Esquivel-Rodríguez, P. (2019). Ácidos clorogénicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 299-311.
- Chávez , F., Aranda , M., García , A., & Pastene , E. (2011). Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 10, 265-268.
- Chavez- Alvarez, P. (2011). Evaluacion antioxidante y antimicrobiana en extractos de residuos del aguacate. *Tesis*. Instituto Tecnológico de Sonora.
- COLCIENCIAS. (2013). *Red para la Bioprospección de Frutas Tropicales*. Bogotá.
- Contreras, D. (2014). Expresión y caracterización biológica de un fragmento de anticuerpo scfv anti-mica candidato para el desarrollo de un biofármaco y su posible aplicación en el

- tratamiento del cáncer gástrico. *Profesional de Químico Farmacéutico*. Universidad de Chile.
- Correa. (2011). Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Circular Colombiana de Cancerología*, 26, 111-117.
- Correa, P., & Piazuolo, M. B. (2010). Cáncer gástrico: el enigma colombiano. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 25(4), 334-337.
- DANE. (2016). *Cultivo del aguacate Hass (Persea americana Mill; Persea nubigena var. Guatemalensis x Persea americana var. drymifolia), plagas y enfermedades durante la temporada de lluvias*. Bogotá.
- Dembitsky, V., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S., & Gorinstein, S. (2011). The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*(44), 1671-1701.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1-5.
- Escobar, A. (2016). *Cadenas productiva de Brócoli en las Verapaces, Guatemala*. Ciudad de Guatemala: Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Fahey, J., Stephenson, K., Wade, K., & Talalay, P. (2013). Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(1), 1-7.
- Faostat. (25 de Julio de 2018). Obtenido de <http://www.fao.org/>
- Farfán, H. (2016). Posibilidades de producción del cultivo de arandano (*Vaccinium myrtillus*) bajo las buenas prácticas agrícolas (bpa) en una finca del municipio de villapinzón, cundinamarca. *Tesis de Maestría*. Bogotá, Colombia: Universidad de la Salle.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., & Mathers, C. (28 de Julio de 2018). Obtenido de GLOBOCAN: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Figueroa, M., Cortés, A., Pazos, Á., & Bravo, L. E. (2012). Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*, 1(32), 32-42.
- Fox, J. (2002). The non-H. pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *BMJ Journals*, 273-281.
- Freifelder, D. (2003). *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*. Barcelona: Reverté S. A.
- Galan, M., Kishan, A., & Silverman, A. (2004). Oral broccoli sprouts for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: a preliminary report. *Dig Dis Sci*, 49(7), 1088-1090.

- Galindo, M. E., & Arzate-Fernandez, A. M. (2010). Consideraciones sobre el origen y primera dispersión del aguacate (*Persea americana*, Lauraceae). *Cuadernos de Biodiversidad*, 33, 11-15.
- García, A., & Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.
- Gazit, S., & Degani, C. (2007). Biología reproductiva. En A. Whiley, B. Schaffer, & B. Wolstenholme, *El Palto. Botánica, Producción y Usos*. (págs. 103-131). Valparaiso: Ediciones Universitarias.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Singh, M., Rao, C., Shirwaikar, A., Rawat, A., & Pushpangadan, P. (2006). Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 57-61.
- Granado, A. (2010). Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y anamiales de experimentación. *Tesis Doctoral*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Gutiérrez-Bouzán, M., Burdó, I., & Cegarra, J. (2009). La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas. *BOLETÍN INTEXTTER*, 135, 33-40.
- Hurtado, A. (2015). Mejora de las condiciones de liofilización para la obtención de fruta en polvo. Valencia: Universidad Pontificia de Valencia.
- IARC. (1994). Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. . En I. W. Humans., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (págs. 1-241). Lyon: Scientific Research.
- ICA. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de aguacate Hass. Medidas para temporada invernal*. Bogotá: Produmedios.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. (2013). Analytical Methods of Phenolic Compounds. En K. Ramawat, & J. Merillon, *Natural Products, Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (págs. 2061-2092). Berlin: Springer-Verlag.
- Kosinska, A., Karamac, M., Estrella, I., Henrnández, T., Bartolomé, B., & Dykes, G. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. *Journal Agricol Food Chemistry*, 60, 4613-4619.
- López, M., Ospina, J., Rubiano, M., & Rey, F. (2009). Cáncer gástrico. Guía clínica cáncer gástrico. *Guías de manejo en cirugía*. asociación colombiana de cirugía.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Chaoyang, M., & Li, L. (2012). P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25, 550-554.
- Lou, Z., Wang, H., Song, Z., Chaoyang, M., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of food science*, 76(6), 398-403.






