



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**“OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS DE *Agave angustifolia* Y
SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA COMO MOLUSQUICIDA Y ANTIMICROBIANO”**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

pQ.F.B. MORALES RABANALES QUETZALI NICTE

DIRECTOR

Dra. ALEJANDRA TOVAR CORONA

ASESOR

Dra. MARÍA DEL PILAR TRUJILLO GARCÍA.

Puebla, Pue.

JUNIO 2015

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Capítulo I. Introducción	3
Objetivos	4
1.1.Objetivo general.....	4
1.2.Objetivos particulares.....	4
1.3. Justificación.....	5
Capítulo II. Marco teórico	6
2.1. Generalidades.....	6
2.1.1. Fasciolosis	6
2.1.2. Bacterias.....	7
2.2. Agentes molusquidas y agentes antimicrobianos.....	10
2.3 Farmacognosia	11
2.4. Productos naturales	14
2.4.1. Saponinas.....	16
2.4.1.1. Identificación de saponinas.....	18
2.5. Familia Agavaceae.....	19
2.5.1. Descripción de los agaves.....	20

2.5.2. <i>Agave angustifolia</i>	21
Capítulo III. Antecedentes	22
Capítulo IV. Parte experimental	26
4.1. Lugar de realización	26
4.2. Material vegetal.....	26
4.3. Material analítico	26
4.4. Microorganismos.....	27
Estrategia analítica general.....	28
4.5. Obtención de extractos	29
4.6. Evaluación biológica	29
4.6.1. Actividad molusquicida	29
4.6.2. Ensayo como antimicrobiano.....	30
4.7. Métodos de aislamiento e identificación.....	31
4.7.1. Cromatografía en capa delgada	31
4.7.2. Cromatografía líquida de alta resolución	31
4.7.3. Purificación del crudo por hidrolisis.....	32
4.7.4. Pruebas químicas de identificación.....	32
4.7.5. Espectroscopia	33
4.7.5.1. Infrarrojo	33

4.7.5.2. Ultravioleta.....	33
4.7.5.3. Espectrometría de masas.....	33
Capítulo V. Resultados	34
5.1. Resultados físicos	34
5.2. Actividad molusquicida.....	35
5.3. Ensayo como antimicrobiano	36
5.4. Cromatografía en capa delgada.....	40
5.5. Cromatografía líquida de alta resolución.....	41
5.6. Pruebas químicas de identificación.....	42
5.7. Resultados Espectroscópicos	43
5.7.1. Infrarrojo	43
5.7.2. Ultravioleta.....	44
5.7.3. Espectrometría de masas.....	45
5.8. Estructura básica del compuesto activo	46
Capítulo VI. Discusión de resultados	47
Conclusiones	55
Bibliografía	56

RESUMEN

Una de las problemáticas a la que actualmente se enfrenta la salud pública, es a la ineficacia de los tratamientos contra infecciones a partir del uso de antibióticos comunes. Esto se debe a que dichas enfermedades, emergen y reemergen provocando resistencia de las especies patógenas contra múltiples fármacos, por lo tanto cada día son más frecuentes los reportes que existen sobre dicha resistencia; tal es el caso de *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, y entre las enfermedades parasitarias como leishmaniasis, fasciolosis y tripanosomiasis, entre otras. Es por esto que ha incrementado el interés por el estudio de extractos o productos aislados de plantas como una nueva opción terapéutica, de esta manera se busca que estos agentes naturales sean perniciosos para los microorganismos patógenos, además se espera que contaminen menos, sean más baratos y más efectivos. México, nos proporciona una extensa gama de productos naturales dada la gran biodiversidad de flora que existe en el país. Estos productos naturales pueden ser evaluados frente a distintas necesidades médicas como las antes mencionadas. El objetivo del siguiente trabajo fue obtener extractos orgánicos a partir de la fibra de *Agave angustifolia* para posteriormente evaluarlos en dos bioensayos; uno como molusquicida y otro como antimicrobiano. Y por último caracterizar el probable metabolito activo o compuesto responsable de dichas propiedades como molusquicida y antimicrobiano. Se seleccionó a la Familia *Agavaceae* por su gran adaptabilidad ecológica y por ende su gran abundancia. Se probó la actividad molusquicida y antimicrobiana de los extractos de *Agave angustifolia* sobre especies de moluscos de la especie *F.obrussa* y 2 especies de bacterias. Los extractos una vez evaluados y concluido que fase fue la que nos proporciona resultados positivos se sometieron a análisis físico-químicos, cromatográficos y espectroscópicos, los cuales mostraron que el compuesto responsable de la actividad toxica ante dichos grupos de microorganismos es una saponina esteroidal.

ABSTRACT

One of the problems for public health currently faces, it's the ineffective treatments against infections from the use of common antibiotics. This is because such diseases emerge and re-emerge causing pathogenic resistance against multiple drugs, whereby every day exists more frequent reports about resistance; such is the case of *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, and between parasitic diseases such as leishmaniasis, and trypanosomiasis fasciolosis, among others. That's why it has increased the interest in the study of extracts or isolates of plants as a new therapeutic option, so it's intended that these natural agents are pernicious for pathogenic microorganisms, also it's expected to pollute less, are cheaper and more effective. Mexico, provides a wide range of natural products for the high biodiversity of flora that exists in the country. These natural products can be assessed against different medical needs as mentioned above. The aim of this work was to obtain organic extracts from *Agave angustifolia* fiber to further evaluate two bioassays; molluscicide and another one as antimicrobial. And finally characterize the probable asset or compound responsible for these effect as a molluscicide and antimicrobial metabolite. He was selected to the Agavaceae family for their great ecological adaptability and therefore its abundance. The molluscicide and antimicrobial activity of extracts from *Agave angustifolia* species of molluscs of the species *F.obrussa* and 2 species of bacteria tested. Extracts once evaluated and concluded that phase was the source providing positive results were subjected to physical-chemical, chromatographic and spectroscopic analysis, which showed that the responsible for toxic activity against these groups of microorganisms compound is a steroidal saponin.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista ambiental existen dos fuertes preocupaciones en lo referente al control epidemiológico y sanitario, por un lado tenemos a las enfermedades parasitarias transmitidas por vectores, como es el caso de la Fasciolosis generada por *Fasciola hepatica* y transmitida por caracoles dulceacuícolas como *Fossaria obrussa* y *F. cubensis* [1-3]. Por el otro, la ineficacia en la desinfección a partir del uso de bactericidas comunes, provocando que bacterias como *Staphylococcus spp* y *Pseudomonas spp* [4-6], generen enfermedades infecciosas con una fuerte resistencia contra múltiples fármacos [7-10]. Es por ello, que actualmente se están buscando nuevas moléculas como una alternativa terapéutica para enfrentar dichas necesidades médicas, incrementando el interés por el estudio de agentes naturales con la esperanza que estos sean más efectivos, más baratos y menos agresivos con el medio ambiente.

En este sentido, es bien sabido que los agaves, poseen sustancias activas, producto de su metabolismo secundario, que pueden resultar tóxicas sobre algunos tipos de microorganismos patógenos. Los agaves son plantas nativas de México, utilizada comúnmente para la obtención del mezcal, tequila e incluso como planta ornamental [11-14].

Con base a lo anterior, en el presente trabajo de tesis se propone la extracción de metabolitos secundarios a partir del *Agave angustifolia*, la purificación y caracterización de los mismos y finalmente su evaluación biológica como molusquicida y como agente antibacteriano frente a cepas de origen ambiental.

OBJETIVOS

1.1. General.

Obtener los extractos orgánicos a partir de la fibra de *Agave angustifolia* con solventes de distintas polaridades, caracterizar los metabolitos por técnicas analíticas y evaluar su actividad biológica como antimicrobiano y molusquicida.

1.2. Específicos.

- Obtener extractos orgánicos a partir de la fibra de agave a través del equipo Soxhlet utilizando disolventes de baja polaridad (Hexano-AcOEt), mediana polaridad (Acetona-CH₂Cl₂) y alta polaridad (Etanol-MeOH).
- Evaluar el efecto molusquicida de los extractos orgánicos por medio de un análisis de regresión empírica *Probit* para determinar las LD_{50} y LD_{90}
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas por el método de difusión.
- Identificar la estructura molecular del extracto orgánico de interés a través de técnicas espectroscópicas y métodos de análisis clásicos.

1.3. JUSTIFICACIÓN.

Ante las alternativas exploradas se considera el desarrollo de molusquicidas y antimicrobianos de origen vegetal: para interrumpir el ciclo biológico del trematodo sin afectaciones medioambientales y para la inhibición de bacterias patógenas de origen ambiental. Se espera que estos compuestos, sean de fácil obtención y que el costo tampoco perturbe la economía de las comunidades afectadas por estos microorganismos.

La opción que se propone para el estudio como molusquicidas y antimicrobianos de origen botánico son las agaváceas dado que nuestro país es uno de los principales productores, además que son de fácil propagación y mantenimiento y presentan riqueza y abundancia de especies.

En este trabajo se evaluó la toxicidad de *Agave angustifolia* con el fin de conocer los índices de mortalidad de dichos grupos de microorganismos frente a los fitocompuestos aislados. Una vez evaluado y determinado que fase es la que nos proporciona resultados positivos se procedió a una purificación y caracterización físico-química (métodos de química húmeda y métodos instrumentales).

CAPÍTULO II

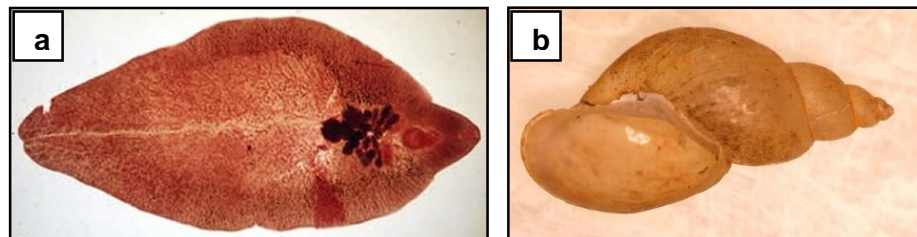
MARCO TEORICO

2.1. Generalidades

2.1.1. Fasciolosis.

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria causada por el trematodo llamado *Fasciola hepatica* también conocido como “duela hepática” o “conchuela del hígado” que ocasiona un daño en el ganado, mamíferos domésticos, silvestres y en casos extremos en el hombre, provocando en consecuencia una pérdida económica importante cuando se descuidan las medidas de control de sus hospedadores junto a condiciones ecológicas favorables. La *Fasciola hepatica* es de distribución cosmopolita, posee un ciclo biológico complejo ya que comprende la intervención de hospedadores intermediarios, como los caracoles del genero *Lymnaea* (ver figura 1 y 2). Estos caracoles son moluscos gasterópodos pulmonados de hábitat dulceacuícolas, en México se han descrito 7 especies correspondientes al género *Lymnaea* (*Fossaria*), entre ellos se encuentran: *F. obrussa* y *F. cubensis*. En particular *F. obrussa* es un caracol de tamaño medio que llega a tener 17 mm de longitud, su morfología es variada, la cascara es robusta y tiene una superficie gruesa. Es bien sabido que el control de los vectores de enfermedades parasitarias de humanos y de algunos animales de importancia económica, representa un medio efectivo y rápido para reducir la transmisión de parásitos, entre las opciones que existen para combatir la fasciolosis se encuentran las de origen farmacológico, físico, químico y biológico [15-18].

Figura 1. *Fasciola hepatica* (a) y *Fossaria obrussa* (b).



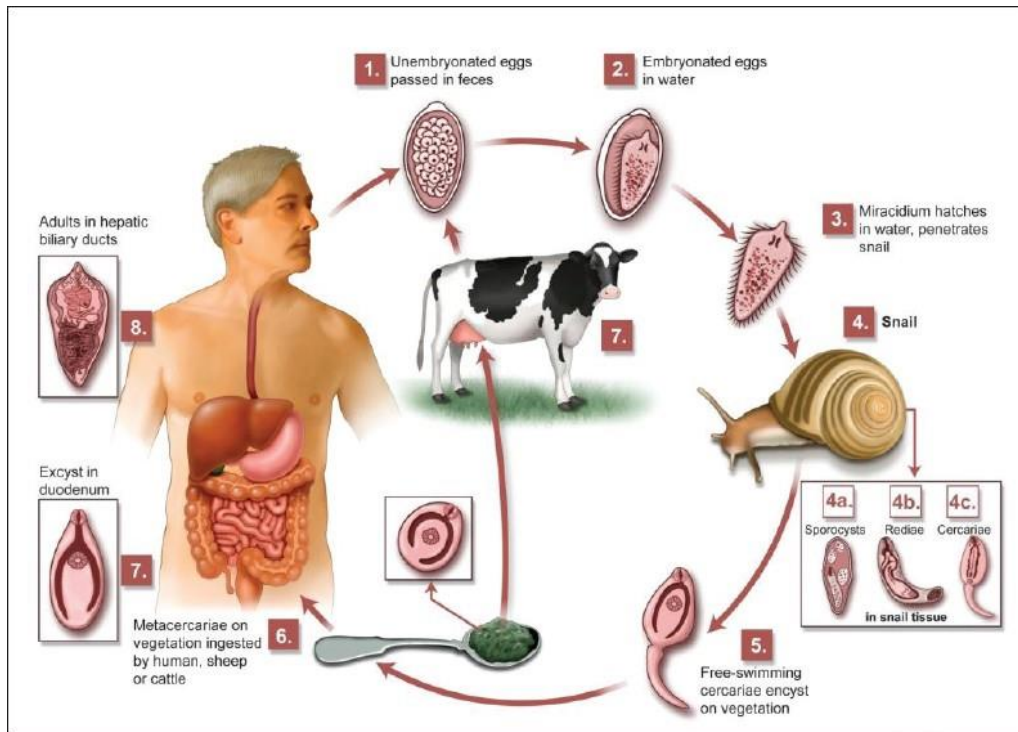


Figura 2. Ciclo biológico de la *Fasciola hepatica*.

2.1.2. Bacterias.

Las bacterias son organismos unicelulares procariontes formados por una sola célula y carente de núcleo. Su material genético (ácido desoxirribonucleico) se encuentra libre en el citoplasma y no tienen organelos. Además cuenta con una pared celular que envuelve a la célula dándole protección y rigidez. Las bacterias crecen en colonias y cada una de ellas equivaldría a una ciudad con un millón o más de organismos. La suma de sus características condiciona los rasgos que definen una colonia, como su color, tamaño, forma u olor. La capacidad de resistir frente a determinados antibióticos, de fermentar azúcares específicos, de lisar los eritrocitos (capacidad hemolítica) o de hidrolizar los lípidos se puede determinar también mediante el uso de los medios de cultivo adecuados.

La estructura de su pared celular divide a las bacterias en dos amplios grupos que se pueden distinguir por el método de tinción conocida como la tinción de Gram desarrollada por Christian Gram en 1884 [19,20].

Bacterias grampositivas.

Una bacteria grampositiva posee una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglucano que rodea la membrana citoplasmática. El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de malla que funciona para dar estructura, la replicación y la supervivencia de las células en condiciones normalmente hostiles en las que proliferan las bacterias.

Bacterias gramnegativas.

Las paredes celulares gramnegativas son más complejas (desde el punto de vista estructural como químico) que las células grampositivas. Desde el punto de vista estructural, su pared contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmica. Inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una delgada capa de peptidoglucano que representa tan solo un 5% a 10% del peso de la pared celular. En la capa externa de la capa de peptidoglucano se halla la membrana externa, la cual es exclusiva de las bacterias gramnegativas [21,22].

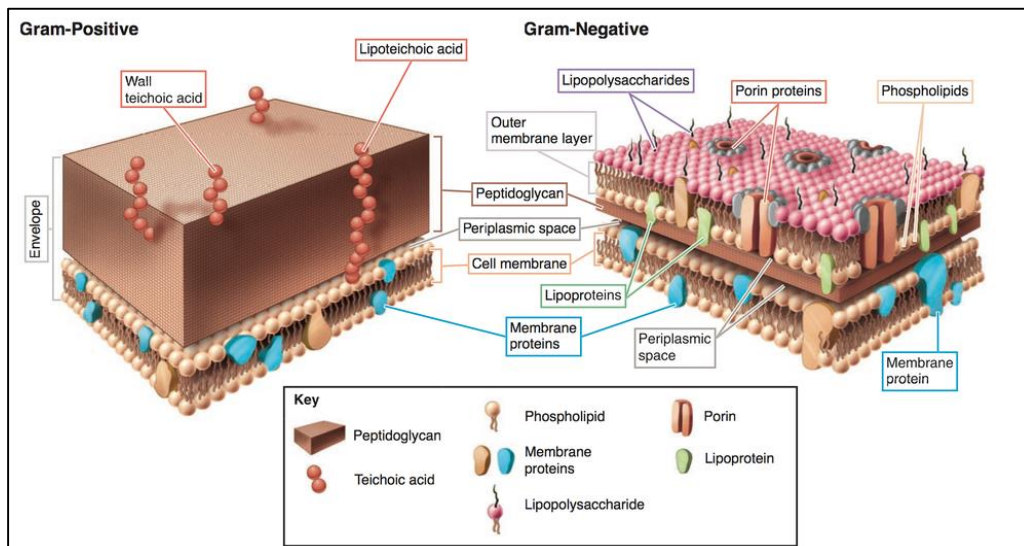


Figura 3. Composición estructural de las paredes celulares grampositivas y gramnegativas.

