

# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA



DEPARTAMENTO DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

## “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DEL ESCAPO FLORAL DE *Agave salmiana*”

### TESIS

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias de Ingeniería Bioquímica**

Presenta:

IBQ. María Ivette Medina Galván

Directora de tesis

Dra. Aurea Bernardino Nicanor



Celaya, Guanajuato, México



Marzo 2014



"2014, Año de Octavio Paz"

Celaya, Gto., 06/03/2014

INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
No. de Oficio PIBQ-01-01-2014


ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ  
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
P R E S E N T E.


De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, con el fin de determinar la aprobación de impresión del proyecto de maestría titulado:

**"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DEL ESCAPO FLORAL DE *Agave salmiana*"**

Presentado por el (la) pasante: **C. IBQ. María Ivette Medina Galván**, comunicamos a Usted que esta Comisión Revisora ha tenido a bien aprobar la impresión de este trabajo.

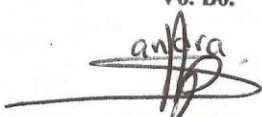
  
Dra. Aurea Bernardino Nicanor  
Presidente

  
Dr. Leopoldo González Cruz  
Secretario

  
Dr. Gerardo Acosta García  
Vocal

  
Dr. Javier Castro Rosas  
Asesor Externo

  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE CELAYA  
POSGRADO ING BIOQUÍMICA

Vo. Bo.  
  
M.C. SANDRA HERRERA PÉREZ  
COORDINADORA DEL POSGRADO  
DE INGENIERIA BIOQUIMICA



## **DEDICATORIA**

A Dios ser maravilloso que me dió fuerza y fe para creer lo que me parecía imposible de terminar, porque al trabajar bajo su mano, recibí aliento y consuelo para vencer los obstáculos que encontré en el camino.

A mi esposo Francisco Gómez, por su paciencia, su comprensión, por su amor, por apoyarme y cuidarme en esos malos ratos, porque tú sabes lo difícil que fue y siempre estuviste conmigo para alentarme durante todo este trabajo.

A mi hermoso hijo Santiago, que a pesar de su corta edad, mostró madurez para entender lo complicado de este trabajo, brindándome paciencia y muchos abrazos. Eres mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y espero poder llegar a ser un ejemplo para ti.

A mis padres J. Félix y Silva Galván, por su comprensión y ayuda en momentos malos y menos malos. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Así también por ayudarme con mi hijo mientras yo realizaba investigaciones y por estar a mi lado en cada momento de mi vida.

A mis hermanos Xochitl, Michelle e Iván, porque cada uno a su manera me apoyó a lograr mis metas profesionales.

A mi otra familia, Gómez Olvera, por su apoyo y aliento en todos los aspectos de mi vida, incluyendo el término de este proyecto profesional.

A todos ellos,

Muchas gracias de todo corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco sinceramente a mi directora y tutora de Tesis, la Dra. Aurea Bernardino Nicanor, por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador.

También me gustaría agradecer el apoyo y consejos recibidos a lo largo de estos 2 años por otros profesores del Departamento de Ingeniería de Bioquímica, que de una manera u otra han aportado su granito de arena a mi formación. Cabe destacar al Dr. Leopoldo González Cruz, al M.C José Mayolo Simitrio Juárez Goíz y al Dr. Gerardo Acosta García.

De igual manera agradecer al Dr. Javier Castro Rosas y a la Dra. Aidet, profesores de la UAEH, por su cálido recibimiento en mi estadía en la universidad, por su apoyo, por su paciencia, por su trato humano y su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, que ayudaron a formarme como persona e investigador.

A la Ing. Eva y familia, por su amistad y apoyo total en la estancia que realicé en Pachuca, Hidalgo. Les agradezco sus grandes atenciones y hospitalidad.

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecida a todos mis compañeros de trabajo, al IBQ. Gerardo Teniente, a la IBQ. Jocelyn Hernández, al estudiante Moisés Pantoja y a las personas de servicio social que me apoyaron bastante en especial a Yutzi González por su dedicación y buen humor. Para mí, son los mejores compañeros que se pueden tener. El ambiente de trabajo creado fue simplemente perfecto, y su visión, motivación y optimismo me ayudaron en momentos muy críticos de la tesis.

Para ellos,

muchas gracias por todo.

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES .....	2
1.1 Importancia de los agaves en México .....	2
1.2 Distribución y producción del género <i>Agave</i> .....	3
1.3 Morfología y taxonomía de las plantas del género <i>Agave</i> .....	5
1.4 Sistemas de reproducción del género <i>Agave</i> .....	7
1.4.1 Crecimiento y maduración.....	8
1.4.2 Floración .....	9
1.5 Compuestos de importancia biológica del género <i>Agave</i> .....	10
1.6 Compuestos con actividad antimicrobiana en el género <i>Agave</i> .....	11
1.7 <i>Agave salmiana</i> .....	13
1.7.1 Taxonomía de <i>Agave salmiana</i> .....	13
1.7.2 Morfología de <i>Agave salmiana</i> .....	13
1.7.3 Distribución geográfica.....	15
1.7.4 Importancia socioeconómica .....	15
1.7.5 Compuestos de importancia biológica.....	16
1.7.6. Compuestos con actividad antimicrobiana .....	17
1.8 Microorganismos patógenos de importancia en la industria alimentaria.....	18
1.8.1 <i>Escherichia coli</i> .....	19
1.8.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
1.8.3 <i>Salmonella typhimurium</i> .....	20
1.8.4 <i>Shigella sonnei</i> .....	21
1.8.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS .....	26