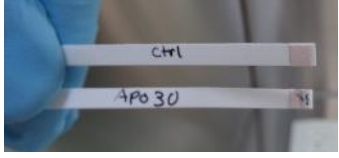


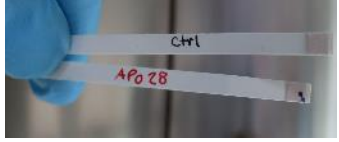





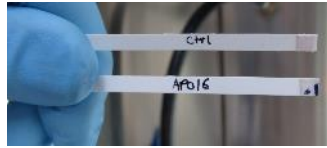


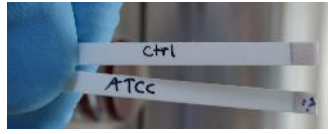
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Atherton, J., Axon, A., Bazzoli, F., . . . The European Helicobacter Study Group, (. (2012). Management of Helicobacter pylori infection - the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, *61*, 646-664.
- Marshall, B., Barrett, U., Prakash, C., McCallum, R., & Guerrant, R. (1990). Urea protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, *99*, 697-702.
- Marval, F., Brito, A., Mora, G., Piñero, A., Bastidas, J., & Arteaga, E. (2016). erapia convencional y secuencial en el tratamiento de Helicobacter pylori en pacientes del estado Carabobo, Venezuela. *Correo Científico Médico*, *20*(4), 729-740.
- Mejía, E. (2011). *Aguacate. Persea americana Miller*. Bogotá: Univisual Ltda.
- Mercado-Mercado, G., Cariilo, L., Wall-Medrano, A., López, J., & Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, *23*(1), 36-46.
- Min. Agricultura. (2018). *Cadena de Aguacate. Indicadores e instrumentos*. Bogotá.
- Molina, J., Corti, R., Doweck, J., McNicholl, A., & Gisbert, J. (2017). Avances recientes en el tratamiento de la infección por Helicobacter pylori. *Acta Gastroenterologica de latinoamerica*, *47*, 75-85.
- Morinaga, N., Iwamaru, Y., Yahiro, K., Tagashira, M., Moss, J., & Noda, M. (2005). Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in VERO cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 23303 - 23309.
- Murali, M. R. (2014). Current knowledge on alleviating Helicobacter pylori through the use of some commonly know natural products: bench to bedside. *Integrative medicine research*, *3*(3), 111-118.
- Núñez, A., Saucedo, R., Navarro, M., Avila, E., & Guibal . (2008). Cadmium extraction using amberlite XAD 7 impregnated with Cyanex 921. *Tercer encuentro de la mujer en la ciencia*. Mexico: IIC.
- Ohio State University Medical Center. (28 de 02 de 2019). *How dietary supplement may block cancer cells*. Obtenido de ScienceDaily.
- Olaeta, J., Schwartz, M., Undurraga, P., & Contreras, S. (2007). Utilización de la semilla de Palta (Persea americana Mill.) cv. Hass como producto agroindustrial. *Actas VI Congreso Mundial del Aguacate. Chile*, 1-9.
- Otero, W., Trespalacios, A., Otero, L., Vallejo, M., Torres- Amaya, M., Pardo, R., & Sabbagh, L. (2015). Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la infección por Helicobacter pylori en adultos. *Revista Colombiana de Gastroenterología. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*, *30*(17-26).