Pseudomonas spp

Es una bacteria aeróbica, de vida libre, común en el suelo y el agua, se presenta regularmente en las superficies de las plantas y en las superficies de los tejidos humanos y animales [23-25]. Son patógenos de las plantas superiores y han sido reconocidas como un patógenos oportunistas emergentes de importancia clínica, causando infecciones del tracto urinario, infecciones de las vías respiratorias, dermatitis, infecciones de tejidos blandos, bacteriemia, infecciones óseas y articulares, infecciones gastrointestinales y una variedad de infecciones sistémicas, especialmente en pacientes con quemaduras graves y en pacientes con cáncer y SIDA que están inmunodeprimidos. La infección es un problema grave en pacientes hospitalizados con cáncer, fibrosis quística y quemaduras. Por otra parte, es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga. Walker y col., en 2004, demostraron que en la colonización radicular, forma biopelículas que confieren resistencia contra los diferentes grupos de antibióticos [26].

Staphylococcus spp.

El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que las células de estos cocos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas. La mayor parte de los estafilococos tiene un diámetro de entre 0.5 y 1 μm y son anaerobios facultativos (es decir, crecen aerobia y anaerobiamente) inmóviles capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal y a temperaturas de 18-40°C. Estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano. En la actualidad, el género comprende 40 especies y 24 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano [27].

Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano, tanto en el medio hospitalario como en la comunidad, ya que originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en riesgo la vida,

infecciones de la piel, los tejidos blandos, los huesos, el aparato genitourinario, infecciones oportunistas, bacteriemia, endocarditis y neumonía, pero además producen un creciente número de infecciones relacionadas con la utilización de prótesis articulares y vasculares, de diferentes tipos de catéteres y otros dispositivos médicos, además de poseer una extraordinaria capacidad para desarrollar resistencia a los antimicrobianos [28]. En el aire, se encuentran entre las bacterias aisladas con mayor frecuencia tanto en áreas abiertas como cerradas, principalmente los *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCoN) [29-31] ya que sobreviven más de 80 días en diferentes superficies como el polvo, las escamas de la piel etc., y pueden transmitirse por aerosoles del tracto respiratorio al toser, hablar, estornudar, etc. [32-34], convirtiéndose en un serio problema de Salud Pública. Es importante tomar en cuenta que con los aislados de *Staphylococcus aureus* (SA) del aire, no se puede tener un dato real de frecuencia de aislamiento debido a la dificultad que presentan para ser aislados [34].

2.2. Agentes molusquicidas y agentes antimicrobianos.

Una manera de combatir las enfermedades transmitidas por vectores es por medio de tratamientos farmacológicos, control físico, y control químico, en este último se emplean productos químicos como los molusquicidas. Además para las enfermedades producidas por microorganismos se utilizan antimicrobianos, estos son sustancias capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de microbios, tales como bacterias, parásitos, hongos y virus, sin producir daño al organismo infectado.

Sin embargo, en el caso de usar molusquicidas existe el inconveniente de incrementar la contaminación ambiental, además se puede dañar la fauna en donde habitan los moluscos, son costosos y rompen el equilibrio bio-ecológico. Por otro lado, el mal uso de agentes antimicrobianos (antibióticos) ha provocado que se vuelvan ineficaces debido a que las enfermedades, emergen y reemergen provocando resistencia de las especies patógenas contra múltiples fármacos. Es por esto que ha resurgido la búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal [35-37].

2.3. Farmacognosia.

El ser humano desde su origen ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en la naturaleza, de esta manera se protegían, se alimentaban y trataban sus enfermedades, en muchos casos, asociado con aspectos mágico-religiosos. El conocimiento que la humanidad ha tenido en las plantas es debido a que aquellos extractos fueron usados en pócimas y ha sido transmitido de padre a hijo, de brujo, médico, sacerdote a los aprendices, principalmente de manera verbal. A las plantas le eran atribuidas propiedades curativas de acuerdo a su forma, color o hábitat. Por ejemplo los embriones de quenopodio, por parecerse a una lombriz, eran utilizados como antihelmínticos, y por su forma, las raíces *Rauwolfia serpentina* lo eran para combatir los efectos de las mordeduras de serpientes. Independientemente de su aspecto las propiedades medicinales de las plantas pueden provenir de cualquiera de sus partes (hojas, tallos, corteza, raíces, flores o semillas) sin embargo estas son efectivas en los tratamientos indicados gracias a que son capaces de producir cientos de compuestos de amplia diversidad y distinta funcionalidad llamados productos naturales, metabolitos secundarios o principios activos; estos tienen la capacidad de ejercer efectos fisiológicos que pueden ser benéficos o tóxicos según el metabolito secundario de que se trate. Por lo tanto el uso científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos ha sido sin duda tan antiguo como la astronomía, la física y la medicina [38-40].

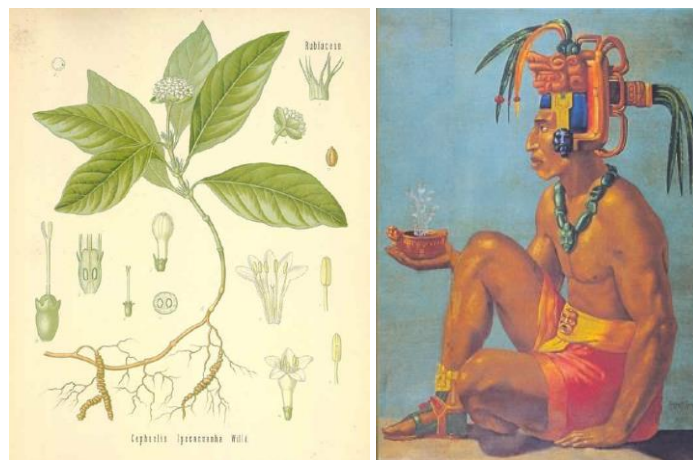


Figura 4. Nuestros ancestros y el uso de medicina natural.

Actualmente el estudio de las drogas naturales es abordado por la farmacognosia. Esta ciencia se enfoca particularmente al estudio de los principios activos de origen vegetal, animal y mineral, así como de los derivados que pudieran tener una aplicación terapéutica, comercial o industrial. En un sentido más amplio la farmacognosia abarca el estudio de la historia, el cultivo, la recolección, preparación, preservación, comercialización, distribución, identificación y evaluación de los componentes químicos de origen natural, la farmacología y el uso tradicional de esos compuestos o sus derivados para mejorar la salud y el bienestar del ser humano [40].



El nuevo mundo es particularmente rico en plantas y debido al interés que ha despertado la medicina “naturista” a diario crece el número de escritos que ilustran la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones. Por desgracia la mayoría no están documentados lo suficiente ya que no se sabe todos los posibles efecto colaterales derivados del uso indiscriminado de materiales vegetales. Paralelamente ha ido creciendo el interés científico hacia el estudio de los componentes y los efectos de las plantas que tradicionalmente muestran efecto biológicos interesantes y con ello la circulación de una serie de publicaciones periódicas reconocidas. En la actualidad una forma de recopilar los conocimientos precisos de los productos naturales es llevada a cabo por la etnobotánica. Este término fue utilizado por primera vez por John Harshbergers en 1895, para referirse al estudio de las plantas utilizadas por las etnias y en especial, por los pueblos primitivos [41-43].



Figura 5. Primer registro de plantas.

Hoy en día la etnobotánica tiene un sentido más amplio como el estudio de las interacciones hombre-planta esta cubre aspectos adicionales como estructura de los constituyentes químicos, actividad biológica, extracción y purificación, datos espectroscópicos, síntesis y biosíntesis. Esto está registrado en textos, catálogos, publicaciones periódicas e índices. Ahora para la determinación de las estructuras los métodos químicos han sido engorrosos y requieren de cantidades apreciables. La prueba final para la asignación de una estructura era su síntesis total. En consecuencia, la química orgánica ha tenido nuevos impulsos a medida que las estructuras se hacían más y más complejas y la disponibilidad de los compuestos era menor. Ello condujo al desarrollo de una serie de técnicas físicas de separación, purificación e identificación: resonancia magnética nuclear (RNM), espectrometría de masas (EM), espectrofotometría infrarroja (IR), UV-visible, Rayos X, técnicas cromatográficas, solas o combinadas con métodos espectroscópicos tales como cromatografía de gases acoplado a masas (EM-CG), o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) [44, 45, 38].

2.4. Productos naturales.

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios, principios activos o productos naturales. Los metabolitos secundarios no tienen una función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal.

En la interacción ecológica entre la planta y su medio ambiente intervienen los metabolitos secundarios cuya función es:

- Proteger a las plantas de la ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos.
- Servir como atrayentes de polinizadores y dispensadores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta.

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica. En todo caso es inevitable la superposición. Debido a que son moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tiene la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos distintos. Así que principalmente se agrupan en cuatro clases [45-47]:

- Terpenos: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos y aceites esenciales
- Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: saponinas, glucósidos cardiacos, glucósidos cianogenicos y glucosinolatos.
- Alcaloides: Quinina, teobromina, reserpina.

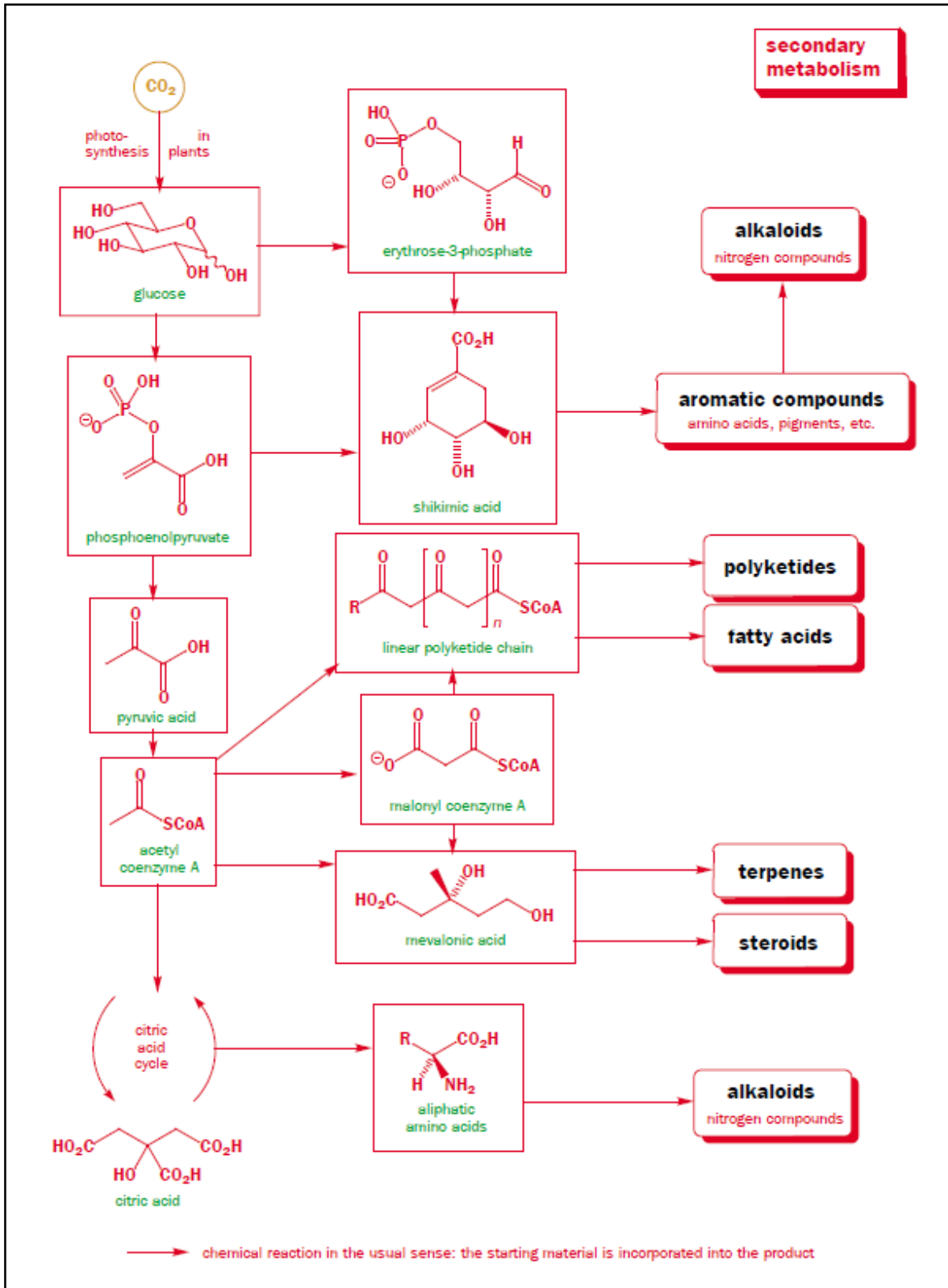


Figura 6. Grupos de metabolitos secundarios.

2.4.1. Saponinas.

El nombre saponinas proviene del latín *sapo*, "jabón" y son glucolípidos llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua. Los carbohidratos pueden ser pentosas, hexosas o ácidos urónicos. Las saponinas pueden clasificarse de acuerdo al número de azúcares presentes en su estructura como mono, di o tridesmosídicas. Los monosacáridos más comunes son: D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucorónico, ácido D-galacturónico, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-fructosa. La naturaleza de la aglicona, los grupos funcionales sobre ella y el número y naturaleza de azúcares pueden variar ampliamente dando origen a una gran diversidad de compuestos con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes [48,49].

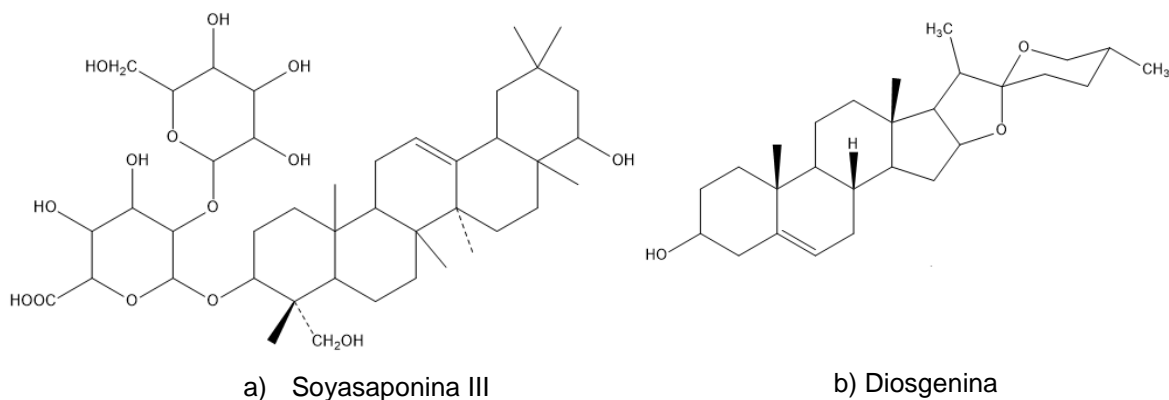


Figura 7. Estructura de una saponina triterpénica a) y una saponina esteroidal b).

Existe una gran variedad de plantas que contienen saponinas en distintas concentraciones, como por ejemplo la yuca, soya, el ginseg, la quinua o el quillay, entre otros. Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en monocotiledóneas como Agavaceae, Dioscoreaceae y Liliaceae y las triterpénicas en dicotiledóneas como Leguminosae, Araliaceae y Cariofilaceae [50,51].

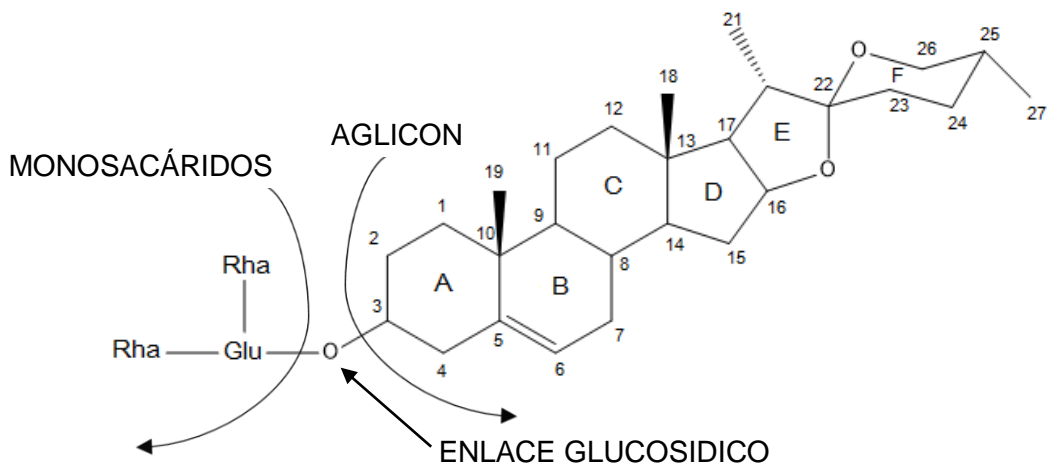


Figura 8. Estructura general de una saponina.

Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina. Las saponinas forman micelas y cambian la tensión superficial de los líquidos. Su tamaño molecular se encuentra entre los 600 Da y los 2700 Da, pero cuando forman micelas pueden llegar a tener un peso molecular entre 70 y 150 KDa. Se ven afectas al pH de la solución, ya que a altos pH sufren hidrólisis, formándose saponinas de menor peso molecular [52,53].

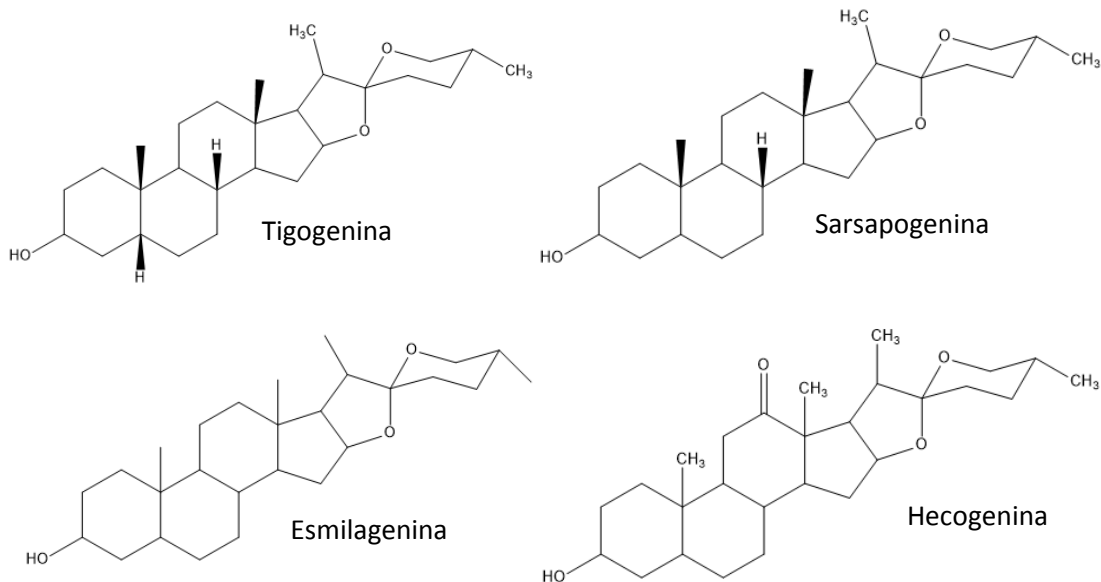


Figura 9. Estructuras moleculares de las sapogeninas.

A las saponinas se les ha atribuido un amplio rango de actividades biológicas una de ellas es que son tóxicas, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia el torrente sanguíneo. Otra es que tienen una acción irritante sobre las células. En el parénquima pulmonar se traduce en una acción expectorante, sobre las células renales produce una acción diurética y sobre los glóbulos rojos una acción hemolítica. Como norma general, las drogas con saponinas producen una acción expectorante, diurética, depurativa, tónico-venosa y de disminución del colesterol. Las esteroides sirven como materia prima en la hemisíntesis de hormonas sexuales y corticales. Aunque se absorben mal en el tracto digestivo, favorecen la absorción de otros compuestos: los cardiotónicos [54, 55, 51].

2.4.1.1. Identificación y caracterización de las saponinas.

Existen varios métodos para la determinación de saponinas, comúnmente los métodos clásicos son empleados en conjunto con los métodos instrumentales. Algunos de los métodos que se han ocupado son técnicas cromatográficas como la cromatografía en capa fina revelándolas con luz ultravioleta, vapores de yodo, ácido tricloroacético, tricloruro de antimonio y sangre por mencionar algunos, cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Además son utilizadas pruebas químicas para identificación de grupos funcionales que se fundamentan por colorimetría (Liebermann-Burchard, Salkowski) y métodos espectroscópicos como: espectrofotometría infrarroja, UV-visible, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear [56, 57, 50, 51, 53-55,14].

2.5. Familia *Agavaceae*

La familia *Agavaceae* contiene 9 géneros y alrededor de 293 especies. El género más importante es *Agave* con aproximadamente 166 especies. La diversidad más importante se encuentra en el centro del territorio Mexicano, con propagación de especies desde el suroeste de Estados Unidos a través de América Central y el Caribe hasta el norte de América del Sur. En México la familia *Agavaceae* es uno de los grupos vegetales más representativos. Su importancia va desde su valor ecológico y económico hasta su aspecto cultural. Desafortunadamente, muchas especies de esta familia han sido descuidadas desde el punto de vista del mejoramiento, explotación racional y conservación. En este sentido, la biotecnología vegetal puede aportar herramientas valiosas que permitan el mejor aprovechamiento de estas plantas y aseguren al mismo tiempo su conservación [58, 59].

Clasificación de la familia *Agavaceae*

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clasificación: Angiosperma

Subclase: Monocotiledonea

Orden: Amarilidaceae

Suborden: Iridales

Género: *Agave*

Especie: *Angustifolia*

2.5.1. Descripción del género Agave

Los agaves son plantas perenes con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas a partir de un tallo central. Las hojas por lo general son suculentas, es decir, que acumulan agua en su interior, como una adaptación a los sitios donde crecen (generalmente secos o con poca acumulación de agua en el suelo); son fibrosas, comúnmente en forma de línea o espada; las especies más pequeñas pueden pesar apenas 20 gramos, mientras que las especies más grandes como lo magueyes pulqueros, pueden llegar a tener 150 a 200 hojas por planta.



Especies de agave poseen importancia comercial como fuente de fibras industriales, en la industria de alimentos debido a la obtención de numerosas bebidas destiladas (p. ej. Tequila, mezcal) e importancia medicinal ya que se utiliza en la medicina tradicional china en el tratamiento de sarna, tumores, disentería y como insecticidas.

Además los agaves poseen sustancias activas como productos de su metabolismo secundario, presentando un potencial molusquicida considerando a diferentes especies de agaves como toxicas sobre algunos grupos de moluscos [60-62, 11-13, 29].

2.5.2. *Agave angustifolia*.

Es una planta nativa de nuestro país y de toda América Central, utilizada comúnmente para la obtención del mezcal, es también utilizada como planta ornamental conocida con otros nombres como *Agave vivípara*, *espadín*, *lechuguilla* o *marginata*. Presenta un tronco y hojas lanceoladas de 120cm de longitud y 10 cm de ancho, de color verde pálido a gris y borde blanco, generalmente cóncavos en el haz y convexos en el envés. Cada hoja lleva una espina terminal de unos 3 cm de longitud y de color marrón oscuro. La inflorescencia tiene de 3 a 5 m de altura con flores amarillo-verdosas que se disponen en umbelas [63,64].



Figura 10. *Agave angustifolia*.

CAPÍTULO III

ANTECEDENTES

Chung en 1990 estudio los efectos de los extractos de 6 plantas chinas sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Tres de los extractos inhibieron a la bacteria que se hizo crecer en jugo de repollo. El extracto numero 68 inhibió el 100% de las células bacterianas a los 5 dias con una dosis de 500 µg/ml. Esto nos indica que los alimentos pueden preservarse con compuestos naturales como aditivos ya que este trabajo muestra la evidencia de ello.

Grosvenor en 1994, desarrollo ensayos antimicrobianos y antifúngicos de 114 especies de plantas de la región Sunda en Indonesia. El 82% de los extractos fueron activos sobre *Staphylococcus aureus*, mientras que el 35% fue activo sobre *Escherichia coli*. La actividad fue menor en los hongos ya que solo el 20% inhibió a *Fusarium oxysporium* y 19% sobre *Sacharomyces cereviceae*.

Peana en 1997 obtuvo extractos acuosos liofilizados de *A. americana* colectada en Italia. Extrajeron saponinas esteroidales las cuales poseen actividad antiinflamatoria. Los extractos fueron administrados por vía intraperitoneal en ratas albinas Wistar a las cuales se les provoco un edema con carragenina. También se estudió su actividad ulcerogénica. Las sapogeninas se administraron oralmente. Los resultados fueron analizados estadísticamente por la prueba de Tukey. El extracto acuoso inhibió el 50% del edema a las 3 horas pero las saponinas esteoidales mostraron mejores resultados ya que a la hora o 3 horas redujeron el edema al 70%.

César Fuertes en 1997 determino en extractos de hojas de *Lupinus ballianus* C.P. Smith flavonoides y alcaloides con actividad antibacteriana y antifúngica. Los extractos alcohólicos fueron obtenidos por reflujo y se evaluaron frente a cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 5438, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9342) y como Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*) y *Aspergillus niger*. Los resultados fueron que el flavonoide y el alcaloide a la concentración de 200 mg/ml tienen actividad antimicrobiana frente a las cepas

grampositivas y gramnegativas y el alcaloide presenta actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*. Utilizo espectroscopia de UV-Visible y espectroscopia de infrarrojo para la determinación de flavonoide dando como resultado la genisteina y para alcaloide la lupinina o hidroxilupanina.

María Martínez en el 2000 estudio la actividad antimicrobiana de un extracto de *Schinus terebenthifolius Raddi* (copal) frente a cepas de microorganismos que incluyeron *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, como Gram - y *Staphylococcus aureus*, como Gram + y la levadura *Candida albicans*, esta evaluación se realizó mediante el método de difusión en agar. Obteniendo como resultado que aún a la menor concentración del 1% se observa inhibición del crecimiento de todos los microorganismos.

Artemiza Bernal en el 2005 determino la actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus spp* sobre hongos fitopatógenos (*Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*) donde lo extractos fueron incluidos en el medio de cultivo líquido papa-dextrosa, evaluando la actividad fungicida de los extractos con base a la inhibición del crecimiento micelial de cada especie. Dando como resultado que *L. exaltatus* mostró mayor actividad fungicida.

Almedia da Silva, P. en 2007 evaluó la actividad antimicrobianas de plantas del bosque de galería del rio Uruguay. Donde obtuvieron 66 extractos de 26 plantas de 15 familias botánicas diferentes, dichos extractos fueron obtenidos con cloroformo, acetona y etanol/agua 70:30 para cada especie seleccionada. El ensayo se realizó por método de difusión en agar de Barry. Los microorganismos utilizados fueron *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15153), *Escherichia coli* (ATCC 26), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Listeria innocua* (ATCC 13124), *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv), *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Aspergillus niger* (CCM 18). Los resultados de la actividad antimicrobiana fue la siguiente: 26 positivos contra *S. aureus*, 17 positivos contra *C. albicans*, 6 positivos contra *A. niger* y 11 positivos contra *M. tuberculosis*.

Iris Zampini en el 2007 determino la potencia antimicrobiana de extractos alcohólicos de plantas utilizadas popularmente en argentina como antisépticos y antiinflamatorios *Dasyphyllum diaconthoides*, *Erythrina cristagalli*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Phytolacca dioica*, *Pithecoctenium cynanchoides*, *Prosopanche americana*, *Schinus molle*, *Schkuhria pinnata*, *Senna aphylla* y *Solidago chilensis*. La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó a través de ensayos de difusión en agar, macrodilución en medio sólido y microdilución en medio líquido frente a 47 aislamientos clínicos multirresistentes a antibióticos: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*. De acuerdo a la concentración inhibitoria mínima (CIM), 3 de las 11 especies ensayadas fueron las más activas: *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, y *S. aphylla* (CIM de 25 a 200 µg/mL). *P. mirabilis*, *A. baumannii* y *S. maltophilia* fueron las cepas más susceptibles con valores de CIM entre 25 y 50 µg/mL seguido por *P. aeruginosa* con valores de CIM de 50 a 100 µg/mL. El análisis fitoquímico indica que los compuestos responsables de dicha actividad son de naturaleza fenólica.

Henry Flechas en el 2008 utilizando tres procedencias de *Solanum quitoense* var. *septentrionale* (naranjillo) llevo a cabo la extracción, purificación, identificación y elucidación estructural por medio de técnicas espectroscópicas de NMR e IR de sapogeninas esteroidales. Determinando la presencia de hecogenina.

José Orestes en el 2008 Encontró que el *Agave brittoniana* contenía saponinas esteroidales con actividad contra el parásito *Trichomonas vaginalis*. Realizo el estudio "in vitro" de la actividad de productos de esta planta frente a *Trichomonas vaginalis*, utilizando para la extracción las hojas secas y pulverizadas con una mezcla de etanol-agua (7:3) mediante maceración. Luego de la extracción realizaron una hidrolisis y los productos obtenidos fueron comparados con patrones de sapogeninas mediante cromatografía en capa fina encontrando como sapogeninas mayoritarias a la yuccagenina y diosgenina. Para confirmar la estructura utilizaron técnicas de resonancia magnética nuclear y espectroscopia de

infrarrojo. Los mejores resultados de esta actividad fueron obtenidos con glicósido derivado de la yuccagenina.

Marcia Avello y colaboradores en el 2012 utilizaron extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae para evaluar la actividad antimicrobiana de sus aceites esenciales frente a microorganismos además de aportar la composición química. La evaluación antimicrobiana fue a través de ensayos antifúngicos por el método de dilución en agar y difusión de vapor frente a *Penicillium sp* y *Fusarium oxysporum*; los ensayos antibacterianos fue a través del método del pocillo y frente a *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La caracterización química se realizó por CG-MS. Los resultados de los bioensayos dieron positivo para actividad antibacteriana.

Maribel Lozano en 2012 realizó la extracción y cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa willd*, el método de extracción que utilizó fue por maceración con mezclas hidroalcohólicas tomando en cuenta la relación masa/volumen, el tiempo de extracción y relación porcentual de EtOH/H₂O, el porcentaje de saponinas lo determinó utilizando los métodos de espuma, espectrofotométrico UV y por cromatografía HPLC. Determinando que los rendimientos de extracción varían desde 36% hasta 39.4 % p/p, mientras que el porcentaje de saponinas en el extracto varía desde 47.3% hasta 56.2%.

Mariana B. Botura en el 2013 realizó un estudio describiendo la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos acuosos (AE), extractos con acetato de etilo (EE), fracciones de flavonoides (FF) y fracciones de saponinas (SF) obtenidos a partir de residuos de sisal (*Agave sisalana*) contra nematodos gastrointestinales de cabras. La actividad de estos extractos fueron evaluados mediante la realización de la inhibición de la eclosión de los huevos y larvas de los ensayos de migración. Este efecto es probablemente debido a la presencia de componentes como homoisoflavonoides y saponinas, que tienen diferentes acciones para edades específicas en el desarrollo del nematodo.

CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Lugar de realización.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la máxima casa de estudios del estado de Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas, en los meses de Mayo a Noviembre de 2014

4.2. Material vegetal.

Agave angustifolia.

Las muestras de *Agave angustifolia* fueron obtenidas en la localidad de Santa Catarina Minas, correspondiente al Estado de Oaxaca. Se localiza en la parte central del Estado, en las coordenadas 16° 47´ de longitud oeste y 96° 38´ de latitud norte, a una altura de 1,560 msnm.

4.3. Material analítico.

Se utilizó todo lo necesario del material volumétrico, materiales de sostén y equipo de uso específico como el extractor Soxhlet. Los reactivos que empleamos fueron Ácido Sulfúrico, Anhídrido Acético, Hidróxido de Sodio y Ácido Clorhídrico. Como Solventes utilizamos Hexano, Cloroformo, Acetato de Etilo, Cloruro de Metileno, Acetona, Etanol, Metanol, Agua. Todos los solventes serán de grado A.C.S.

Equipo utilizado: Balanza analítica, lámpara de UV de 254nm (onda corta y onda larga), microscopio estereoscópico, espectrofotómetro UV-Visible VARIAN Cary 50, espectrofotómetro de infrarrojo DIGILAB-EXCALIBUR FT 2000, placas cromatográficas Merck KGaA de óxido de aluminio 60 F₂₅₄ neutro y HPLC Waters 600 con Detector UV-Vis Waters 2487.