<b>CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material vegetal .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Análisis químico proximal .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Obtención de extractos .....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Determinación de la actividad antioxidante.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Determinación de contenido de fenoles totales .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Determinación de actividad antimicrobiana.....</b>	<b>29</b>
2.6.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	30
<b>2.7 Análisis estadístico.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8 Diagrama del proceso.....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Composición químico proximal.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Obtención de extractos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Determinación de actividad antioxidante.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 Determinación de contenido de fenoles totales .....</b>	<b>41</b>
<b>3.5 Determinación de actividad antimicrobiana.....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Principales usos del género <i>Agave</i> .....	3
<b>Tabla 1.2</b> Producción anual de <i>Agave</i> a nivel nacional e internacional .....	5
<b>Tabla 1.3</b> Clasificación taxonómica del <i>Agave salmiana</i> .....	13
<b>Tabla 2.1</b> Metodologías para la realización del análisis químico proximal.....	28
<b>Tabla 3.1</b> Composición química proximal de los escapos florales de <i>Agave salmiana</i> (g/100g de muestra fresca) (promedio de tres repeticiones $\pm$ D.E) .....	35
<b>Tabla 3.2</b> Comparación de la composición porcentual de escapo de <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave lechuguilla</i> (promedio de nueve repeticiones $\pm$ D.E) .....	36
<b>Tabla 3.3</b> Incremento en el rendimiento de extracción de compuestos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	37
<b>Tabla 3.4</b> Capacidad de extracción de los disolventes sobre compuestos de los escapos florales de.....	38
<b>Tabla 3.5</b> Determiación de la actividad antioxidante de los extractos de escapos florales de <i>Agave salmiana</i> (%) (promedio de tres repeticiones $\pm$ D.E) .....	39
<b>Tabla 3.6</b> Determinación de la actividad antioxidante promedio de escapos florales de <i>Agave salmiana</i> (%) (promedio de nueve repeticiones $\pm$ D.E).....	40
<b>Tabla 3.7</b> Determinación de la actividad antioxidante promedio de las secciones de los escapos florales de <i>Agave salmiana</i> (%) (promedio de nueve repeticiones $\pm$ D.E).....	40
<b>Tabla 3.8</b> Tiempo de vida media de la concentración de DPPH de los extractos de los escapos florales de <i>Agave salmiana</i> (min) .....	41
<b>Tabla 3.9</b> Determinación del contenido de fenoles totales de los extractos de escapos florales de <i>Agave salmiana</i> (*mg AG/mg de extracto seco) (promedio de tres repeticiones $\pm$ D.E).....	43
<b>Tabla 3.10</b> Determinación de fenoles totales promedio de los escapos de <i>Agave salmiana</i> (*mg AG/mg de extracto seco) (promedio de nueve repeticiones $\pm$ D.E) .....	43
<b>Tabla 3.11</b> Determinación de fenoles totales promedio de las secciones de escapos florales de <i>Agave salmiana</i> (*mg AG/mg de extracto seco) (promedio de nueve repeticiones $\pm$ D.E) .....	43
<b>Tabla 3.12</b> Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	48
<b>Tabla 3.13</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	52
<b>Tabla 3.14</b> Comparación de CMI de diferentes plantas y escapos de <i>Agave salmiana</i> .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Distribución nacional de las principales especies de la planta de <i>Agave</i> .....	4
<b>Figura 1.2</b> Conformación de la roseta en diferentes especies del género <i>Agave</i> A) <i>Agave tequilana</i> , B) <i>Agave americana</i> , C) <i>Agave salmiana</i> .....	6
<b>Figura 1.3</b> Morfología de los dos tipos de escapo del género <i>Agave</i> A) tipo paniculado, B) tipo espigado. ....	6
<b>Figura 1.4</b> Agentes polinizadores de género <i>Agave</i> . A) Murciélago, B) Colibrí. ....	7
<b>Figura 1.5</b> Desarrollo de hijuelos de <i>Agave attenuata</i> .. ....	8
<b>Figura 1.6</b> A) marcas desarrolladas durante el proceso de crecimiento de la hoja de <i>Agave lechuguilla</i> .....	9
<b>Figura 1.7</b> Desarrollo de la inflorescencia de diferentes especies de <i>Agave</i> A) <i>Agave nussaviorum</i> , C) <i>Agave potatorum</i> .....	9
<b>Figura 1.8</b> Componentes de <i>Agave salmiana</i> A) Flores, B) Escapo, C) Fruto y D) Semilla. ..	14
<b>Figura 1.9</b> Distribución en México de <i>Agave salmiana</i> .....	15
<b>Figura 1.10</b> <i>Escherichia coli</i> de la cepa O157: H7, tomada con microscopio electrónico de barrido en una ampliación de 8563x, bajo la tinción de Gram .....	19
<b>Figura 1.11.</b> <i>Listeria monocytogenes</i> tomada con microscopio electrónico de barrido, en una ampliación de 10000x .....	20
<b>Figura 1.12</b> <i>Salmonella typhimurium</i> (rojo), invadiendo cultivos de células humanas tomada con microscopio electrónico de barrido a color. ....	21
<b>Figura 1.13</b> Micrografía electrónica de barrido de <i>Shigella sonnei</i> infectando una célula humana (naranja).....	22
<b>Figura 1.14</b> Micrografía electrónica de barrido de <i>Staphylococcus aureus</i> , ampliada 10000x, tomada en un medio de cultivo con vancomicina. ....	23
<b>Figura 2.1</b> Tres diferentes etapas de desarrollo del escapo y sus secciones.....	27
<b>Figura 2.2</b> Secuencia para determinar la inhibición microbiana de los extractos, A) distribución de los sitios de aplicación de los extractos, B) superficie de acción de los extractos colocados en el agar, C) halos de inhibición producidas por extractos contra <i>E. coli</i> (círculos rojos).....	30
<b>Figura 2.3</b> Procedimiento de diluciones de muestras en la técnica de CMI.....	31
<b>Figura 2.4</b> Esquema general del proceso del proyecto .....	33
<b>Figura 3.1</b> Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y CFT en los escapos florales de <i>Agave salmiana</i> .....	44
<b>Figura 3.2</b> Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y CFT en las secciones de los escapos florales de <i>Agave salmiana</i> .....	44



<b>Figura 3.3</b> Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y CFR en los extractos.....	45
<b>Figura 3.4</b> Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y antimicrobiana en escapos de <i>Agave salmiana</i> .....	49
<b>Figura 3.5</b> Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y antimicrobiana en secciones de los escapos de <i>Agave salmiana</i> .....	49
<b>Figura 3.6</b> Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y antimicrobiana en los extractos de escapos de <i>Agave salmiana</i> .....	50

## RESUMEN

En algunas regiones de la parte central del territorio Mexicano, el cultivo de *Agave salmiana* se ha abandonado, provocando el desarrollo del escapo floral, por lo que la planta ya no puede ser utilizada para el aprovechamiento de los azúcares, sin embargo el *Agave* además de ser fuente importante de fibra y carbohidratos podría serlo también de compuestos antimicrobianos y antioxidantes, ya que en algunas regiones del país es utilizado en condiciones empíricas como agente desparasitante, por lo que se piensa que los compuestos responsables de dicha actividad son sintetizados a partir de las reservas de nutrimentos producidos durante la vida de la planta, que finalmente culminan con el desarrollo del escapo; bajo este contexto el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos del escapo floral de *Agave salmiana*, obtenidos con diferentes disolventes, así como determinar la influencia de la etapa de desarrollo de esta estructura sobre la concentración de dichos compuestos. Para lo cual, se utilizaron tres escapos de diferente altura, 3 m (E<sub>1</sub>), 2.5 m (E<sub>2</sub>) y 2 m (E<sub>3</sub>), seccionados en 3 partes S<sub>1</sub> (parte cercana a la piña), S<sub>2</sub> (parte central) y S<sub>3</sub> (parte más alejada de la piña), para obtener 5 extractos con disolventes de distinta polaridad, en adición al extracto crudo.

Los resultados obtenidos indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre la composición química proximal de los 3 escapos, así como entre sus respectivas secciones, mostrando una tendencia ascendente hacia el ápice del escapo en cuanto a contenido de humedad, cenizas, proteína y extracto etéreo se refiere, mientras que la mayor concentración de fibra y carbohidratos se concentra en la parte baja (S<sub>1</sub>). Por otra parte, el extracto acuoso de la sección media (S<sub>2</sub>) del escapo floral E<sub>3</sub> de *Agave salmiana* es fuente importante de compuestos antioxidantes y fenólicos; y el extracto acuoso de la misma sección pero proveniente de E<sub>2</sub> posee una concentración elevada de compuestos antimicrobianos y mayor espectro de acción contra microorganismos como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, y *Salmonella typhimurium*.