- Pajares, J., Pajares-Villaroya, R., & Gisbert, J. (2007). Helicobacter pylori: Resistencia a los antibióticos. *Rev Esp enferm. Digestivas*, 99(2), 63-70. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(2), 63-70.
- Palacios, F., Escobedo, W., & Romero, I. (2011). Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-Helicobacter pylori. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(1), 52-59.
- Parada-Contreras, V. (2016). Inhibición dual de ureasa y anhidrasa carbónica como estrategia para limitar la capacidad de colonización de Helicobacter pylori por parte de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos. *Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas*. Universidad de Concepción - Facultad de Farmacia.
- Pardo, C., de Vries, E., Buitrago, L., & Gamboa, O. (2017). *Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia* (4 ed., Vol. 1). Bogotá: Instituto Nacional de Cancerología (INC).
- Paredes, F., & Clemente, A. (2005). Polifenoles de aplicación en farmacia. Metabolismo y acción biológica. *Ambito farmacéutico. Fitoterapia*, 24(8), 85-94.
- Pastene, E., Hebel, S., & García, A. (2012). Polifenoles con efecto anti-helicobacter pylori: fuentes de obtención y su potencial utilización en fitomedicamentos, nutraceuticos y alimentos funcionales. *Revista farmacológica de Chile*, 5(2), 35-50.
- Pastene, E., Hebel, S., & García, A. (2012). Polifenoles con efecto anti-Helicobacter pylori: Fuentes de obtención y su potencial utilización en fitomedicamentos, nutraceuticos y alimentos funcionales. *Revista farmacológica de Chile*, 5(2), 35-50.
- Pastene, E., Hegel, S., & García, A. (2012). Polifenoles con efecto Anti-Helicobacter pylori. Fuentes de obtención y su potencial utilización en fitomedicamentos, nutraceuticos y alimentos funcionales. *Revista Farmacol Chile*, 5(2), 35-45.
- Pazos, A., Cerón, F., & Bravo, L. (2011). *Manual de Genotipificación de Helicobacter pylori*. Cali: Colciencias.
- Pedersen, C., Kyle, J., Kinson, A., Gardner, P., & Mc Phail, D. (2000). Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *European Journal Clin Nutr*, 54(5), 405-408.
- Pérez-Cano, H., & Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 3, 186-191.
- Prado, J., Porto, E., Severino, M., Da Gloria, E., Correa, C., & Ribeiro, I. (2013). Antimicrobial activity of yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) against food pathogens. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 93-98.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International*, 50, 586-621.