4.4. Microorganismos.

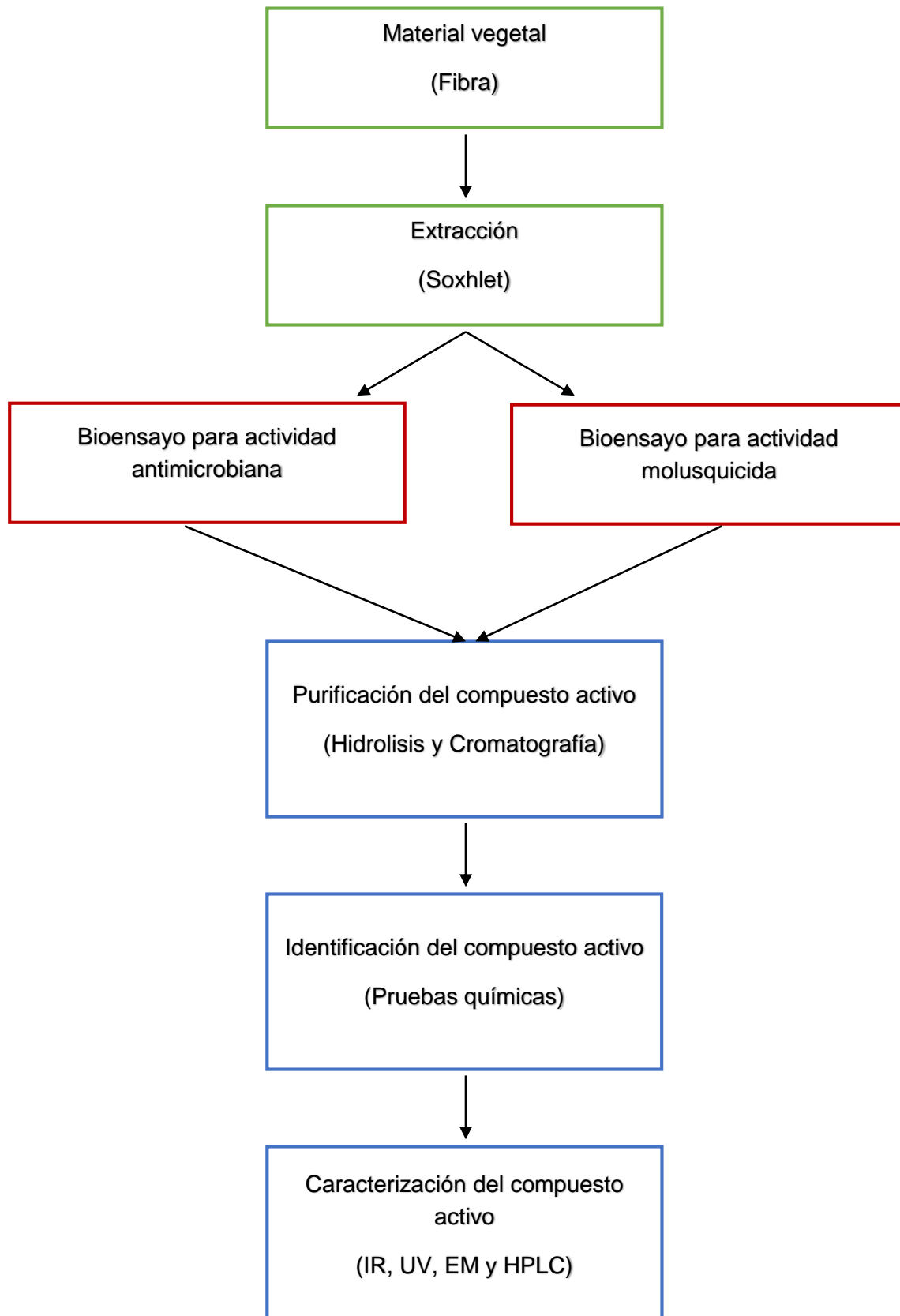
Moluscos.

La colecta del molusco se realizó de forma manual durante los meses de julio a octubre de 2014, en canales y cuerpos de agua en la comunidad de Huililco, localizado al sur del estado de Puebla, en las coordenadas 18°47' latitud norte 98°27' longitud oeste y a una altitud de 1600msnm. Una vez colectados, se transportaron y fueron identificados y adaptados para su cría masiva en el laboratorio de Parasitología y Vectores de la Escuela de Biología BUAP.

Bacterias.

Se ensayaron los diferentes extractos frente a una cepa bacteriana Gram-negativa *Pseudomona aeruginosa* y cuatro cepas bacterianas Gram-positivas, dos cepas *Staphylococcus epidermidis* y dos cepas *Staphylococcus saprophyticus* de origen ambiental aisladas a partir de muestras de aire recolectadas en la zona urbana de la Ciudad de Puebla. La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se utilizó como cepa testigo.

ESTRATEGIA ANALÍTICA GENERAL



4.5. Obtención de extractos.

Extracción con equipo soxhlet.

Una vez obtenida la fibra, se sometieron 30 g a extracción con el extractor Soxhlet, se utilizó distintos disolventes orgánicos, dependiendo de su polaridad: baja polaridad (Hexano, Acetato de Etilo, Cloruro de Metileno), medianamente polar (Acetona) y alta polaridad (Etanol, Metanol, Agua). Después fueron filtrados y concentrados hasta dos tercios de su volumen inicial. Una vez más se filtraron para eliminar los residuos no solubles y por último se dejaron evaporar a temperatura ambiente. Una vez secos se pesaron y almacenaron en un lugar oscuro.

4.6. Evaluación biológica

4.6.1. Actividad molusquicida.

Se preparó una solución estándar con el producto liofilizado del agave y agua destilada estéril a razón de 1g/20mL. A partir de ésta se realizaron diluciones en proporciones de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128. Se evaluaron en total 560 moluscos de 14 días de eclosión, repartidos en siete tratamientos de 80 organismos y grupo de control, en 4 repeticiones que se realizaron en diferentes fechas. La vigilancia se realizó cada 2 horas durante 24 horas, a las 12 horas y finalmente a las 36 horas. La observación se realizó bajo microscopio estereoscópico, ubicando la actividad cardíaca y física del molusco hasta que cesara. Los moluscos muertos en este rango de tiempo se contabilizaron y a los sobrevivientes se les evaluó hasta su muerte.

Se determinó el valor de la dosis letal al 50% y 90% de la toxicidad del agave sobre los gasterópodos a través de un análisis de regresión empírica *Probit*, mediante el programa Sigma Plot 9.0 [78]. Este análisis se basa en la cuantificación probabilística de la vulnerabilidad de poblaciones animales expuestas a agentes tóxicos por cualquier vía menos la inhalación, y otorga un intervalo de confianza.

4.6.2. Ensayo como antimicrobiano.

Para realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos, se tomaron en cuenta las especificaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute [79]. Los ensayos se realizaron por triplicado.

➤ Medio de Cultivo.

Se utilizó agar Müller-Hinton y se preparó según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se realizaron cuatro pozos en cada placa, adicionando primero 20 ml del medio se dejó solidificar y se colocaron cilindros de 5 mm de diámetro y 10 mm de largo, posteriormente se agregaron 15 ml más de medio y se dejaron solidificar.

➤ Preparación del Inóculo.

La preparación del inóculo: se realizó a partir de una placa de cultivo con crecimiento activo donde tomó un inóculo y se colocó en solución salina isotónica (ssi) estéril, se ajustó la concentración al tubo 0,5 de Macfarland equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml.

➤ Controles.

Como control negativo se utilizó solución salina estéril. El control positivo para las cepas de estafilococos fue Vancomicina (30 $\mu\text{g/ml}$) e Imipenem (10 $\mu\text{g/ml}$) para *Pseudomona aeruginosa*.

➤ Realización del Ensayo.

El procedimiento se realizó sembrando en forma masiva con hisopo cada una de las bacterias inoculadas en la ssi, en las diferentes placas de agar Mueller Hinton con los pozos. Posteriormente y con ayuda de una micropipeta se adicionaron en los pozos 50 μl de cada uno de los extractos a probar, teniendo en cada placa el control positivo y el control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C por 18-24hrs.

Después del tiempo de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros (mm).

4.7. Métodos de aislamiento e identificación.

4.7.1. Cromatografía en capa delgada.

Se utilizaron placas cromatográficas de la marca Merck KGaA de óxido de aluminio 60 F₂₅₄ neutro con dimensiones de 2 X 4 cm. Los eluyentes empleados para su corrimiento fue Metanol/ Agua en una proporción 8:2. La muestra disuelta en metanol se aplicó con un capilar a una distancia de 0.5 cm del borde inferior de la placa. Se colocó la placa en una cámara cromatográfica que contenía los eluyentes antes mencionados. Se permitió que la muestra corriera por capilaridad hasta una distancia de aproximadamente 0.5cm del extremo superior de la placa, se sacó de la cámara y se secó a temperatura ambiente para evaporar los eluyentes. Por último se lee la placa con una lámpara de UV a 254 nm.

Para calcular el R_f se midió la distancia del punto de aplicación de la muestra hasta la mitad de la mancha o banda estudiada y se dividió este valor por la distancia del punto de aplicación hasta donde corrió el eluyente.

4.7.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis en esta técnica fue realizado en un equipo HPLC Waters 600 con detector UV-Vis Waters 2487. Las separaciones fueron corridas en una columna SunFire™ C18 de 4.6X150mm d.i. 5 µm a 30°C y 205 nm. Se inyectaron 20 µl de blanco y 20 µl de muestra, para la separación se empleó como fase móvil agua como solvente "A" y acetonitrilo como solvente "B", para la elución se trabajó con un sistema isocrático con un flujo constante de 1 ml/min durante 15 minutos.

4.8. Purificación del crudo por hidrolisis

Para el proceso de hidrolisis se utilizó 1 gr del extracto crudo de la fibra de Agave angustifolia disuelto en 50 ml de etanol al 50 %, a esto se le adiciono 10 ml de una solución de hidróxido de sodio 1 mol/l en metanol. Posteriormente la mezcla se sometió a reflujo durante 2hrs y se le agrego 10 ml de una solución de agua acida, por último se dejó secar a temperatura ambiente. Para la obtención de las saponinas se realizaron mediante extracciones con cloroformo en relación 2:1

4.9. Pruebas químicas de identificación.

- Liebermann- Burchard (Esteroles y triterpenos).

La muestra se disolvió en cloroformo, se le adiciono 1 ml de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared se le agregaron 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. La prueba es positiva con la formación de colores azul verdoso, verde oscuro, café y/o negro para esteroles y rojo, violeta o morado con triterpenos.

- Ensayo de espuma (saponinas).

La muestra estaba en etanol por lo se diluye en 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 – 10 min. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persiste por más de 2 min.

- Sudan III (ácidos grasos):

Se tomó una alícuota de la fracción en el solvente de extracción y se le añade 1ml de una solución diluida en agua del colorante Sudán III o Sudán IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayo, respectivamente.

➤ Hemólisis

Se colocaron alícuotas de extracto sobre una placa de agar sangre y se dejaron durante aproximadamente 30 min.

➤ Salkowski (triterpenos y esteroides).

Un ml de la fracción en cloroformo se coloca en un tubo de ensayos con 1ml de ácido sulfúrico concentrado. Un ensayo positivo se muestra con una coloración amarillo rojiza.

4.10. Espectroscopia

➤ Infrarrojo

Los espectros de los extractos se determinaron en un espectrofotómetro de infrarrojo DIGILAB-EXCALIBUR FT 2000, en el cual consistió en diluir una pequeña cantidad del extracto en acetato de etilo, acetona o metanol, dependiendo del extracto a analizar. Una vez diluida la muestra se agregó a una pastilla realizada previamente con KBr y se procesó la muestra en el quipo.

➤ Ultravioleta

Los análisis de las muestras en ultravioleta se hicieron utilizando un espectrofotómetro UV-Visible VARIAN Cary 50, con una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz, usando como línea base metanol grado A.C.S.

➤ Espectrometría de masas

El análisis se realizó en el laboratorio de espectrometría de masas en el edificio de posgrado en Ciencias Químicas por el M. en C. Vladimir Carranza Téllez, utilizando un análisis por FAB +.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1. Resultados físicos

A partir de la fibra de agave angustifolia, se obtuvieron extractos con polaridad variable: baja polaridad (Hexano - Acetato de Etilo -Cloruro de Metileno), medianamente polar (Acetona) y alta polaridad (Etanol – Metanol - Agua) con el extractor Soxhlet, después de ser filtrados y concentrados hasta dos tercios de su volumen inicial y dejándolos evaporar a temperatura ambiente.

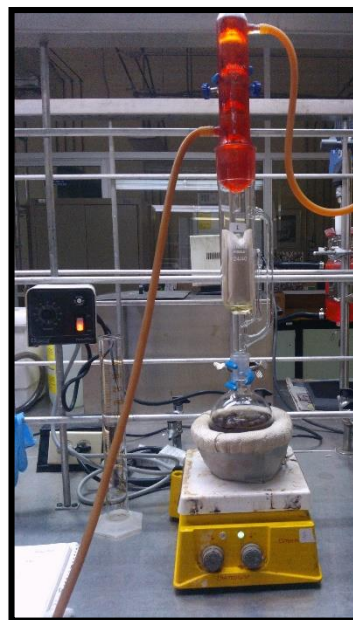


Figura 11. Extractor Soxhlet.

Observándose como resultado final, que los extractos de baja polaridad tuvieron un aspecto sólido pastoso de color verde oscuro y se tuvo un rendimiento de 0.94 gr, los extractos medianamente polares tuvieron un aspecto sólido pastoso de color verde amarillento oscuro con un rendimiento de 0.82 gr y por último los extractos de alta polaridad con aspecto de aceite de color café oscuro, con olor dulce y con un rendimiento de 3.2gr.



Figura 12. Producto de alta polaridad.

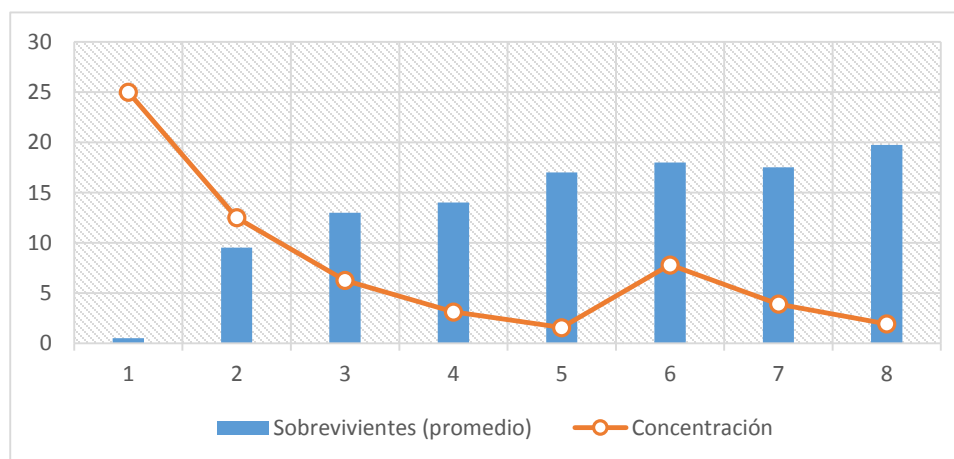
5.2. Actividad molusquicida.

Posteriormente se llevaron los extractos crudos al bioensayo como molusquicida, dando como resultado positivo, los extractos de alta polaridad. En este bioensayo se determinó el valor de la dosis letal al 50% y al 90% de la toxicidad del agave sobre los moluscos dulceaquícolas (*F. obrussa*) a través de un análisis de regresión empírica *Probit*, mediante el programa Singa Plot 9.0. Así que de acuerdo a este análisis, la dosis letal LD₅₀ corresponde a una dilución de 0.015 g / 20 mL (+ 0.003) equivalente a 7.5 g/L de la concentración 1:64 y para el caso de la LD₉₀ corresponde a 0.214 g / 20 mL (+ 0.056) que equivale a 107.5g/L en una concentración de 1:4 y 1:8.

Tabla 1. Bioensayo de mortalidad: *Agave angustifolia* (crudo) vs *Fossaria obrussa*.

Repetición	25 X 10 ⁻³ g/ml	12.5 X 10 ⁻³ g/ml	6.25 X 10 ⁻³ g/ml	3.12 X 10 ⁻³ g/ml	1.56 X 10 ⁻³ g/ml	7.8 X 10 ⁻⁴ g/ml	3.9 X 10 ⁻⁴ g/ml	1.93 X 10 ⁻⁴ g/ml	Control
1	1	8	12	14	17	19	18	20	20
2	0	10	13	15	18	18	17	20	20
3	1	9	15	14	16	18	17	19	20
4	0	11	12	13	17	17	18	20	20
Sobrevivientes (promedio)	0.5	9.5	13	14	17	18	17.5	19.75	20

Figura 13. Gráfico de mortalidad de *F.obrussa* post-exposición a extracto de *A. angustifolia* en las diferentes concentraciones a las 24 hrs.



5.3. Ensayo como antimicrobiano.

Finalmente para dar por terminado los bioensayos se realizó el de antimicrobiano, donde se demuestra que los extractos polares son los que tienen actividad antimicrobiana. Los resultados fueron observados por medio de la medición de los halos de inhibición y el porcentaje de inhibición relativa (%IR). Dichos resultados se observan en la tabla 2 y 3.

Tabla 2. Promedio de los resultados de la actividad antimicrobiana de diferentes extractos contra microorganismos de origen ambiental.

Microorganismos	Porcentaje de los halos de inhibición de los diferentes extractos en milímetros (mm).	
	Extractos	
	E1	E2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	17
* <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	28	21
** <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	20	10
** <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12	18
** <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	17
** <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	20

* Cepa sensible a meticilina.
 ** Cepa bacteriana aislada en diferentes zonas de la Ciudad de Puebla.
 E1. N-1; E2. N-1 Et-OH



Figura 14. Halos de inhibición provocados por los extractos orgánicos.

El porcentaje de inhibición relativa se calculó tomando como referencia la medida del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medida del diámetro de la zona de inhibición de los extractos evaluados (Ecuación 1). Los porcentajes obtenidos se observan en la tabla 3.