Finalmente, las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) para *Escherichia coli* se obtuvieron con los extractos acuosos (7.81 mg/mL), para *Shigella sonnei* (7.81 mg/mL, extracto etanólico), para *Salmonella typhimurium* (10.42 mg/mL, extracto metanólico) y para *Listeria monocytogenes* (10.42 mg/mL, extracto con hexano).

## ABSTRACT

In the central part of Mexican territory, the *Agave salmiana* cultivation has been abandoned, for this reason the agave development the flowering scape, whence the plant can not used for the utilization of sugars, however in addition to the high content of carbohydrates, the agave too could be an important source of antimicrobial and antioxidant compounds, considering that in some regions of Mexico is used empirically as a deworming agent, in this sense, is probably that the compounds responsible for this activity are synthesized from the nutrients reserved in the agave throughout the life of this plant; in this context the aim of this project was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of extracts obtained of the flowering scape of *A. salmiana* using different solvents, to evaluate the influence of development stage on the concentration of compounds with antimicrobial and antioxidant activity. Three flowering scape with different height E<sub>3</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>1</sub> (2, 2.5 and 3 m respectively) were used, everyone cutted into 3 parts, S<sub>1</sub> (nearing to pine), S<sub>2</sub> (middle part) and S<sub>3</sub> (apical part); hexane, acetone, methanol, ethanol and water as extraction solvents to obtain 45 extracts in addition to the 9 crude extracts obtained by pression.

Significant differences were observed between 3 flowering scapes and their respective sections on the chemical composition, showing that the moisture, ash, protein and ether extract content were higher in the apical part than nearing pine part, an inverse behavior was observed in the fiber and carbohydrates concentration. Respect to the antioxidant activity and phenolic content, the higher value was obtained of the aqueous extract from E<sub>3</sub>-S<sub>2</sub>. While in the E<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> the higher value of antimicrobial activity and broad spectrum was observed , against *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, and *Salmonella typhimurium*. However, the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for *Escherichia coli* (7.81 mg/mL from aqueous extracts ), *Shigella sonnei* (7.81 mg/mL from ethanol extracts), *Salmonella typhimurium* (10.42 mg/mL from methanol extracts) and *Listeria monocytogenes* (10.42 mg/mL from hexane extract).

## INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es muy amplio, por lo que muchas de sus especies no han sido estudiadas desde el punto de vista nutracéutico, tal es el caso de *Agave salmiana* la cual es una de las 90 especies reportadas como endémicas de México, localizada principalmente en los estados de Hidalgo, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí, donde es utilizado en la elaboración de bebidas alcohólicas como el pulque y el mezcal, para mezclas en la construcción, base para la obtención de fibra y elaboración de platillos tradicionales como el mixiote (García, 2007).

Actualmente *Agave salmiana* ha adquirido cierta importancia en el área de investigación, debido a que en diferentes estudios realizados con hojas, raíz y flores, se han aislado diversos compuestos como saponinas (triterpenos), flavonoides, alcaloides y taninos, los cuales poseen elevada actividad antioxidante (Fernández, 2008), además de triterpenos glicosilados utilizados como agentes antifúngicos (Calange, 2011) y flavonoides con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Castillo *et al.*, 2007).

Sin embargo, el cultivo de *Agave salmiana* en algunas regiones de la parte central del territorio Mexicano se ha abandonado, por lo que es común observar el desarrollo de su escapo floral, etapa en la cual los azúcares ya no pueden ser utilizados para la elaboración de pulque u otra bebida, por lo que los productores aprovechan la inflorescencia como alimento para humanos o la totalidad del escapo como agente desparasitante para rumiantes, por esta razón se considera que durante el desarrollo de esta estructura se podría sintetizar una mayor concentración de compuestos con actividad antimicrobiana y antioxidante o bien compuestos distintos a los aislados a partir de las otras estructuras de la planta, que podrían ampliar el espectro de acción contra microorganismos patógenos de interés en la industria alimentaria, por lo que es importante caracterizar el escapo floral desde el punto de vista nutracéutico y antimicrobiano.

## CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

### 1.1 Importancia de los agaves en México

En México, el género *Agave* tiene gran importancia cultural, sin dejar de lado su impacto social, económico, agrícola y ecológico, debido a sus múltiples usos. Su aprovechamiento se remonta a la época prehispánica, cuando los pueblos indígenas y mestizos del centro y norte del país lo utilizaban como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de la hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros (**Tabla 1.1**) (García, 2007).

La importancia socioeconómica del *Agave* es evidente por el uso que se le dá para la alimentación del ganado, ya que constituye una de las mejores opciones forrajeras, sobre todo en las zonas semidesérticas. De la planta se utilizan las hojas y la cabeza (piña) para potencializar el contenido nutrimental, al proporcionar las cantidades necesarias de azúcares, fibra cruda y minerales (Ca, Mg, Zn, Fe y Cu), que satisfacen los requerimientos diarios del ganado; por otro lado se ha reportado que la adición de las partes aéreas como la inflorescencia (sistema de ramificación que produce flores) y la flor, en la dieta, mejoran su digestibilidad (García *et al.*, 2010).

Ciertas partes del *Agave*, han sido utilizadas en la obtención de productos específicos, tal es el caso de las pencas, las cuales se han usado en la fabricación de fibra, dirigida a la confección de cuerdas, telas, redes y bolsas; el escapo ha sido utilizado como material de construcción; y la planta entera se ha manejado como barrera natural que alcanza una altura de hasta 6 m, actuando como rompe vientos y barreras contra la arena del desierto (Vargas, 2009).

Los agaves, también son utilizados como hospederos o sustratos para la producción de insectos comestibles, entre los cuales se encuentran los escamoles, que son larvas de la hormiga *Liometopun apiculatum* y *Liometopun occidentale*; el gusano blanco (*Acentrocneme hesperiaris*), el cual posee un elevado valor nutrimental y socioeconómico para las familias que se dedican a su recolección; y el gusano rojo (*Hypoptya agavis* B.), también llamado chinicuil, que se consume frito o molido para la elaboración de salsas (García *et al.*, 2010).