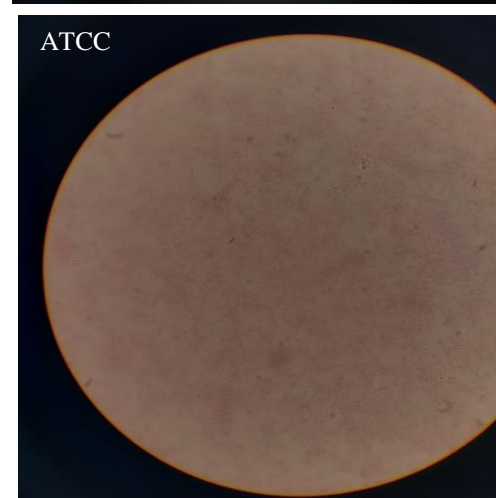
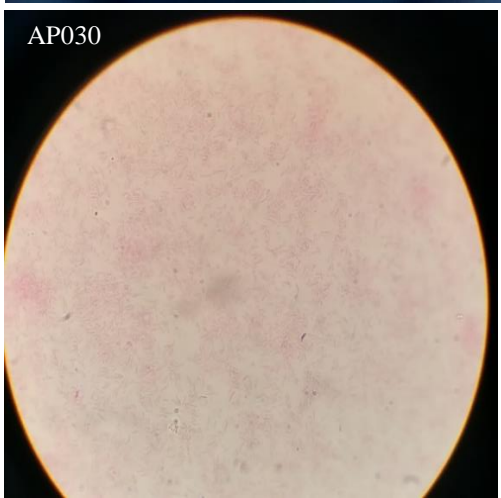
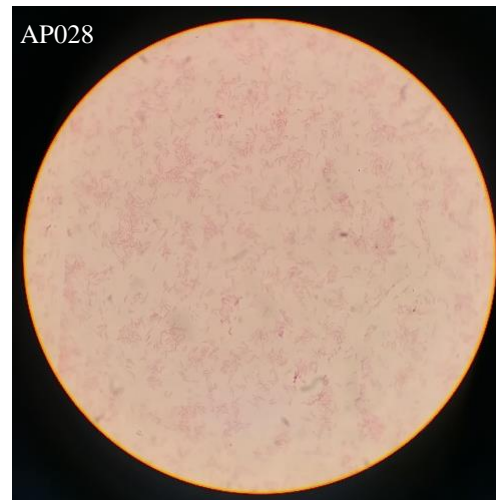
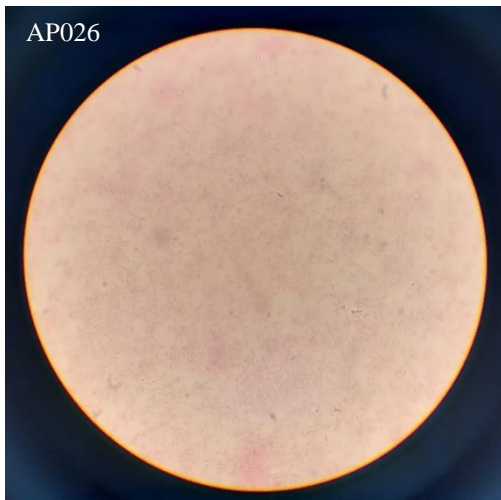
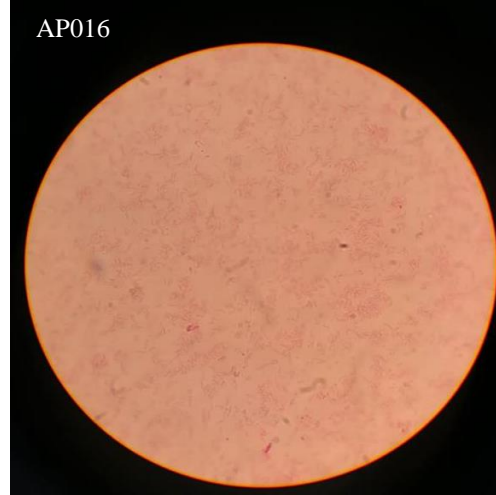
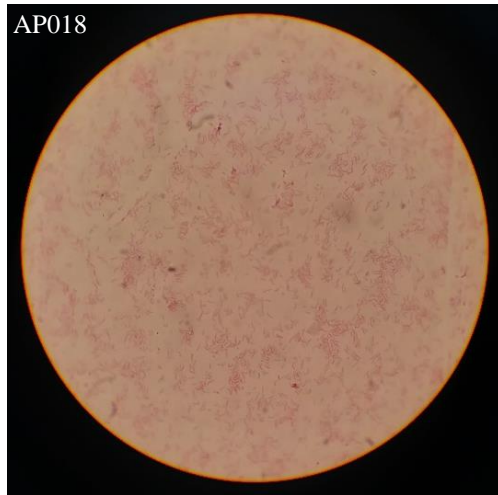
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramos, B., Mazeiro, G., Leone, A., Dutra, V., Pereira, R., Prandi, B., . . . Cássia, R. (2019). Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Food Research International*, 2-36.
- Rincón, C. (2014). Actividad Biológica de la Familia Lauraceae. *Magister en Ciencia-Química*. Bogotá, Colombia : Universidad Nacional de Colombia facultad de Ciencias, departamento de química.
- Rodas , M. (2002). Cáncer Gástrico. . *Tesis* . Guatemala : Centro Universitario Metropolitano (CUM) Facultad de Ciencias Médicas Centro de Investigaciones de las Ciencias de la Salud (CICS).
- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). Invitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal Agric FoodChem*, 55(3), 55-70.
- Rosero, J., Cruz, S., Osorio, C., & Hurtado, N. (2019). Analysis of Phenolic Composition of Byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivated in Colombia. *Molecules*, 24, 2-18.
- Sepúlveda, L., Ascacio-Valdés, J., Buenrostro, F., De la Cruz, J., Rodríguez, R., Contreras-Esquível, J., . . . Aguilar, C. (2013). Aspectos fundamentales de los elagitaninos de granada (*Punica granatum* L.). En F. Avalos, & I. Zapata, *Química hoy, tópicos selectos de investigación* (págs. 45-65). Saltillo: Universidad Autónoma de Coahuila.
- Smith, C. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany*, 20, 169-175.
- Sotelo, I., Casas, N., & Camelo, G. (2010). Borojó (*Borojoa patinoi*): Fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17(3), 329-336.
- Torres, L., & Rodríguez, B. (2008). Principales factores de patogenia en la infección por *Helicobacter pylori*. *CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1), 52-62.
- Torres, O., & Velho, L. (2009). a bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência da Informação*, 38(3), 96-110.
- Vallejo-Zamudio, E., Rojas, A., & Torres, O. (2017). Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes. *El Residente*, 12(3), 104-111.
- Vilar, J., & Pereira, J. (2018). *La olvicultura internacional. Difusión histórica, análisis estatístico y visión descriptiva*. Madrid: Fundación Caja Rural de Jaén.