Ecuación 1
$$\%IR = \frac{DHE - DHCN}{DHCP - DHCN} \times 100$$

%IR. Porcentaje de inhibición relativa.

DHE. Diámetro del halo de inhibición del extracto (mm).

DHCN. Diámetro del halo de inhibición del control negativo (mm).

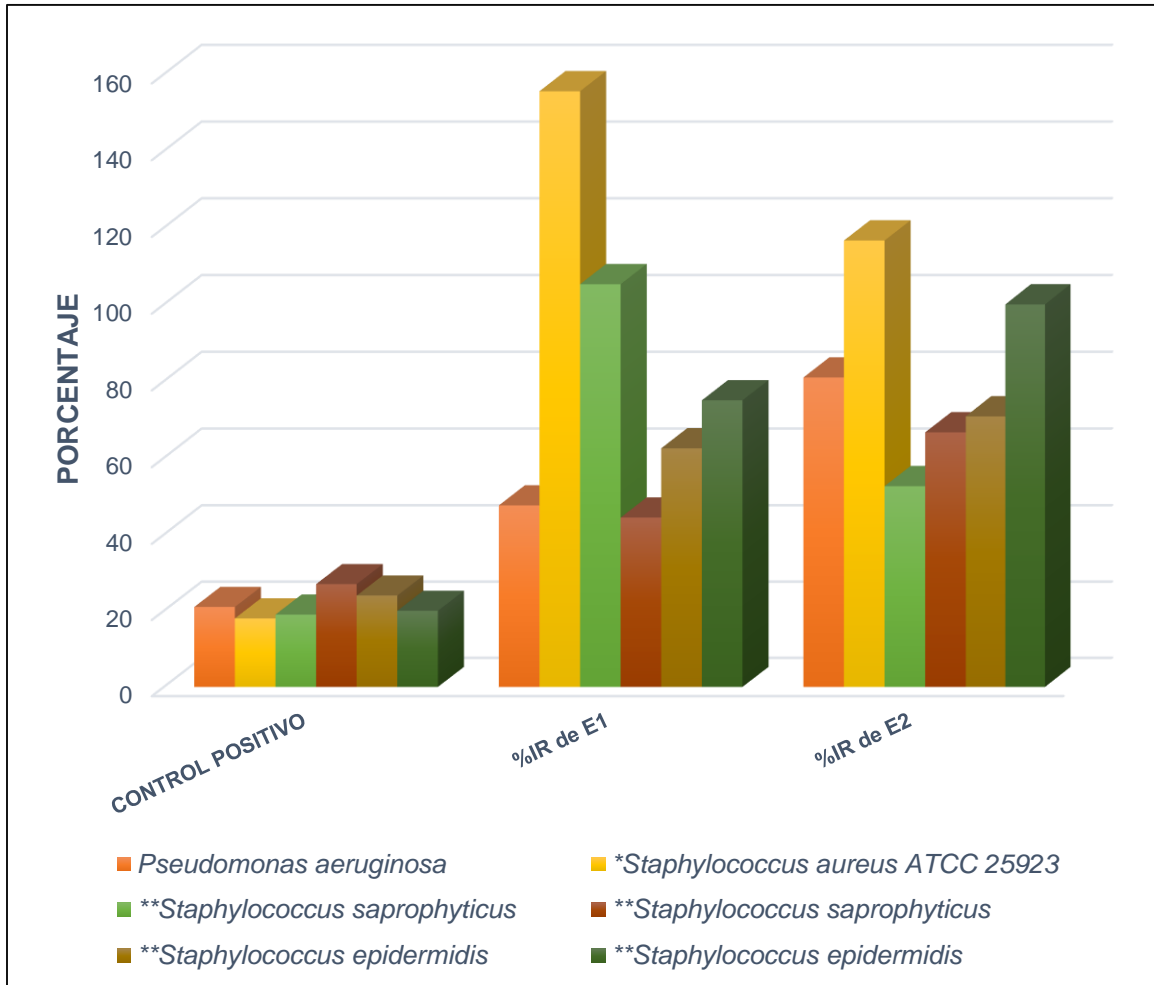
DHCP. Diámetro del halo de inhibición del control positivo (mm).

Tabla 3. Porcentajes de inhibición relativa de los extractos evaluados.

CEPAS	DHCP (mm)	Promedio de los halos de Inhibición de los diferentes extractos en milímetros (mm) / %IR	
		EXTRACTOS	
		E1	E5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	10/48	17/81
* <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	28/155	21/117
** <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	19	20/105	10/53
** <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	27	12/44	18/67
** <i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	15/62	17/71
** <i>Staphylococcus epidermidis</i>	20	15/75	20/100

* Cepa sensible a meticilina.
 ** Cepa bacteriana aislada en diferentes zonas de la Ciudad de Puebla.
 R. Resistente.
 E1. N-1; E2. N-1 MetOH;
 DHCP. Promedio del diámetro del halo de inhibición del control positivo (mm).
 %IR. Porcentaje de inhibición relativa.

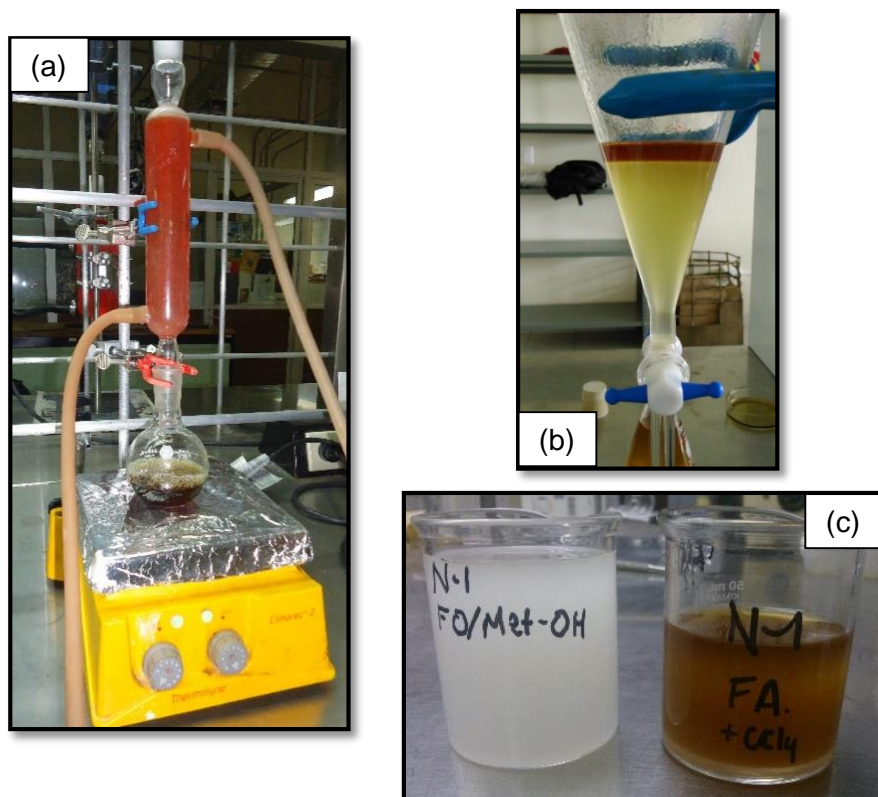
Grafico 2. Porcentaje de inhibición relativa de los extractos evaluados con las diferentes cepas microbianas y su comparación con los controles positivos (Imipenem y Vancomicina).



5.4. Cromatografía en capa delgada.

Una vez determinado que los extractos crudos de alta polaridad son los que contienen la actividad molusquicida y antimicrobiana, se realizó un análisis de pureza mediante la técnica de cromatografía en capa fina utilizando como fase estacionaria placas cromatográficas comerciales de óxido de aluminio y como fase móvil una mezcla de metanol-agua 8:2. Como revelador utilizamos luz ultravioleta a 254 nm descubriendo que los extracto contienen algunas impurezas. Se observaron 3 Rf (0.76, 0.46, 0.17 respectivamente) en la primera placa, después en la etapa de hidrolisis, el producto fue reflujaado durante 2 horas, al término de este tiempo se le realizó extracciones con cloroformo (figura 15) y otra cromatografía en capa delgada obteniendo como resultado un percolado debido a que se eliminaron los compuestos polares, obteniendo así 2 RF: el primero con un Rf= 0.42 y el segundo con Rf= 0.17 este quedó en el punto de aplicación. Todo este proceso tuvo como finalidad el obtener las sapogeninas.

Figura 15. Producto en reflujo (a), extracciones con cloroformo (b) y productos separados (c).



5.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los resultados en la identificación de saponinas en el extracto polar obtenido a partir de la fibra de agave por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se encuentran en la fig. 16. En dicha figura se puede apreciar que en un tiempo de retención (RT) de 5.628 minutos se observa de forma cualitativa que existe la presencia de saponinas, este resultado es cercano a la reportada en la literatura ya que en ella se habla de un tiempo de retención (RT) de 5.601 minutos.

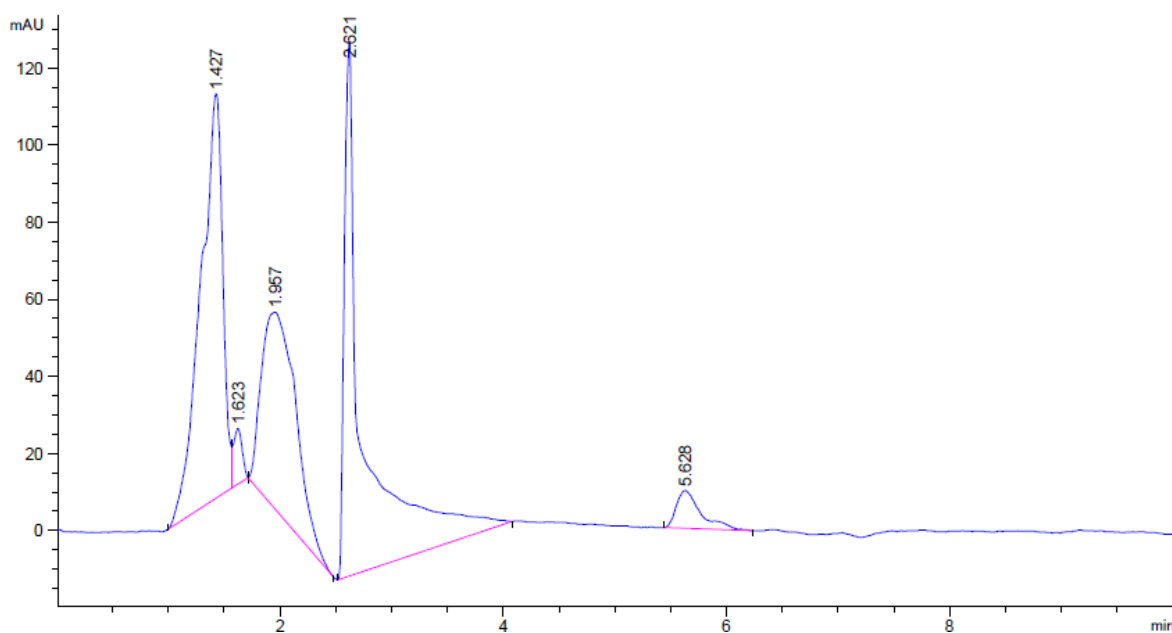


Figura 16. Cromatograma del contenido de saponina en extractos de alta polaridad de la fibra de *Agave angustifolia*.

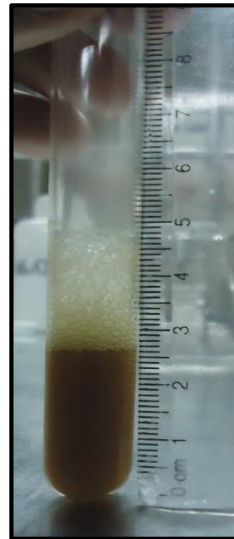
5.6. Pruebas químicas de identificación.

Las pruebas químicas de identificación a las que fueron sometidos los extractos, detectaron los compuestos químicos: saponinas-. TODAS LAS PRUEBAN DIERON POSITIVO.

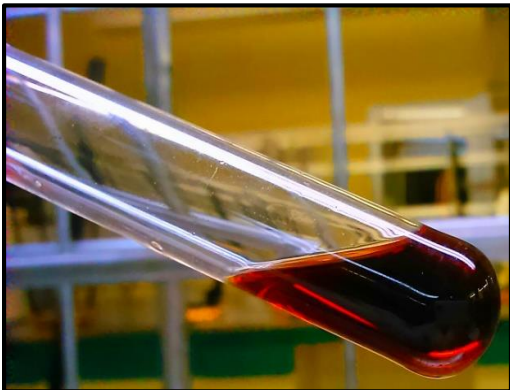
Figura 17. Pruebas Químicas de Identificación.



Liebermann- Burchard (Esteroles y triterpenos).



Prueba de espuma



Salkowski (triterpenos y esteroles).



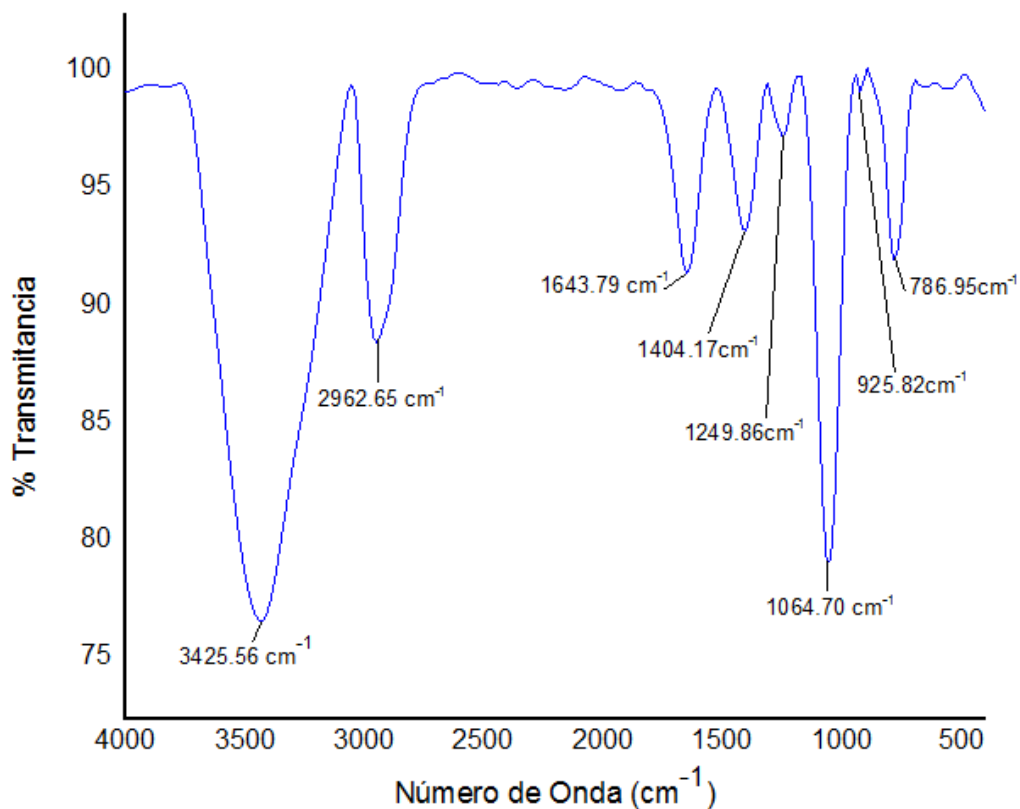
Hemólisis

5.7. Resultados espectroscópicos.

5.7.1. Infrarrojo.

El análisis espectroscópico de FT- IR de los extractos de alta polaridad, mostraron picos de absorción a 3425.56 cm^{-1} que corresponden a la vibración del enlace O-H, a 2962.65 cm^{-1} se observa la vibración de estiramiento de enlace $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, a 1643.79 cm^{-1} es asignada a la vibración del doble enlace C=O, a 1404.17 cm^{-1} se da la vibración de flexión del enlace C-H, a 1249.86 cm^{-1} es la vibración de estiramiento del enlace C-O-C del grupo éter, 1064.70 cm^{-1} se observa la vibración del enlace C-O de carbono unido al grupo hidroxilo.