**Tabla 1.1** Principales usos del género *Agave*

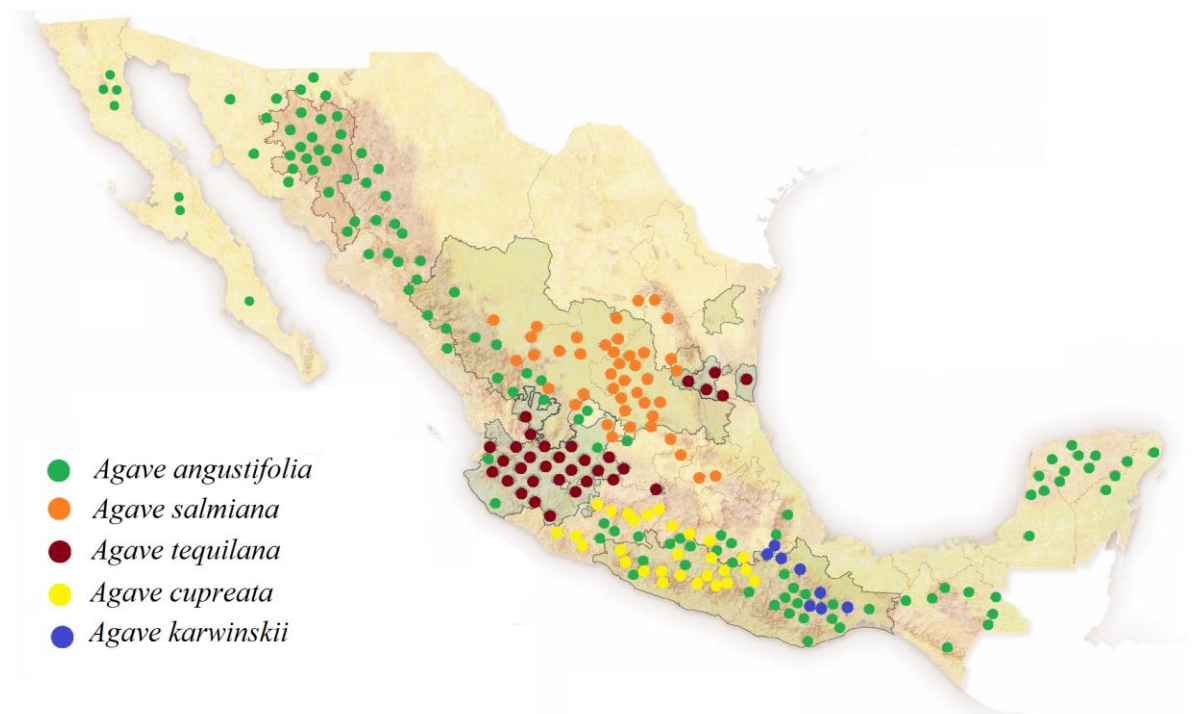
Usos	Producto	Parte de la planta
Alimentación	Azúcar	Tallo (cabeza de agave o piña)
	Guisos	Flores y frutos
	Dulce	Flores y frutos
	Envoltura (barbacoa)	Hojas
	Mixiotes	Cutícula de las hojas
	Gusanos blancos	Cutícula de cogollo
	Gusanos rojos	Hojas
	Pan de pulque	Tallo (cabeza de agave o piña)
	Tortillas	Perianto (envoltura que rodea a los órganos sexuales) de flores
Bebidas	Aguamiel, miel, atole de aguamiel, pulque, mezcal, tequila, sotol, bacanora, vinagre y jarabe.	Tallo (cabeza de agave o piña)
Agrícola	Cerca viva	Planta completa
	Evita erosión como formadora de suelo fértil.	Planta completa
	Abono orgánico (fertilizante)	Composta de hojas
Forraje	Planta líder de ecosistemas	Planta completa
	Bovinos, caprinos y porcinos.	Hojas, escapo floral, flores y bagazo.
Medicina	Diuréticos, antisifilítico, laxante, antiescorbútico, anticancerígeno y producción de esteroides.	Hojas y escapo.
Construcción	Cercas, casas, corrales.	Escapo y hojas.
	Canales para colectar agua de lluvia.	Hojas
Fibras	Aditivo para mezcla.	Extracto de hojas.
	Escobetillas y cepillos para limpieza.	Fibras de hojas

Fuente: García *et al.*, 2010.

## 1.2 Distribución y producción del género *Agave*

El género *Agave* se encuentra ampliamente distribuido desde la región meridional de Estados Unidos de Norteamérica hasta Centroamérica, distribuyéndose en más del 75% del territorio de nuestro país, partiendo desde Jalisco, hasta Yucatán, pasando por los estados de Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Morelos, México, Guerrero entre otros (**Figura 1.1**) (Verduzco, 2008).

El género *Agave* es abundante en las zonas áridas y semiáridas del centro y norte del país, tales como, las planicies y bases de las montañas de las zonas áridas y semiáridas de la península de Baja California, Sonora, el Altiplano Mexicano (de Chihuahua y Coahuila a Guanajuato y Querétaro), la planicie Tamaulipeca, el Valle de Tehuacan-Cuicatlán y la Cuenca del Río Balsas; así también como en sitios escarpados y expuestos dentro de los bosques templados y en paredes rocosas en las barrancas de los ríos de las provincias biogeográficas de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Serranías Meridionales y Sierra Madre del Sur, su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en estados como Tabasco, Campeche y Quintana Roo (García, 2007).



**Figura 1.1** Distribución nacional de las principales especies de la planta de *Agave* (CONABIO, 2008).

En nuestro país, los principales estados productores del género *Agave* son Jalisco, Oaxaca, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Zacatecas y Puebla, siendo Jalisco el principal productor (**Tabla 1.2**) (SIAP, 2011). A nivel internacional, México es el principal productor del género *Agave*, con respecto a otros países como EUA, Cuba, Guatemala y El Salvador (**Tabla 1.2**), únicos países reportados en la estadística de FAOSTAT (FAOSTAT, 2010).

**Tabla 1.2** Producción anual de *Agave* a nivel nacional e internacional

<b>Estado</b>	<b>Producción periodo 2010-2011 (Ton/año)</b>
<b>Aguascalientes</b>	175
<b>Colima</b>	320
<b>Durango</b>	90
<b>Guanajuato</b>	88597.00
<b>Guerrero</b>	7150.25
<b>Hidalgo</b>	76439.30
<b>Jalisco</b>	1092546.54
<b>México</b>	7707.00
<b>Michoacán</b>	67210.00
<b>Morelos</b>	16801.24
<b>Nayarit</b>	36545.39
<b>Oaxaca</b>	329411.79
<b>Puebla</b>	25174.40
<b>Querétaro</b>	2076.00
<b>San Luis Potosí</b>	482
<b>Zacatecas</b>	29560.00
<b>País</b>	<b>Producción periodo 2010-2011 (Ton/año)</b>
<b>Colombia</b>	14000
<b>Cuba</b>	2800
<b>Ecuador</b>	3200
<b>El Salvador</b>	1900
<b>EUA</b>	2500
<b>Guatemala</b>	110
<b>Nicaragua</b>	4700
<b>Filipinas</b>	3400

Fuente: SIAP, 2011, FAOSTAT, 2010.