- Whiley, A., Schafer, B., & Wolstenholme, B. (2002). *The Avocado Botany. production and uses*. Londres: CABI Publishing.
- Zhang, L., Ma , J., Pan, K., Go , V., Chen , J., & You , W. (2005). Efficacy of cranberry juice on *Helicobacter pylori* infection: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Helicobacter*, 10(2), 139-145.

Anexo 1. Pruebas de identificación bioquímica

Biopsia	Prueba Ureasa	Prueba Catalasa	Prueba de oxidasa
AP018			
AP030			
AP028			
AP026			
AP016			
ATCC			

Anexo 2. Crecimiento microscópico de *H. pylori*



Anexo 3. Tabla de datos del conteo de UFC de los extractos crudos y purificados

Aislado AP026											
Extracto crudo semilla			Extracto crudo epicarpio			Extracto purificado semilla			Extracto purificado epicarpio		
Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias
D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0
	2	0		2	0		2	0		2	0
	3	0		3	0		3	0		3	0
	4	0		4	0		4	0		4	0
D2-3000 ppm	1	25	D2-3000 ppm	1	57	D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	0
	2	10		2	47		2	0		2	0
	3	15		3	50		3	0		3	0
	4	8		4	0		4	0		4	0
D3-1500 ppm	1	48	D3-1500 ppm	1	110	D3-1500 ppm	1	15	D3-1500 ppm	1	78
	2	37		2	90		2	20		2	38
	3	59		3	121		3	38		3	40
	4	62		4	90		4	0		4	38
D4-750 ppm	1	84	D4-750 ppm	1	177	D4-750 ppm	1	32	D4-750 ppm	1	116
	2	73		2	169		2	72		2	42
	3	69		3	135		3	81		3	62
	4	70		4	135		4	36		4	78
D5-375 ppm	1	162	D5-375 ppm	1	272	D5-375 ppm	1	20	D5-375 ppm	1	157
	2	175		2	221		2	64		2	141
	3	163		3	232		3	184		3	114
	4	159		4	251		4	102		4	174

Aislado AP016											
Extracto crudo semilla			Extracto crudo epicarpio			Extracto purificado semilla			Extracto purificado epicarpio		
Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias
D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0
	2	0		2	0		2	0		2	0
	3	0		3	0		3	0		3	0
	4	0		4	0		4	0		4	0
D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	0
	2	32		2	33		2	0		2	0
	3	21		3	45		3	0		3	0
	4	0		4	38		4	0		4	0
D3-1500 ppm	1	48	D3-1500 ppm	1	69	D3-1500 ppm	1	7	D3-1500 ppm	1	25
	2	62		2	71		2	5		2	23
	3	0		3	68		3	18		3	33
	4	54		4	72		4	6		4	32
D4-750 ppm	1	57	D4-750 ppm	1	101	D4-750 ppm	1	38	D4-750 ppm	1	78
	2	54		2	103		2	22		2	81
	3	72		3	94		3	15		3	64
	4	61		4	92		4	19		4	45
D5-375 ppm	1	186	D5-375 ppm	1	193	D5-375 ppm	1	20	D5-375 ppm	1	105
	2	133		2	202		2	56		2	93
	3	175		3	186		3	42		3	82
	4	163		4	220		4	37		4	97