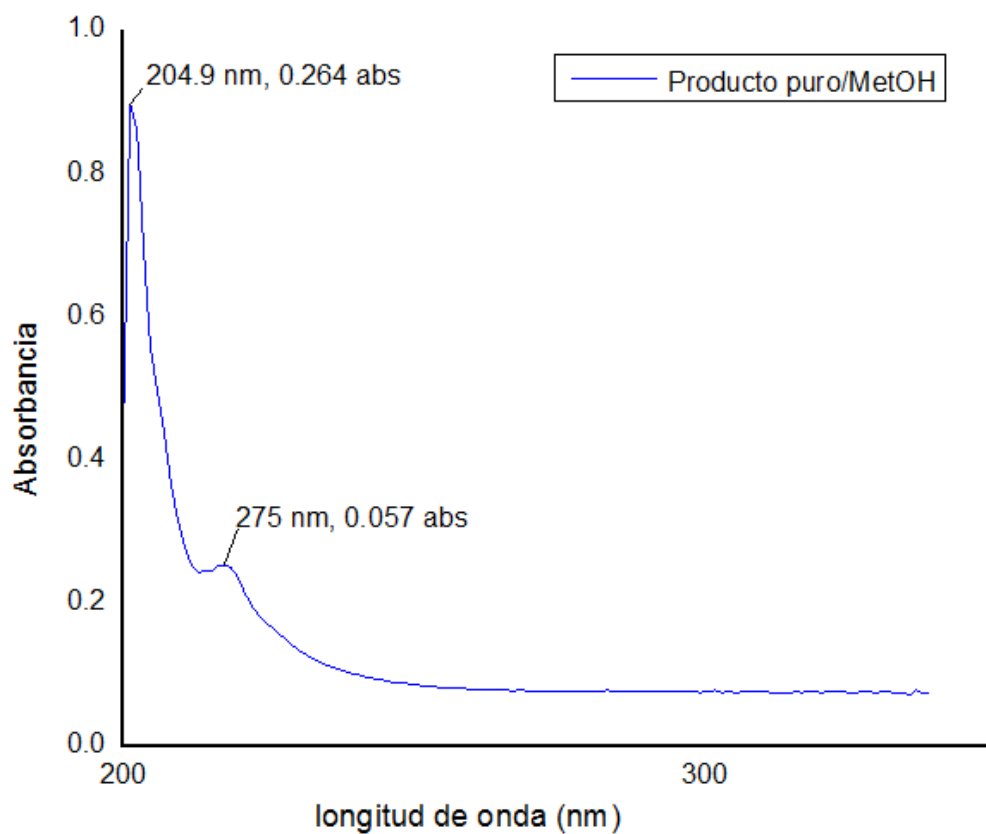
Figura 18. Espectro de infrarrojo.



5.7.2. Espectro de ultravioleta.

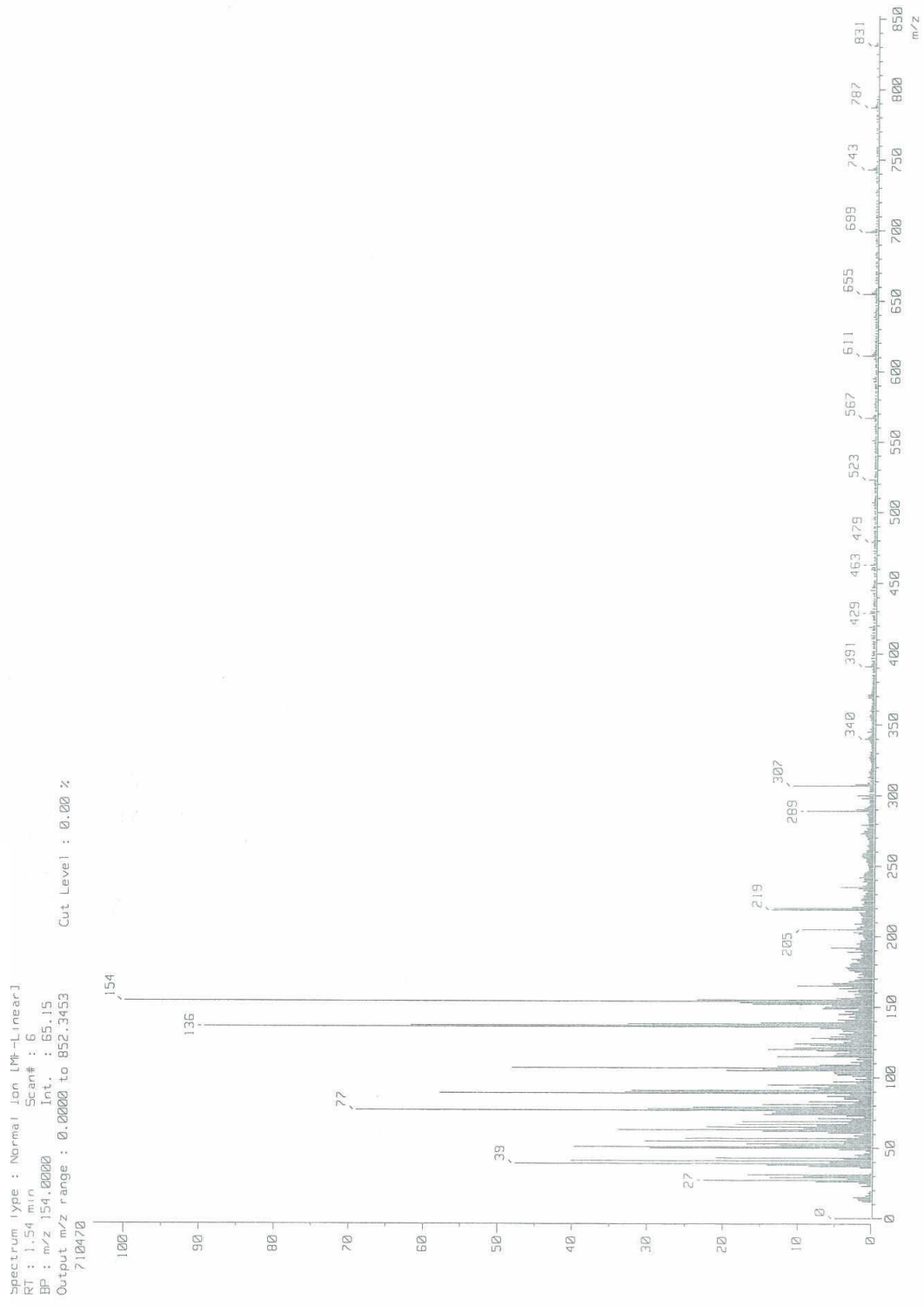
Para corroborar que teníamos una sapogenina se le realizó la espectroscopia UV-Vis de la muestra, utilizando metanol como disolvente. El resultado nos demostró la λ máxima de absorción a 204.6 nm y otra a 275.1 nm.

Figura 19 Espectro de UV-Vis.



5.7.3. Espectrometría de masas.

11:48

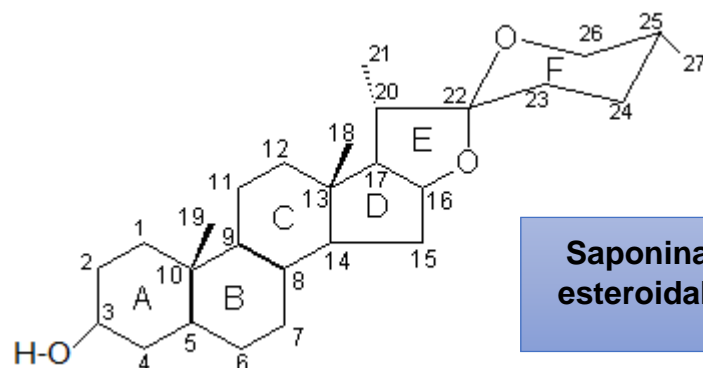


Todos los resultados espectroscópicos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de los análisis espectroscópicos de extractos de alta polaridad de *Agave angustifolia*.

IR cm ⁻¹	EM m/e	UV nm
3425.56	134	204.6
2962.65	154	275.1
1643.79	204	
1404.17	218	
1249.86	429	
1064.70		
786.0		

5.8. Estructura básica del compuesto.

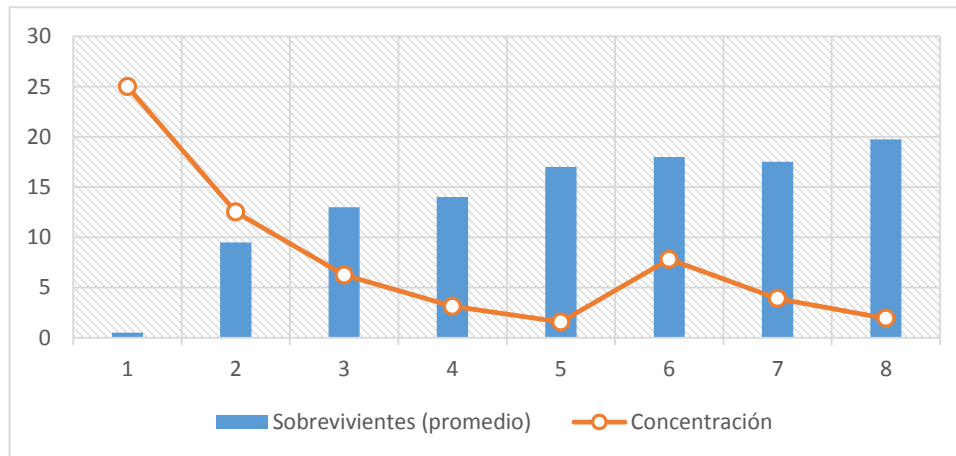


CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

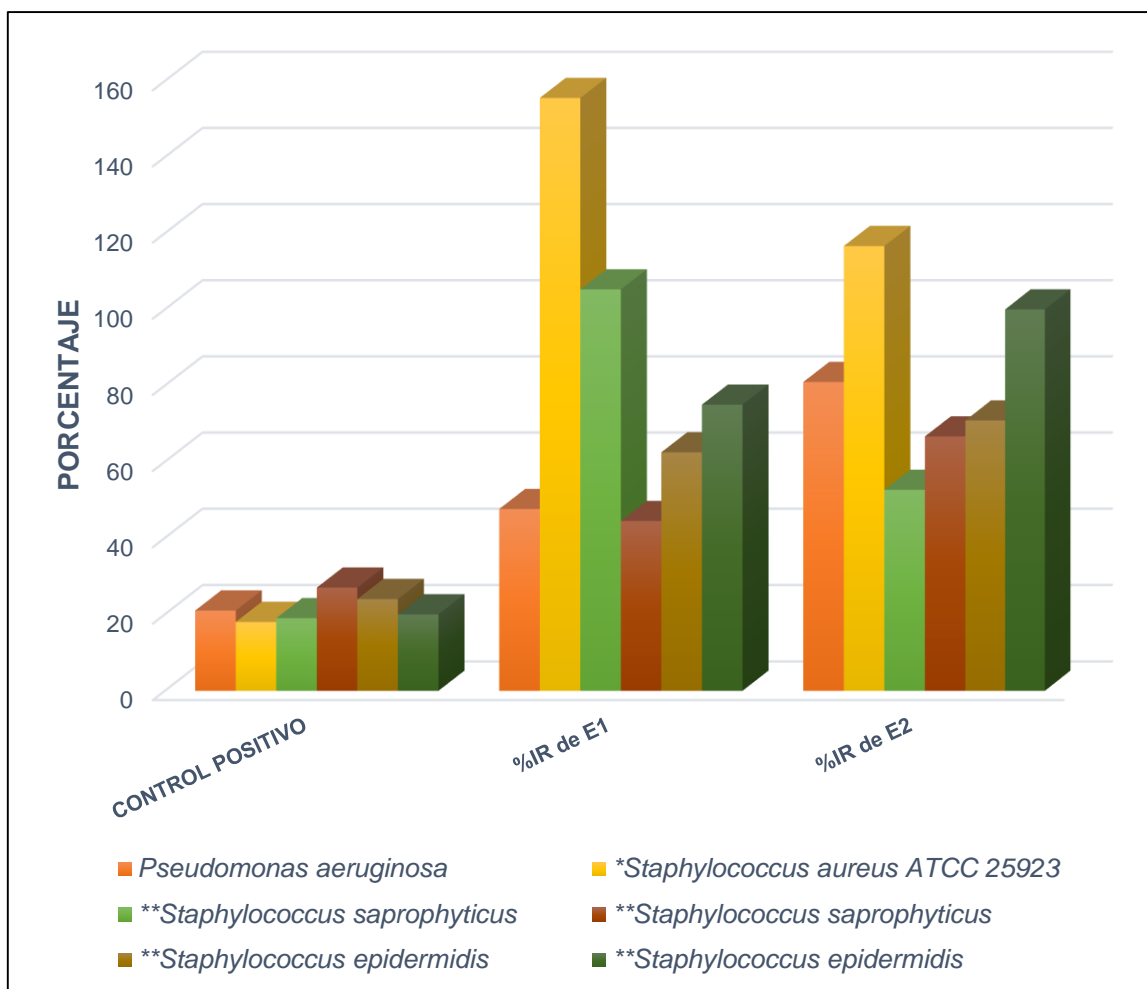
Uno de los propósitos de este estudio fue la obtención de los extractos a partir de la fibra de *Agave angustifolia* por método de extracciones con el equipo soxhlet utilizando solventes de baja, mediana y alta polaridad. Una vez que se obtuvieron, se probaron en bioensayos para observar si tenían actividad como molusquicida y como antimicrobiano. Finalmente se caracterizaron los productos que dieron positivo a las pruebas biológicas y de esta manera conocer la naturaleza química del compuesto responsable de tener dichos efectos.

Los resultados de la evaluación señalan que los extractos polares son los que tienen actividad molusquicida, determinando que la dosis letal al %50 (LD₅₀) de toxicidad sobre los moluscos dulceacuícolas (*F. obrussa*) corresponde a una dilución de 0.015 g/20ml (+ 0.003) equivalente a 7.5 g/L de la concentración 1:64 y para el caso de la dosis letal al %90 (LD₉₀) corresponde a 0.214 g/20 ml (+ 0.056) que equivale a 107.5 g/L en una concentración de 1:4 y 1:8.



Como puede observarse en la figura anterior a pesar de que la concentración del extracto va disminuyendo su efecto no cambia y al contrario este aumenta.

El bioensayo como antimicrobiano nos indica que los extractos polares obtenidos de *Agave angustifolia* poseen gran capacidad inhibitoria sobre las cepas bacterianas utilizadas. Los datos promedio de resistencia/susceptibilidad en función de los halos de inhibición en mm son: *Pseudomonas aeruginosa* 10/17 mm, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 28/21 mm, *Staphylococcus saprophyticus* 20/10 mm, *Staphylococcus epidermidis* 15/18 mm.



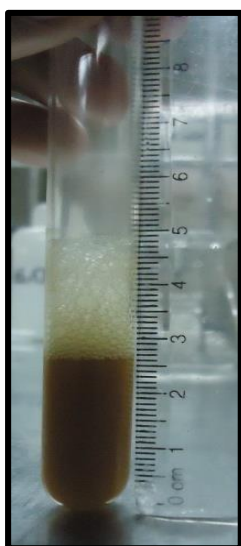
Además haciendo una comparación con los controles positivos (Imipenem y Vancomicina) vimos que dichos extractos (E1 Y E2) tienen un mayor porcentaje de inhibición relativa (%IR) registrándose para *Pseudomonas aeruginosa* 48 %IR, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 155 %IR, *Staphylococcus saprophyticus* 105 %IR, *Staphylococcus epidermidis* 75 %IR de esta manera los extractos muestran mayor capacidad inhibitoria y su papel como antimicrobiano además de molusquicida.

Es posible que la causa de la mortalidad que presentan los moluscos y la inhibición observada en las bacterias se deba al efecto de las saponinas contenidas en el agave, es bien sabido que estos compuestos forman parte de los metabolitos secundarios de las plantas y se ha demostrado que tienen actividades biológicas, por ejemplo, al contacto con la sangre son hemolíticos, con actividad citotóxicos, tienen efecto diurético, acción expectorante, efecto antiinflamatorio y son usadas en el control de insectos y en el desarrollo de nematodos, las cuales has sido reportadas en este sentido por López (2001), Argentieri et al. (2008), Lozano et al. (2012) & Botura et al., (2013). Por lo tanto se cree que dichos efectos biológicos son debido a que este metabolito secundario (saponina) forma complejos con los esteroides de las membranas celulares produciendo grandes poros en las mismas que altera la permeabilidad de la membrana celular y como resultado final, esta se lisa. Dichos mecanismos de acción fueron propuestos por Díaz en el 2009.

Por consiguiente para saber si nuestro agave contenía este metabolito se le realizaron pruebas químicas que nos darían idea de los compuestos presentes en esta planta. Flechas (2008), García y Castellanos (2010) y Maldonado y Guzmán (2012) utilizaron para sus experimentos pruebas químicas de identificación como prueba de espuma, Hemolisis, Molish, Rosemheim, Salkowski y Liebermann-Buchard, Vainillina y Antrona, en donde encontraron metabolitos como flavonoides, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, saponinas, sapogeninas, ácidos grasos y azúcares. Sin embargo, para nuestro experimento realizamos el tamizaje fitoquímico en base al maestro Domínguez en su libro de Fitoquímica en 1979 ya que se contaba con todos los recursos necesarios.