### 1.3 Morfología y taxonomía de las plantas del género *Agave*

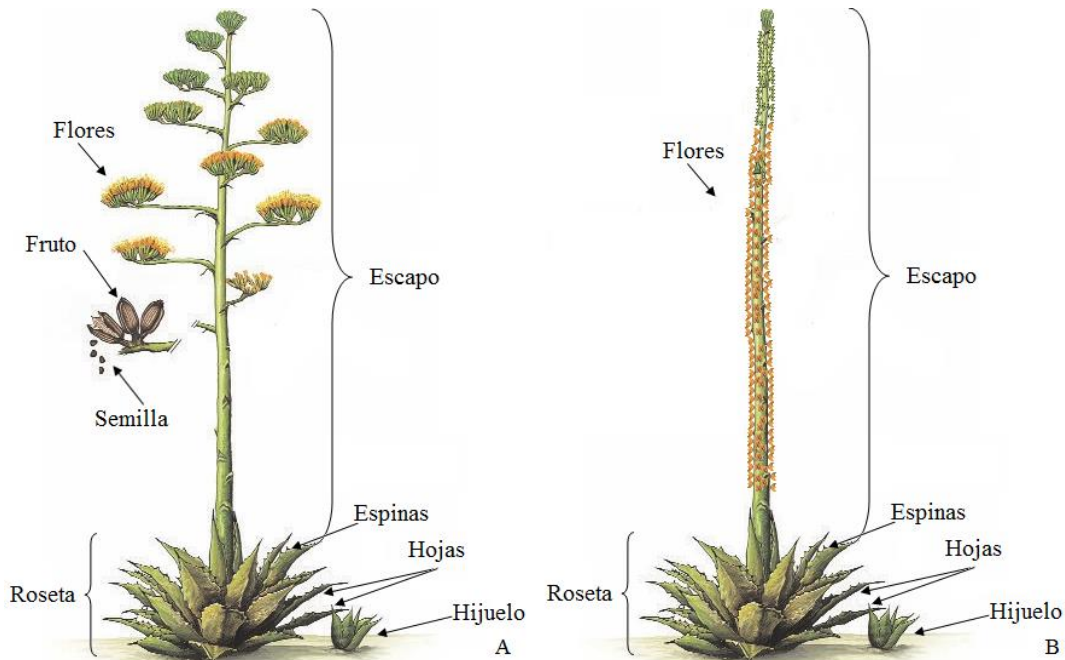
El cuerpo de la planta de *Agave*, por la disposición de sus hojas, usualmente toma la forma de una roseta (**Figura 1.2**), en donde acumulan compuestos necesarios para crecer y florecer (carbohidratos, minerales, aminoácidos, etc.).





**Figura 1.2** Conformación de la roseta en diferentes especies del género *Agave* A) *Agave tequilana*, B) *Agave americana*, C) *Agave salmiana* (Pérez, 2010)

Su tallo, es un brote muy corto y visible con dificultad en el cual, una vez que la planta madura se origina el escapo (vástago de inflorescencia), desarrollándose como una larga porción terminal recta, de hasta 12 m de largo, con un tipo diferente de hojas o brácteas. Esta inflorescencia puede tener forma paniculada o espigada, en función a la subespecie que pertenezca, siendo *Littaea* la subespecie que presenta un escapo espigado y la subespecie *Agave*, la que desarrolla el escapo paniculado (**Figura 1.3**) (Verduzco *et al.*, 2008).



**Figura 1.3** Morfología de los dos tipos de escapo del género *Agave* A) tipo paniculado, B) tipo espigado (modificado de CONABIO, 2008).

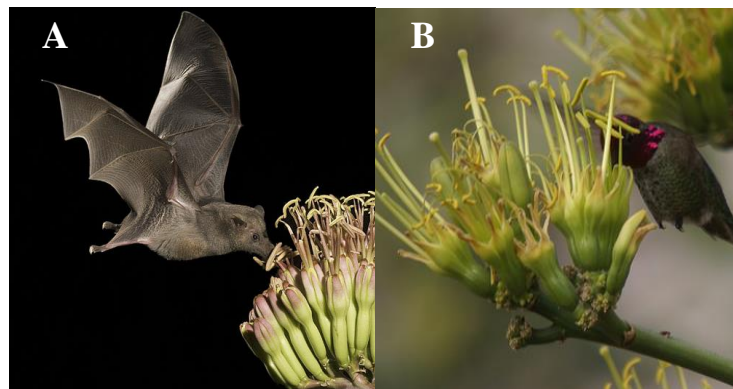
Por otra parte la identificación taxonómica, de la familia *Agavaceae*, se ha visto obstaculizada por diversos factores como: el fenómeno de hibridación en condiciones naturales, la disponibilidad de los caracteres anatómicos y la gran diversidad en el número cromosómico entre sus especies. Sin embargo, avances en estudios químicos, ecológicos y genéticos, acerca

de la morfología, endemismo y taxonomía de estas plantas han generado valiosa información, en cuanto a su clasificación taxonómica (UNIBIO, 2010).

#### 1.4 Sistemas de reproducción del género *Agave*

La reproducción del género *Agave* puede ser por las dos vías, sexual o asexual, cuando se lleva a cabo por la vía sexual, la fecundación se realiza por medio de la polinización que efectúan algunos animales, principalmente murciélagos (*Leptonycteris curasoae*, *L. nivalis*, *Choeronycteris mexicana* y *Glossophaga sp.*) y en menor grado insectos, que pueden ser diurnos o nocturnos (palomillas, abejas, abejorros) además de aves (colibríes) (**Figura 1.4**) (Verduzco *et al.*, 2008).

Una vez realizada la polinización, el desarrollo de la semilla es modulada por factores involucrados en el éxito de la germinación, como son la temperatura, la especie de la planta, contenido de humedad, tipo de sustrato y el ambiente de origen (ráfagas de aire, frecuencia de las precipitaciones, etcétera). Sin embargo, la baja disponibilidad de humedad y las elevadas temperaturas en las zonas áridas y semiáridas en que se encuentran las plantas de *Agave*, hacen que el proceso de germinación sea esporádico, con rendimientos entre 25 a 32% (García, 2007).



**Figura 1.4** Agentes polinizadores de género *Agave*. A) Murciélago, B) Colibrí (Melton, 2008).

Por otra parte, la reproducción asexual implica el enraizamiento y la separación de una parte de la planta original, de ésta manera, las células, tejidos u órganos desprendidos se desarrollan directamente en nuevos individuos (hijuelos) (**Figura 1.5**).

Las estructuras a partir de las cuales puede ocurrir la separación pueden ser; los bulbillos (yemas auxiliares de consistencia carnosa que almacenan reservas) de la planta, o puede darse

la fragmentación de una planta debida al deterioro y muerte del individuo parental o bien de los tejidos de interconexión, como en el caso de los brotes de las raíces (García, 2007).

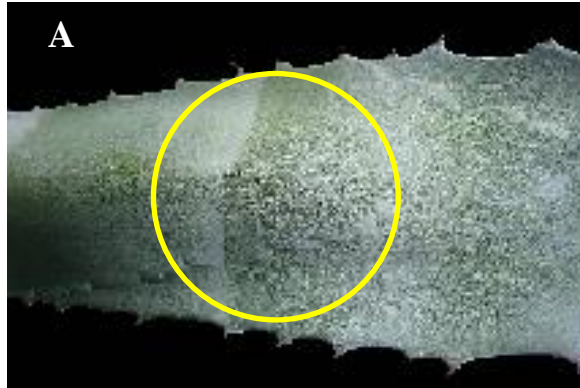


**Figura 1.5** Desarrollo de hijuelos de *Agave attenuata*. (Martínez 2009).

#### **1.4.1 Crecimiento y maduración**

Durante el crecimiento y maduración del *Agave*, se generan cambios en las hojas, en las primeras etapas de crecimiento, se caracteriza por poseer forma lanceolada, entre 5 a 10 cm de largo y 3 a 7 cm de ancho, la aparición de las espinas sucede de manera gradual, siendo al comienzo muy cortas y delgadas de hasta 1 cm de largo, su coloración es grisácea tornándose a café-rojizo con la maduración y se disponen en el perímetro de la hoja de forma acanalada. La hoja al llegar a la madurez desarrolla una textura áspera al tacto, cambiando su coloración verde característica por tonalidades verdes oscuros inclusive grisáceas dependiendo la variedad y su tamaño llega a alcanzar hasta 1.5 m de largo y de 25 a 47 cm de ancho (Fernández, 2008).