Aislado AP028											
Extracto crudo semilla			Extracto crudo epicarpio			Extracto purificado semilla			Extracto purificado epicarpio		
Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias
D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0
	2	0		2	0		2	0		2	0
	3	0		3	0		3	0		3	0
	4	0		4	0		4	0		4	0
D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	35	D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	0
	2	20		2	29		2	0		2	0
	3	21		3	41		3	0		3	0
	4	0		4	36		4	0		4	0
D3-1500 ppm	1	68	D3-1500 ppm	1	78	D3-1500 ppm	1	6	D3-1500 ppm	1	22
	2	57		2	59		2	8		2	33
	3	47		3	62		3	0		3	21
	4	65		4	64		4	9		4	0
D4-750 ppm	1	75	D4-750 ppm	1	87	D4-750 ppm	1	62	D4-750 ppm	1	32
	2	67		2	75		2	59		2	29
	3	78		3	95		3	58		3	43
	4	68		4	89		4	54		4	37
D5-375 ppm	1	136	D5-375 ppm	1	182	D5-375 ppm	1	21	D5-375 ppm	1	87
	2	162		2	175		2	47		2	75
	3	169		3	169		3	32		3	96
	4	158		4	179		4	39		4	84

Aislado AP030											
Extracto crudo semilla			Extracto crudo epicarpio			Extracto purificado semilla			Extracto purificado epicarpio		
Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias
D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0
	2	0		2	0		2	0		2	0
	3	0		3	0		3	0		3	0
	4	0		4	0		4	0		4	0
D2-3000 ppm	1	22	D2-3000 ppm	1	40	D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	0
	2	14		2	48		2	0		2	0
	3	17		3	32		3	0		3	0
	4	18		4	39		4	0		4	0
D3-1500 ppm	1	57	D3-1500 ppm	1	89	D3-1500 ppm	1	24	D3-1500 ppm	1	52
	2	37		2	93		2	22		2	49
	3	48		3	94		3	15		3	58
	4	65		4	85		4	19		4	55
D4-750 ppm	1	75	D4-750 ppm	1	135	D4-750 ppm	1	22	D4-750 ppm	1	75
	2	64		2	149		2	16		2	89
	3	69		3	158		3	19		3	78
	4	52		4	157		4	13		4	68
D5-375 ppm	1	145	D5-375 ppm	1	189	D5-375 ppm	1	102	D5-375 ppm	1	158
	2	163		2	194		2	92		2	147
	3	142		3	188		3	99		3	152
	4	150		4	175		4	97		4	145

Anexo 4. Tabla de datos del conteo de UFC de las fracciones obtenidas de los EPS.

Aislado AP018					
Fracción 2			Fracción 3		
Dilución	Caja	Numero de colonias	Dilución	Caja	Numero de colonias
D1-6000 ppm	1	0	D1-6000 ppm	1	0
	2	0		2	0
	3	0		3	0
	4	0		4	0
D2-3000 ppm	1	0	D2-3000 ppm	1	0
	2	0		2	0
	3	0		3	0
	4	0		4	0
D3-1500 ppm	1	0	D3-1500 ppm	1	0
	2	0		2	0
	3	0		3	0
	4	0		4	0
D4-750 ppm	1	30	D4-750 ppm	1	1
	2	15		2	5
	3	10		3	8
	4	0		4	15
D5-375 ppm	1	150	D5-375 ppm	1	100
	2	80		2	105
	3	20		3	30
	4	100		4	98