La primera prueba realizada fue la de espuma donde la bibliografía nos dice que se debe observar la formación de espuma, debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua, es decir, son tensoactivos naturales, además si la espuma tiene una altura de 5-9 mm hay un contenido bajo de saponinas, de 10-14 mm el contenido será moderado, una altura mayor de 15 mm habrá un alto contenido de saponinas. Además debe durar y ser estable por más de 2 minutos de tiempo. Teniendo esto en cuenta el resultado que obtuvimos fue una espuma con altura de 20 mm y fue estable por un tiempo de 30 minutos, superando los datos de

la bibliografía por lo tanto de primera instancia esto nos indica que nuestra planta tiene una cantidad importante de dicho metabolito. Debido a que esta prueba solo es presuntiva, se confirmó presencia de saponinas mediante otras pruebas como la prueba de hemólisis, al adicionar el extracto sobre un medio de cultivo de agar-sangre que presentó lisis de los glóbulos rojos en varias zonas. La naturaleza esterooidal de la saponina se sospechó al observar una coloración que pasa de verde oscuro a café-negro en la prueba de Liebermann-Burchard, que es característico de este tipo de compuestos, no así con las saponinas triterpénicas que generan un color rojo, rosado o púrpura. Demostrando que el compuesto contenido en los extractos de alta polaridad son saponinas ya que todas las pruebas siempre fueron positivas.



Prueba de Espuma



Prueba de Hemólisis



Prueba de
Liebermann-Burchard

Se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la separación e identificación del aglicón de las saponinas (sapogeninas). El contenido de sapogeninas comprobado por el HPLC en el extracto polar nos determinó su presencia aproximadamente a los 5 minutos de tiempo de retención; la presencia

de dicho componente fue reportado por Solarte y Osorio en el 2014 utilizando las mismas condiciones de medición por HPLC encontrando como saponina a la hecogenina (ver figura 20). En base a lo anterior nos hace pensar una vez mas que el efeco inhibidor de estos extractos puede estar generado por el contenido de saponinas, componente que ha sido reportado como potencial inhibidor de microorganismos patogenos, por ejemplo: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Lymnaea cubensis*, según lo reportado por Bedour y Fayez (1961), Hammuel et al. (2011), Botura et al. (2013) & Morales et al. (2014).

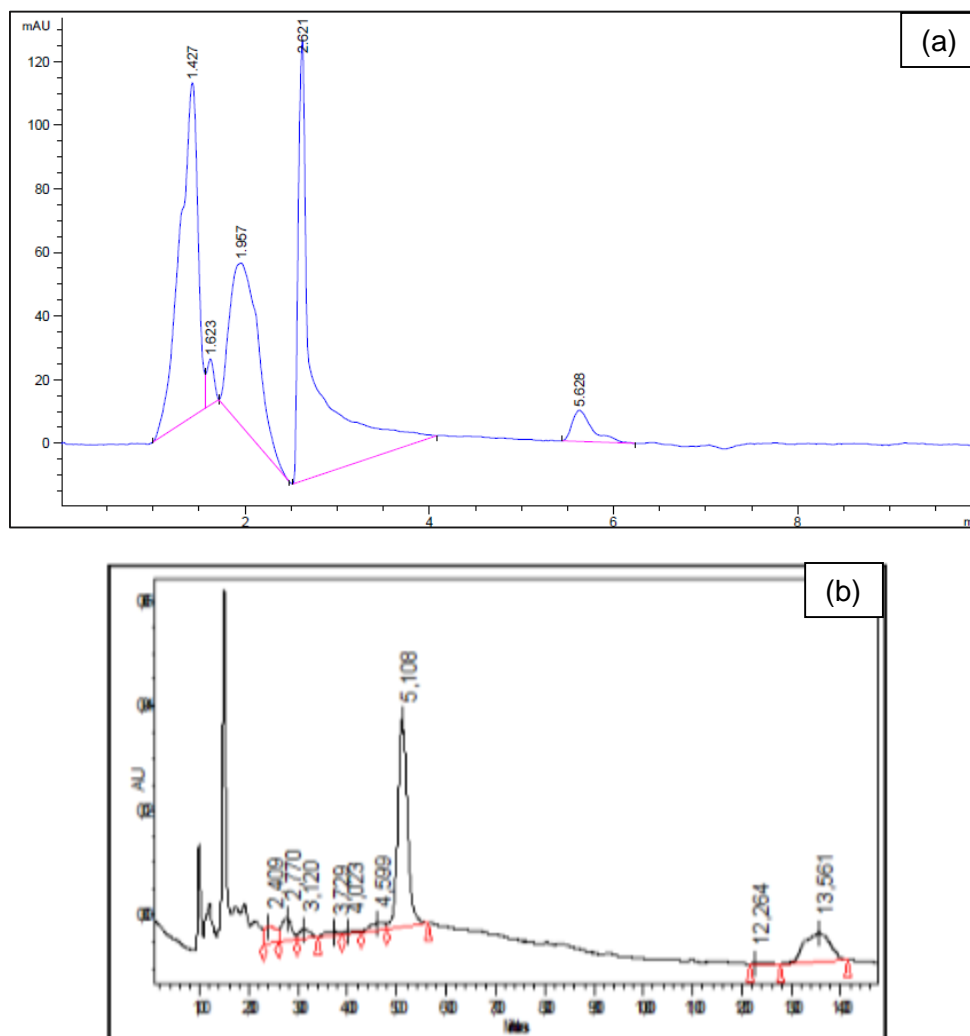
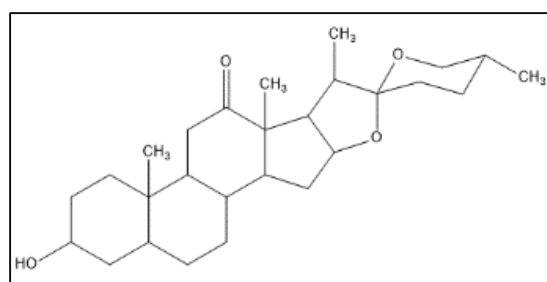
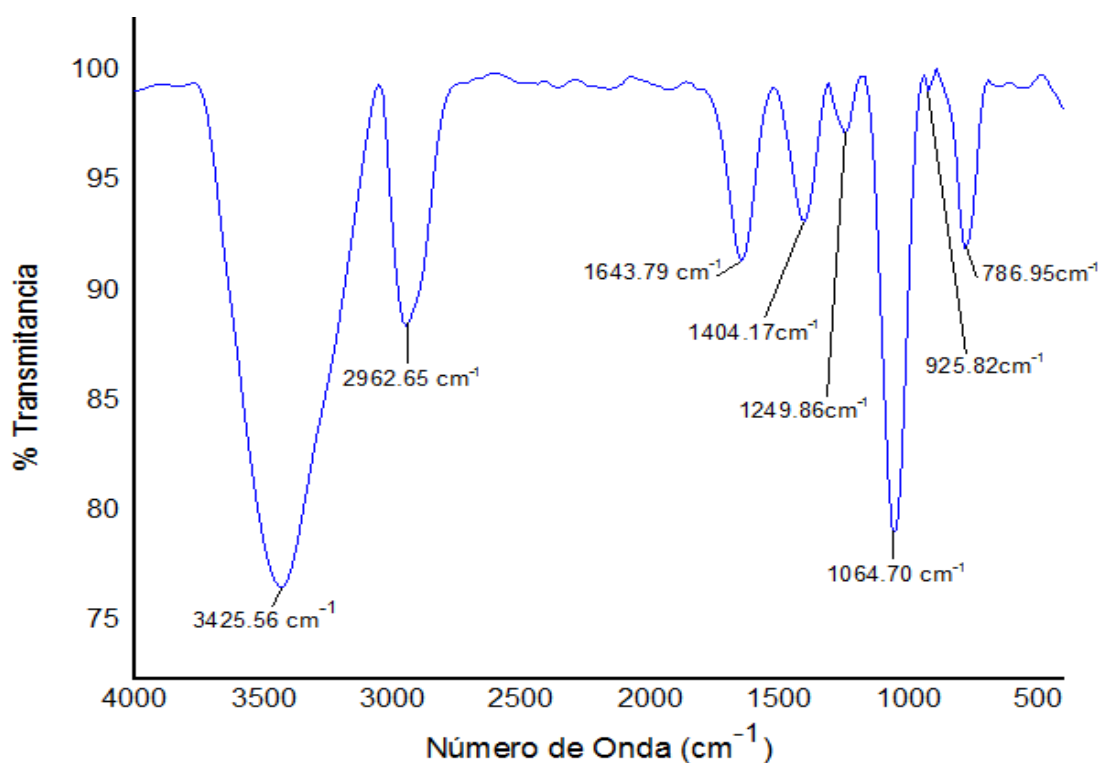
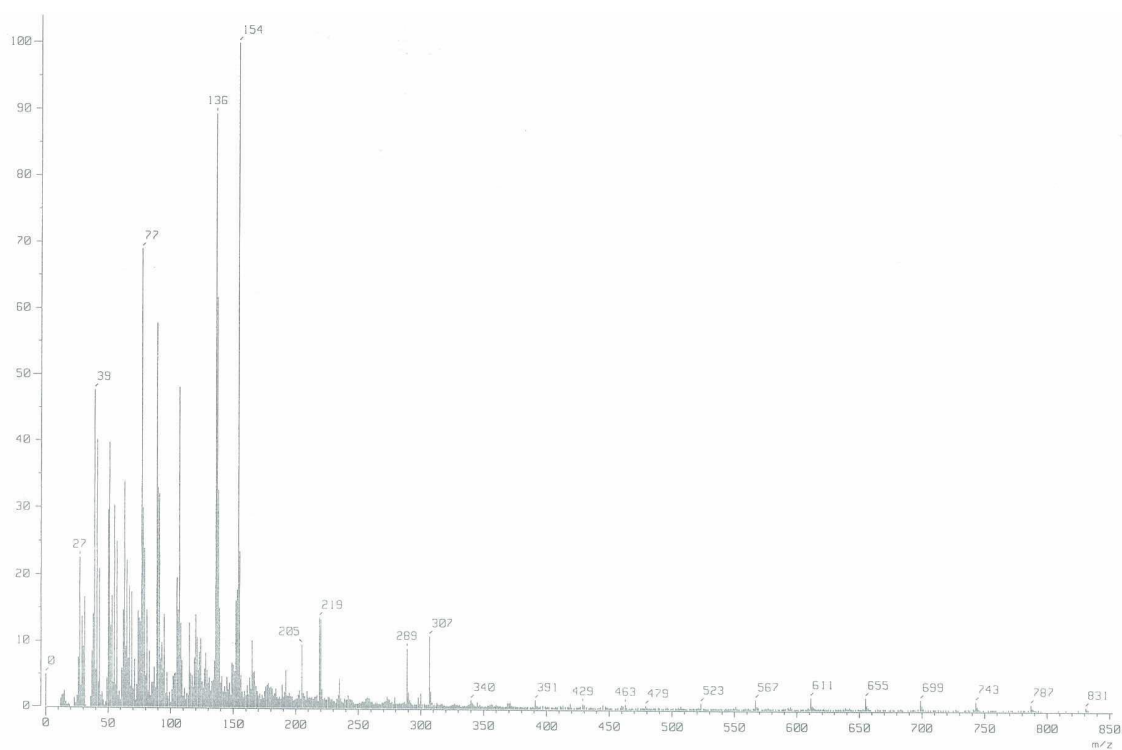
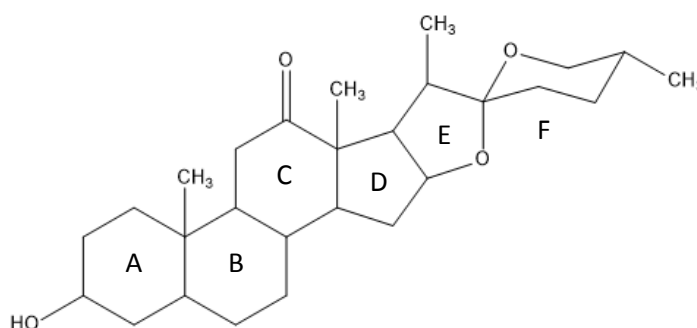


Figura 20. Cromatograma de contenido de saponina en el extracto polar de la fibra de *Agave angustifolia* (a), cromatograma del contenido de hecogenina en el experimento de Solarte y Osorio en el 2014 (b).

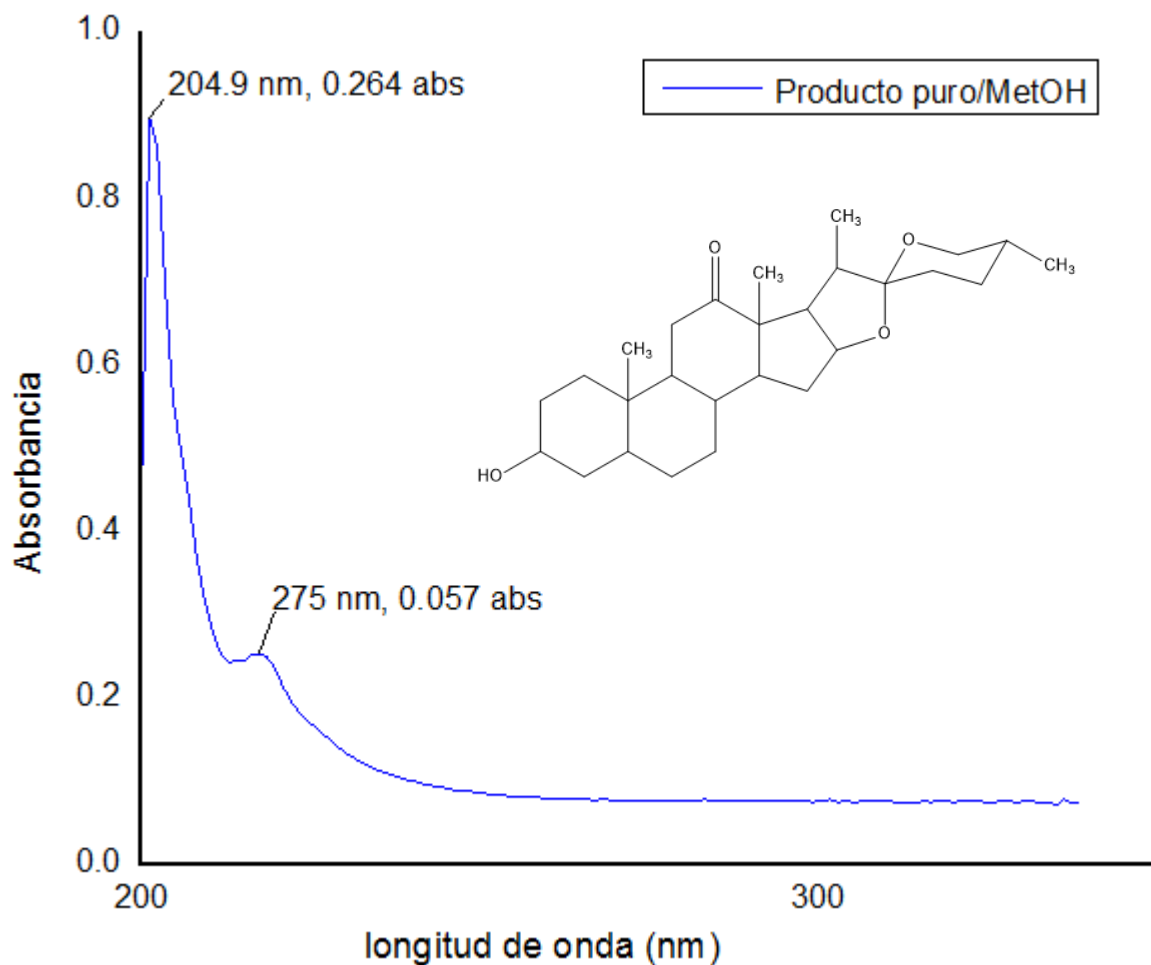
El análisis espectroscópico del FT- IR de los extractos de alta polaridad, mostraron picos de absorción característicos de grupos químicos que integran la molécula de saponinas esteroidales. Las señales típicas de estas molécula nos dan la vibración de estiramiento del enlace O-H del grupo hidroxilo corresponde a una banda ancha en 3425.56 cm^{-1} , a 2962.65 cm^{-1} se observa la vibración de estiramiento de enlaces de grupo metilos ($\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$), a 1643.79 cm^{-1} es asignada a la vibración del doble enlace $\text{C}=\text{O}$, a 1404.17 cm^{-1} se da la vibración de flexión del enlace C-H, a 1249.86 cm^{-1} es la vibración de estiramiento del enlace C-O-C del grupo éter, a 1064.70 cm^{-1} se observa la vibración del enlace C-O y por último una señal a 786.95 cm^{-1} .



Además dichos extractos mostraron un PM de 429 [M⁺], se observa un prominente pico base de 154 m/e este fragmento corresponde a C₉H₁₅ O₂⁺ originado por la ruptura entre los anillos e y d por el enlace C-16 y C-17 más la pérdida de un metilo. Cuando se pierden los anillos e y f nos queda un fragmento con una señal a 289 m/e, la siguiente señal se da a 236 m/e al además perder el anillo d, también se observa que la estructura restante conformada por los anillos a, b, c al perder una molécula de agua nos da una señal a 219 m/e y al perder además de la molécula de agua un metilo en el C-10 se ve una señal a 205 m/e. Por ultimo un pico a 136 m/e es generado por la fragmentación de una cadena C₉H₁₂O⁺.



El espectro en UV de los extractos manifestó una absorción con una fuerte señal a 204 nm que fue su λ máxima de absorción y otra del grupo cetónico a 275 nm que es característico de saponinas.