La disposición de las hojas comienza con la formación del cono central o cogollo, formado por hojas tiernas centrales las cuales posteriormente se organizan en forma de empalme para formar la roseta (**Figura 1.6**), este proceso requiere entre 8 y 10 años aproximadamente, tiempo suficiente para su maduración y desenvolvimiento sucesivo, dejando en las hojas externas una marca o impresión sobre el envés de la hoja con la que tiene contacto directo, dándole un aspecto particular a la roseta, marca que perdura hasta que la planta muere (**Figura 1.6D**) (Verduzco, 2008).



**Figura 1.6** A) marcas desarrolladas durante el proceso de crecimiento de la hoja de *Agave lechuguilla* (Baldwin 2009)

### 1.4.2 Floración

Antes de iniciar la etapa de floración, las hojas de la parte terminal de la roseta cambian, se hacen más delgadas, pierden las espinas laterales y posteriormente se transforman en brácteas (hojas originadas sobre el tallo floral), las cuales disminuyen gradualmente su tamaño conforme se localizan hacia la parte apical del pedúnculo floral (Cortés *et al.*, 2009). Después de la etapa de adelgazamiento y formación de brácteas, comienza la formación del escapo floral, justo en la parte central de la planta, el cual puede llegar a medir hasta 18 m, dependiendo la especie. En el extremo del escapo se origina la inflorescencia que puede presentarse en forma paniculada (en forma de panal) o espigada (en forma de espiga) (**Figura 1.7**) (Correa, 2010).



**Figura 1.7** Desarrollo de la inflorescencia de diferentes especies de *Agave* A) *Agave nussaviorum*, C) *Agave potatorum* (Salazar, 2010).

La coloración junto con la producción del polen de las flores de la planta de *Agave*, representan los factores principales de atracción de sus agentes polinizadores (murciélagos y aves), éstos inician el proceso de polinización, al transportar el polen a los órganos sexuales femeninos de la planta, localizados en la parte aérea de la misma; una vez fecundados los óvulos, se desarrolla el fruto, que al llegar a la madurez produce las semillas que servirán luego para el desarrollo de una planta nueva (Fernández, 2008).

### 1.5 Compuestos de importancia biológica del género *Agave*

Además de los usos tradicionales, los agaves se han utilizado como fuente de compuestos para elaborar productos de elevada especialización como: esteroides, productos para cosméticos, diuréticos, antisifilíticos, laxantes, antiescorbúticos, anticancerígenos, antiinflamatorios, entre otros, por lo que lo convierte en una excelente especie para el estudio fitoquímico, siendo sus hojas o pencas, una fuente importante de metabolitos secundarios, pudiendo encontrarse especialmente saponinas esteroidales (hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina) y flavonas (dihidrobonducelina y dihidroeucomina, principalmente) (Fernández, 2008).

El tipo de disolventes utilizados en la extracción de este tipo de compuestos es un factor decisivo en el tipo de compuesto a extraer, es así que: el **metanol** por sus características puede aislar compuestos como fenoles, flavonoides, quinonas, saponinas, taninos, coumarinas, alcaloides y antocianinas (Raaman, 2006); el **etanol** puede extraer alcaloides, fenoles, taninos, antocianinas y catecolaminas (Cirilo, 2008); la **acetona** permite la separación de compuestos como los flavonoles, hidroxiflavonas, aminoácidos, fitoesteroles y fitostanoles (Marcano, 2009); el **agua** facilita la extracción de compuestos como carbohidratos, glucósidos, saponinas, proteínas, aminoácidos, fenoles y taninos (Raaman, 2006) y finalmente el **hexano** puede arrastrar compuestos como esteroides, terpenos y carotenos (Marcano, 2009). La mayoría de estos compuestos han sido aislados con anterioridad de diversas plantas con la finalidad de ser utilizadas como agentes antioxidantes y antimicrobianos (Díaz, 2009), inclusive para el tratamiento de cáncer así como de algunas enfermedades cardiovasculares y problemas renales (Martínez-Flores *et al.*, 2011).

Ejemplo de ello es el estudio realizado en las hojas de *Agave brittoniana*, que sugiere a las saponinas esteroidales extraídas (clorogenina, hecogenina, tigogenina, rockogenina,  $\beta$ -sitosterol, diosgenina y yucagenina) como antiparasitarios en contra de *Trichomona vaginalis*, un protozoo patógeno flagelado, que provoca la enfermedad conocida como trichomonosis o tricomoniasis, que es una infección de los genitales (Orestes *et al.*, 2008).

Por otra parte, las hojas y flores de *Agave lechuguilla* contienen saponinas esteroidales (esmilagenina y gitogenina) como principales metabolitos secundarios, los cuales son utilizados como precursores esteroidales, antiinflamatorios o bien como suplemento alimenticio en la engorda de borregos (Hernández *et al.*, 2005).

Finalmente, a partir de la raíz y hojas de *Agave sisalana* se han aislado 3 flavonas (5,7-dihydroxiflavona, caempferol 3-rutinosida-4-glucosida y caempferol 3,2-ramnosilrutinosida) y 7 homoisoflavonas (7-O-metileucomol, 3'-deoxisapanona, ( $\pm$ )-3,9-dihidroeucumina, dihidro-bonducelina, 7-hidroxi-3-(4-hidroxibenzil)-cromana, 5,7dihidroxi-3-(4'-hidroxi-benzil)-4-cromanona y 5,7-dihidroxy-3-(3'-hidroxi-4'-metoxibenzil)-4-cromanona), las cuales se reportan como poseedoras de efectos inmunosupresivos (Yu *et al.*, 2009).

## **1.6 Compuestos con actividad antimicrobiana en el género Agave**

Las especies vegetales poseen de manera natural mecanismos de resistencia ante el ataque de patógenos los cuales pueden ser constitutivos (histológicas o químicas) o defensas inducidas por factores externos. Los constitutivos comprenden barreras físicas, procesos de lignificación, suberización y formación de calosa así como la formación de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas como parte de la estructura de los tejidos. Las defensas inducidas por su parte, son un proceso complejo que parte desde la señal química o elicitor que desencadena la producción de enzimas del metabolismo secundario, cuyo resultado final sería la síntesis de compuestos antimicrobianos, los cuales afectan además de los patógenos, a los consumidores de las plantas y a sus enemigos naturales (Montes, 2009).

La defensa mediante compuestos químicos tiene dos vertientes:

- 1) Aquellos compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, que están estructuralmente presentes en todas las etapas del desarrollo de la planta, en alguna

fase de su ciclo biológico.

- 2) O bien que son producidos después de una infección pero a partir de compuestos ya existentes y que algunos autores llaman “inhibitinas” o también “compuestos constitutivos”.

Éstos últimos compuestos se pueden encontrar siempre en concentraciones suficientes para inhibir el desarrollo de patógenos o bien, pueden encontrarse en las plantas sanas en una forma inactiva y después de la infección son convertidas en productos antimicrobianos por medio de reacciones bioquímicas cortas y simples, como la hidrólisis enzimática (Baldizán *et al.*, 2007). Los compuestos antimicrobianos constitutivos pertenecen a las principales clases de compuestos secundarios, como son, terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno, los cuales se presume no ejercen una función directa con el crecimiento y desarrollo de la planta, como la fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz *et al.*, 2010).