Por ultimo haciendo la fusión de todos los resultados se confirma que el compuesto responsable de la actividad molusquicida y antimicrobiana en los extractos de alta polaridad obtenidos a partir de la fibra de *Agave angustifolia*, es una saponina esteroideal.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el objetivo establecido en este trabajo se cumplió al obtener, caracterizar y evaluar la actividad molusquicida y antimicrobiana de los extractos de la fibra de *Agave angustifolia*.

- Los extractos polares de la fibra de *Agave angustifolia* presentaron satisfactoriamente efectos molusquicidas sobre una población de *Fossaria obrussa* en condiciones de laboratorio.
- El resultado de la prueba como molusquicida de los extractos polares con diferentes concentraciones permitió la identificación de las dosis letales 50% y 90% por un análisis empírico de regresión *Probit* y estableciendo de forma cuantitativa el efecto de dichos extractos, demostrando su gran actividad molusquicida.
- En la prueba microbiológica el extracto crudo de polaridad alta nos demuestra su actividad antimicrobiana al observarse halos de inhibición con datos promedio de resistencia/susceptibilidad en función de los halos de inhibición en mm son: *Pseudomonas aeruginosa* 10/17 mm, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 28/21 mm, *Staphylococcus saprophyticus* 20/10 mm, *Staphylococcus epidermidis* 15/18 mm.
- De acuerdo con las pruebas químicas existe la presencia de metabolitos secundarios en la fibra de *Agave angustifolia*, proponiéndonos a las saponinas esteroidales.
- El análisis de FT-IR en conjunto con UV-Vis, EM y HPLC nos indican la estructura básica del compuesto responsable de la actividad biológica, siendo las saponinas esteroidales.
- Los resultados indican que la fibra de *Agave angustifolia* posee efectos tóxicos sobre los individuos experimentados de *F. obrussa*, comprobamos que la LD₅₀ corresponde a una dilución de a7.5 g/L y la LD₉₀ a 107.5 g/L lo que corrobora la actividad molusquicida y como antimicrobiano ya que se obtuvieron %IR mayores a los controles, esto nos hace pensar como una alternativa para combatir estos tipos de microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Murray, P., Rosenthal K., Pfaller M. (2009). Microbiología Médica. Ed. Elsevier Mosby, España. Pp 871-873.
2. Molento, M., Fortes, F., Pondelek, D., Borges, F., Chagas, A., Torres-Costa, J., y otros. (2011). Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*, 126-132.
3. Nery, P., Duarte, E., & Martins, E. (2009). Eficácia de plantas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 330-338.
4. Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1–12.
5. Walker, T. S., Bais, H. P., De'ziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., Vivanco, J. M. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiol.* 134(1):320-331.
6. World Health Organization (WHO). 2011. Movilizar la voluntad política para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Bulletin of the World Health Organization* 2011. 89:168–169
7. Brown, C. 2004. Emerging zoonoses and pathogens of public health significance-an overview. *Rev Sci Tech Off. Int Epiz.* 23(2):435-442.
8. Jones, K. E., Patel, N. O., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Klevens, R. M., Morrison, M. A., Fridkin, S. K., Reingold, A., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L. H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J. M., Craig, A. S., Fosheim, G., McDougal, L. K., Tenover, F. C. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis.* 12(12):1991-1993.
9. Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 257. Pp 1064-1073.
10. Pan American Health Organization (PAHO). 1995. PAHO Regional Plan for Emerging Diseases. Washington, PAHO.
11. Ameenah, G.F. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*; pp. 1-93.
12. American Society of pharmacognosy. (2005). www.phcog.org. Recuperado el 11 de noviembre de 2012, de <http://www.phcog.org/definition.html>

13. Verastegui, Ma. (2000). Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de agaves y su acción sobre el tigmorfismo y dimorfismo de *Candida albicans*. Pp 44-50.
14. Nery, P., Duarte, E., & Martins, E. (2009). Eficácia de plantas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 330-338.
15. Naranjo Garcia, Edna. 2003. Moluscos continentales de México: Dulceacuículas. *Revista de Biología Tropical*. Sin mes. 495-505.
16. Uribe, Nelson, Becerra, Wlida Margarita, & Velásquez, Luz Elena. (2014). *Lymnaea cousini*, huésped de *Fasciola hepatica* en el trópico alto andino de Colombia, y sus nuevos haplotipos, confirmados con el marcador mitocondrial del gen de la citocromo oxidasa I. *Biomédica*.34. 598-604. Retrieved June 24, 2015,
17. Becerra Rozo, Wlida M. (2001) Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepática* en Latinoamérica, *Rev. Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol.14 (1). Pp: 28-35
18. Botura-Mariana, Dos Santos-Jener, da Silva-Gisele. 2013. In vitro ovicidal and larvicidal activity of the Agave sisalana Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*. Elsevier. Vol 192. Pp 211-217.
19. Murray, P., Rosenthal K., Pfaller M. (2009). *Microbiología Médica*. Ed. Elsevier Mosby, España. Pp 9-15.
20. Siliceo, B. (2014). Síntesis biogénica y evaluación antimicrobiana de nanopartículas de cobre utilizando extracto de *Citrus sinensis*. . Puebla.
21. Tortura, G., Funke, B. & Case, C. (2007). Anatomía Funcional de las células procariontes y eucariontes. En *Introducción a la Microbiología*. (pp.77-88). Buenos Aires.: Editorial Médica Panamericana.
22. Murray, P., Rosenthal K., Pfaller M. (2009). *Microbiología Médica*. Ed. Elsevier Mosby, España. Pp 209-223
23. Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J. A.; Piedrola-Angulo, G. (1987). *Pseudomonas* y Bacilos Gram-negativos no fermentadores. En Piedrola-Angulo, G. (ed) *Microbiología y Parasitología Médica*. Salvat Editores., Barcelona, España. pp 478-485.
24. Iglewski B. H. 1996. *Pseudomonas*. In: Baron, S., editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>
25. Madigan, M. T., Martinko, M. J., Parker, J. (1999). Diversidad procariótica: dominio Bacteria. En Capella, I., Álvarez, D., Aguado, P. (eds) *Brock Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall., Madrid, España. pp 635-740.

26. Walker, T. S., Bais, H. P., De'ziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiol.* 134(1):320-331.
27. Diekema, D. J., Pfalle,r M. A., Jones, R. N. 2000. Trends in antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998. *Int J Antimicrob Agents.* 13(4):257–271.
28. Casey, A. L, Lambert, P. A., Elliott, T. S. J. (2007). Staphylococci. *Int J Antimicrob Agents.* 29(3):S23-S32.
29. Górný, R. L., Dutkiewicz, J. (2002). Bacterial and Fungal Aerosols in Indoor Environment in Central and Eastern European Countries. *Ann Agric Environ Med.* 9(1):17–23.
30. Górný, R. L., Dutkiewicz, J., Krysińska-Traczyk, E. (1999). Size distribution of bacterial and fungal bioaerosols in indoor air. *Ann Agric Environ Med.* 6(2):105-113.
31. Tsai, F. C., Macher, J. M. (2005). Concentrations of airborne culturable bacteria in 100 large US office buildings from. The BASE study. *Indoor Air.* 15(s9):71–81.
32. Tang, J. W., Li Y., Eames, I., Chan, P. K., Ridgway, G. L. (2006). Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises. *J Hosp Infect.* 64(2):100-114.
33. Tang, J. W. (2009). The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J R Soc Interface.* 6(6):S737-S746.
34. Eames, I., Tang, J. W. Li, Y., Wilson, P. (2009). Airborne transmission of disease in hospital. *J R Soc Interface.* 6(6):S697-S702
35. Olivia Ligdao Chilián Herrera., "Toxicidad de *Agave angustifolia* sobre *Fossaria cubensis*, hospedero intermediario de *Fasciola hepática*". Tesis de Biología, Marzo 2007.
36. Molento, M., Fortes, F., Pondelek, D., Borges, F., Chagas, A., Torres-Costa, J., y otros. (2011). Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*, 126-132.
37. Cruz-Reyes, A., Chavarin, C., Campos-Arias, M. P., Taboada, J., & Jimenez, E. M. (1989). Actividad molusquicida del piquerol aislado de *Piqueria trinervia* (compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* págs. 35-40. Rio de Janeiro.
38. Marcano D. & Hasegawa M. (2002). Productos Naturales. En *Fitoquímica Orgánica* (pp. 29-32). Venezuela: Torino.

39. Jean Bruneton. (1993). *Farmacognosia. Fitoquímica Plantas Medicinales*. España: Acribia.
40. Cortez, V., Macedo P., Hernández, M., Arteaga, G., Espinosa, D. & Rodríguez J. (2004). *Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas*. *Biomédica*, 15, pp.123-136.
41. Ocampo, R. (1994). Elementos metodológicos para la domesticación de plantas medicinales. En *Domesticación de plantas medicinales de Centroamérica*. (Pp.75-78). Costa Rica.: Bib. Orton IICA / CATIE.
42. Loraine, Schlaepfer; Mendoza-Espinoza, José Alberto. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Octubre-Diciembre, 18-27.
43. Cruz Minier, Cristina; Castillo, Daisy. (2008). Etnobotánica en el Batey Palavé: prueba de sensibilidad y resistencia microbiana de cinco plantas utilizadas en atención primaria de salud. *Ciencia y Sociedad*, XXXIII Julio-Septiembre, 361-387.
44. Manzanero-Medina, Gladys Isabel; Flores-Martínez, Alejandro; Sandoval-Zapotitla, Estela; Bye-Boettler, Robert. (2009). ETNOBOTÁNICA DE SIETE RAÍCES MEDICINALES EN EL MERCADO DE SONORA DE LA CIUDAD DE MÉXICO. *Polibotánica*, Abril, 191-228.
45. Claramunt, R., Farrán, M., López, C. & Pérez, M. (2013). Introducción a la química de productos naturales. En *Química Bioorgánica y Productos Naturales*.(Pp.201-208). Madrid, España.: UNED.
46. Lincoln T. & Zeiger, E. (2006). Metabolitos secundarios y defensa en las plantas. En *Fisiología Vegetal*. (Pp.533-539). Madrid, España.: Universitat Jaume.
47. Ninoska, E., Jiménez, I. & López, I. (2006). Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana (Tesis Doctoral). España: Universidad de la Laguna.
48. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. & Wothers, P... (2012). Natural products.. En *Organic Chemistry*(pp.1413-1415). Reino Unido.: Oxford.]
49. Royal Botanic Gardens. (26 de septiembre de 2011). *World Checklist of selected Plant Families*. Recuperado el 21 de noviembre de 2012, de <http://apps.kew.org/wcsp/home.do>
50. Taiz, Lincoln y Eduardo Zeiger. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. 2006. Capítulo 13.
51. Mazza, G., Güçlü-Üstündag Ö. (2007). Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*. Vol. 47. Pp. 231-258.
52. Xorge A. Domínguez (1973). *Métodos de investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México.

53. San Martín, R. & Briones, R. (2000). Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *J. Sci. Food Agric.*, 80: 2063-2068.
54. García C. M, (2010). Evaluación del efecto sanitizante de un extracto biodegradable obtenido de la especie *Solanum marginatum*, de uso etnobotánico en Boyacá.
55. Benavides, O., Arango, O., Hurtado, A. & Rojas, M. (2012). Cuantificación de Sapogeninas del Jugo Fresco y Fermentado de Fique (*Furcraea gigantea*) mediante cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-PDA). *Información Tecnológica.*, 23, Pp.67-76.
56. José Orestes Guerra de León. (2009). Los glicósidos esteroidales, aislamiento y elucidación estructural. Cuba: Samuel Feijóo. ISBN: 978-959-250-541-4
57. Skoog, (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición.
58. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) (2006): *Mezcales y diversidad*, Mexico: CONABIO, (2ª edición)
59. Rodríguez B., Lomelí J., Tapia, E., Gutiérrez A., García J., Rodríguez J., Urbina D. & Vicente I. (2009). Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. Azul and *Agave angustifolia* Haw. var. Lineño. *Industrial Crops and Products*, 29, pp. 220-228.
60. Ávila A., Galicia N., Rodríguez M., Olvera C. & López A.. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of fructans. *Food Chemistry*, 129, pp. 380-386.
61. Morales, N., Zumaquero, L., Rojas, R., Vázquez, O., López, J., & Tovar, A. (2014). Obtaining of Polar Organic Extracts of *Agave angustifolia* and its Evaluation Antibacterial and Molluscicide. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4, pp.21-26. E- ISSN: 2249–1929.
62. Arrizon J., Morel S., Gschaedler A. & Monsan P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*, 122, pp. 123-130.
63. Morales-Rabanales Quetzali N., Lobo Sánchez A. Marta A., Trujillo-García Pilar, Peña-Rosas Ulises A., Tovar-Corona Alejandra. (2014). EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS POLARES DE *Agave angustifolia* COMO ANTIMICROBIANO. *Latinoamericana de Química*, 42, p.91. ISSN 0370-5943.
64. Rivas Rossi, M. (1996). *Cactáceas y suculentas del jardín botánico Lankester*. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
65. Chung K.T., Thomasson W.R. & Wu-Yuan Ch. (1990). Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria*, by plant extract. *Journal of applied bacteriology*. 69. Pp 498-503.

66. Grosvenor, P.V, Supriono, A and Gray, D.O. (1994). Medical Plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part. 2. Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology*.45.pp. 97-111.
67. Peana AT, Moretti MD, Manconi V, Desole G, Pippia P. (1997). Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. *Planta Medica*, 63, pp.199-202.
68. Fuertes, C.; Roque, M.; Tristan, M. (1997). Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* con actividad antibacteriana y antifúngica. Instituto de Microbiología UNMSM.
69. Martínez, M; López, M; Morejón, Z y Rubalcaba, Y. (2000). Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius raddi* "copal". *Rev. Cubana Plant. Med.* 5(1): 23-25.
70. Bernal-Alcocer, Artemiza; Zamora-Natera, Juan Francisco; Virgen-Calleros, Gil; Nuño-Romero, Ricardo. (2005). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Lupinus* spp. sobre Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, julio - diciembre, 140-146.
71. Almedia da Silva, P.; Bertucci, A.; Cerdeiras, M. P.; Olivaro, C.; Ramos, D.; Vázquez, A. (2007). 65-Actividad antimicrobiana de plantas del bosque de galería del río Uruguay. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Sin mes, 317-318.
72. Zampini, Iris C; Cudmani, Norma; Islas, María Inés. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, pp. 385-393.
73. Flechas, H., Sánchez, L., & Silva, J. (2008). Tamizaje fitoquímico y cálculo de rendimiento de sapogeninas esteroidales de tres procedencias de *Solanum quitoense* var. *septentrionale* "NARANJILLO". *Colombia Forestal*, 11, pp.201-214.
74. Orestes, J., Meneses, A., Simonet, M., Macías, F., Nogueiras, C., Gómez, A. & Escario, J. (2008). Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomonas vaginalis*. *Rev. Biol. Trop.*, 56, pp. 1645-1652. ISSN-0034-7744.
75. Avello Lorca, Marcia et al. Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. *Rev Cubana Plant Med* [online]. 2012, vol.17, pp. 73-83.
76. Lozano, M., Ticona E., Carrasco, C., Flores, Y. & Almanza, G. (2012). Cuantificación de saponinas en residuos de Quinoa real *Chenopodium quinoa* willd. *Revista Boliviana de Química*, 29, pp.128-135.
77. Botura, M. et al.. (2013). In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. Elsevier. *Veterinary parasitology.*, 192, pp. 211-217.

78. Yong Kong M, Perera de Puga G. (2001). Malacología médica. En: Llop Hernández A, Valdés-Dapena MM, Zuazo Silva JL. Microbiología y Parasitología Médicas.
79. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard. Document M100-S18. NCCLS, Wayne, PA.
80. Díaz Puentes, Luz Nelly. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, Julio-Diciembre, 32-55.
81. Domínguez, X. A. Métodos de Investigación. Fitoquímica. Ed. Limusa. México. 1979. p. 149-159.
82. Arteaga Crespo, y et al. (2010). Colofonia de pináceas cubanas para el control de enfermedades tropicales transmitidas por moluscos. *Rev. Chapingo* [online]. vol.16, n.1, pp. 31-36. ISSN 0186-3231. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2009.04.009>.
83. López Luengo Ma.Tránsito. (2001). Saponósidos. Elsevier, 20, 205-209.
84. Argentieri M., D' Addabbo T., Tava A., Agostinelli A., Jurzysta M., & Avato P. (2008). Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago spp*. *Eur Plant Pathol*, 120, pp.189-197.
85. Hammuel, C., Yebpella, G., Shallangwa, G., Magomya, A., & Agbaji, A. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Polish Pharmaceutical Society*, 68, pp.535-539. ISSN 0001-6837.
86. Bedour MS, Fayes MBE. (1961). Steroid sapogenins. V. The constituents of *Agave attenuate*, *A. macracantha*, and *A. angustifolia*. *J Chem U A R*. 4. pp 265-72.
87. Solarte, R., & Osorio, O. (2014). Evaluación de la concentración del jugo de Fique (*Furcraea spp*) para el control In Vitro de *Phytophthora infestans* en Plantas de Papa (*Solanum tuberosum*). *Información Tecnológica*. 25. pp. 47-54.