Actualmente el género *Agave* ha sido objeto de estudio como fuente de compuestos antimicrobianos, por ello se han realizado diversos análisis fitoquímicos y de sensibilidad antimicrobiana, considerando cada una de las partes que componen a la planta (hojas, flores, raíz). Dado la naturaleza del *Agave*, las técnicas más utilizadas han sido las extracciones con disolventes orgánicos, mostrando una concentración mínima inhibitoria contra una gran variedad de microorganismos, que incluyen bacterias, hongos y algunas levaduras (Lozano *et al.*, 2011).

Por ejemplo, se ha reportado que los extractos metanólicos y etanólicos de las hojas y flores del *Agave aspérrima*, poseen elevadas concentraciones de saponinas y alcaloides, que inhiben el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) en *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*, dos hongos que se clasifican como potenciales hepatocarcinógenos (Lozano *et al.*, 2011).

Mientras que los extractos metanólicos del *Agave americana*, poseen principalmente alcaloides que afectan de manera importante la producción de aflatoxinas del hongo *Aspergillus parasiticus* (Rosas *et al.*, 2011).

Por otro lado, el extracto metanólico de las hojas del *Agave attenuata* ha mostrado efectos inhibitorios moderados en bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Rizwon *et al.*, 2012).

*Agave americana*, *Agave ferox*, *Agave montana*, *Agave marginata* y *Agave scabra*, mostraron hasta un 69.31% de inhibición en el crecimiento de hifas del hongo *Postia placenta* (Siddhapura *et al.*, 2011), finalmente extractos etanólicos de las hojas y el escapo del *Agave picta*, expresaron inhibición en bacterias como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* (Verástegui *et al.*, 2008).

## 1.7 Agave salmiana

### 1.7.1 Taxonomía de *Agave salmiana*

La clasificación taxonómica de la especie *salmiana* ha sido objeto de controversias debido a su gran variación fenotípica y genotípica incluso dentro de una misma población, sin embargo Gentry en 1982 logró hacer concurrir en su libro “Agaves of Continental North America” (Los Agaves de Norteamérica Continental) la mayor cantidad de elementos biológicos, correlacionando caracteres anatómicos muy detallados, logrando relacionar aspectos del desarrollo y distribución geográfica del *Agave salmiana*, actualmente considerados como la mejor forma para identificar a esta especie. Según la clasificación taxonómica (**Tabla 1.4**) el *Agave salmiana* pertenece a la división *Magnoliophyta*, a la cual pertenecen las plantas con estructura de cormo (raíz, tallo y hojas); de la clase *Liliopsida*; orden *Liliales*, las cuales poseen características de ser plantas generalmente herbáceas y perennes (Verduzco, 2008).

**Tabla 1.3** Clasificación taxonómica del *Agave salmiana*

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Filo</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Liliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Liliales</i>
<b>Familia</b>	<i>Agavaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Agave</i>
<b>Especie</b>	<i>salmiana</i>

Fuente: UNIBIO, 2010.

### 1.7.2 Morfología de *Agave salmiana*

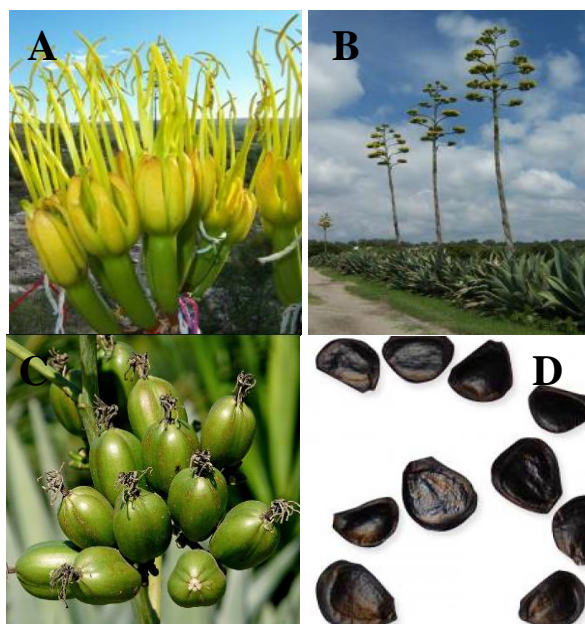
Las plantas de *Agave salmiana* son perennes, robustas, clasificadas como monocotiledóneas,



poseen raíces duras y fibrosas. La superficie de la hoja puede ser muy áspera al tacto, de 1 a 2.2 m de largo por 20 a 35 cm de ancho, ampliamente lanceoladas, color verde claro a verde amarillento y se encuentran dispuestas en rosetas basales de 1.5 a 2.8 m de alto, con espinas laterales y en las puntas (**Figura 1.8**). La espina terminal mide de 4 a 9 cm de largo, acanalada con sección transversal, aplanada y generalmente de color negro con perímetro rojizo (Flores *et al.*, 2010). Al madurar (8 a 10 años), desarrollan una inflorescencia paniculada de hasta 9 m de altura, contorno generalmente piramidal, con capacidad de floración en el tercio o cuarto superior de la estructura (Fernández, 2008).

Las flores poseen un largo de 6 a 9 cm, generalmente de color amarillo intenso, son protándricas, hermafroditas, autocompatibles con poca fertilización, actinomorfas, tienen seis tépalos (a diferencia de los pétalos poseen forma puntiaguda), imbricadas y asimétricas, presentan seis estambres, filamentos insertados en el tubo o en las bases, el tubo del perianto corto, ovario trilobular, pistilo alargado y estigma trilobular. Los frutos del *Agave salmiana* al madurar producen numerosas semillas (hasta 30000) en forma de disco, negras y brillantes cuando son fértiles y blancas cuando son estériles (Flores *et al.*, 2010).

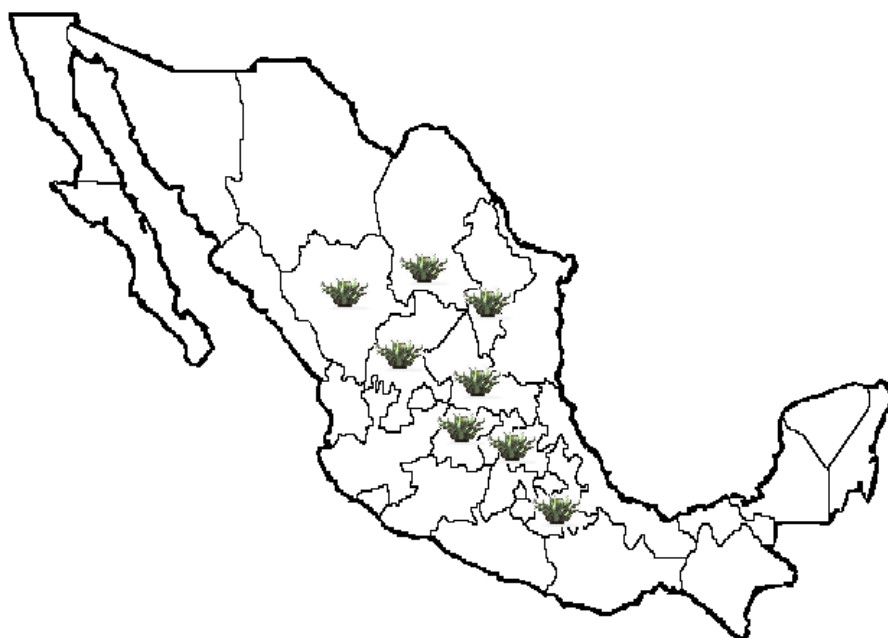
Su propagación asexual a través de hijuelos, suele ser la más común, debido a que la reproducción por semilla requiere más cuidados y alarga el periodo de maduración de la planta (Fernández, 2008).



**Figura 1.8** Componentes de *Agave salmiana* A) Flores, B) Escapo, C) Fruto y D) Semilla (Cortés *et al.*, 2009).

### 1.7.3 Distribución geográfica

El *Agave salmiana* se puede encontrar en el área central de México, crece como planta silvestre en los estados de Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí; como planta cultivada su distribución es más amplia, en Coahuila, Zacatecas y Nuevo León (Reynoso *et al.*, 2012) (**Figura 1.9**). Prospera con éxito entre los 1000 y los 2250 m sobre el nivel del mar, en climas que van de semiseco a seco y con una precipitación pluvial de 320 a 720 mm anuales; del 90 al 95% incide en verano y el resto en invierno (Gentry, 1982). El régimen térmico puede ser templado a semicálido extremo y la temperatura promedio anual puede ser de 16 a 22°C, las temperaturas mínimas hasta -12°C pueden dañar las puntas de las hojas; en primavera y verano tolera temperaturas promedio de 26°C o extremas diarias de hasta 35°C. Pueden crecer en pisos de valles rocosos, laderas de cerro, bajadas o abanicos aluviales, excepto en lugares propensos a inundaciones o con problemas de sales de sodio en el suelo (Vargas, 2009).



**Figura 1.9** Distribución en México de *Agave salmiana* (modificada de CONABIO, 2008)

### 1.7.4 Importancia socioeconómica

Uno de los usos de mayor importancia socioeconómica que tiene el *Agave salmiana*, es la elaboración de mezcal, generando ganancias en Oaxaca, de aproximadamente 1400 millones de pesos, abarcando el 65% del mercado de bebidas alcohólicas (SIAP, 2011); otro uso

importante es la producción de aguamiel, a partir de cuya fermentación se elabora el pulque, que además de emplearse como bebida alcohólica, también es utilizado en la elaboración de pan de pulque principalmente en el estado de Hidalgo. Entre otros usos vigentes se encuentra el empleo de la cutícula de la hoja (penca), en la elaboración de algunos platillos culinarios regionales como el mixiote; así mismo la piña o cabeza es utilizada para la elaboración de dulces, debido a que esta sección de la planta posee cantidades elevadas de azúcares (García *et al.*, 2010).

Por otro lado, en el estado de Oaxaca, el *Agave salmiana* es utilizado como cobertura vegetal para la reducción de la erosión, para la conservación de la humedad, así como barreras vivas a diferentes altitudes. Actualmente, es utilizado como modelo de estudio, para determinar los mecanismos de tolerancia al déficit prolongado de agua, siendo las plántulas de 6 meses de edad, las que toleran la sequía discontinua hasta por más de 100 días (Ruíz *et al.*, 2007).

### **1.7.5 Compuestos de importancia biológica**

Un estudio fitoquímico realizado con la planta de *Agave salmiana*, indica que los principales compuestos activos son las saponinas (triterpenos), los flavonoides, los alcaloides y los taninos, cuya presencia y concentración, depende de la sección de la planta a estudiar, así como de factores externos, como el clima, el lugar de origen, el tipo de sustrato, etc. (Fernández, 2008).

El uso de estos compuestos es muy variado, por ejemplo, en las hojas de *Agave salmiana*, la presencia de taninos catéquicos, ha sido utilizada como antidiarreico y para el tratamiento de intoxicación por metales pesados, principalmente los taninos que poseen mayor unidades de catequinas, lo que brinda una mayor resistencia a la hidrólisis ácida en el aparato digestivo (Castillo *et al.*, 2007). Algunos estudios también sugieren su uso como antioxidante, antitumoral, inhibidor de enzimas (Hipólito, 2007); en las hojas y las flores de la planta, se han identificado varias saponinas, como la hecogenina, manogenina, yuvagenina, agavogenina, sarsapogenina, texogenina, esmilagenina, gotogenina, tigogenina y clorogenina, las cuales se encuentran altamente relacionadas con hormonas esteroideas, esteroides diuréticos y con la vitamina D, por lo que tiene efectos sobre el crecimiento y salud, en seres humanos y cerdos (Ventura *et al.*, 2010).

La presencia de triterpenos en las hojas de *Agave salmiana*, ha sido utilizada como: antileucémico (principalmente los terpenos derivados del lupeol y  $\beta$ -sitosterol); antiinflamatorio (triterpenos oxigenados) debido a la presencia de polisacáridos y glucoproteínas; y en tratamientos contra la disenteria (es un trastorno inflamatorio del intestino, especialmente del colon, que produce diarrea) y malaria (Calange, 2011).

Los flavonoides presentes en la raíz y hojas de *Agave salmiana*, poseen actividad antioxidante, al neutralizar la acción de los radicales libres; antiinflamatoria, debido a sus efectos inhibitorios sobre las enzimas ciclooxigenasas COX-2, que son las responsables de provocar dolor e inflamación (Perricone, 2004); anticancerígena, especialmente el cáncer de mamá y de próstata (particularmente el flavonoide quercetina) y antiviral (Causse, 2010).

### **1.7.6. Compuestos con actividad antimicrobiana**

Actualmente, se ha demostrado que los compuestos responsables de ejercer actividad antimicrobiana localizados en *Agave salmiana*, son principalmente metabolitos secundarios encontrados principalmente en las hojas, flores y raíces, los cuales dependiendo del grupo funcional interactúan con los microorganismos, como es el caso de los **terpenos**, que producen una perturbación de la fracción lipídica de las membranas plasmáticas bacterianas, lo que resulta en alteraciones en la permeabilidad de la membrana provocando fugas de los materiales intracelulares (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009); las **saponinas**, la cuales tienen una cadena de azúcares unida al carbono-3, que forma complejos con los esteroides de las membranas celulares, generando grandes poros en las mismas, provocando cambios en su permeabilidad y lisis celular (Díaz, 2009); los **flavonoides** por su parte, que debido a la presencia de hidroxilos fenólicos en su estructura, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas (Tereschuk, 2007); las **quinonas** que poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función; las **cumarinas**, al ejercer su actividad antimicrobiana mediante la interacción con el ADN, lo que explica también su actividad antiviral; la **flavonas** al formar complejos con las proteínas solubles extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas (Domingo *et al.*, 2003) y los **alcaloides** cuya acción antimicrobiana se podría deber a la presencia de nitrógeno en su

estructura como amina o amida perturbando la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica (Fuertes *et al.*, 1998).

Por otra parte análisis fitoquímicos y antimicrobianos realizados a la planta de *Agave salmiana*, indican que los principales compuestos activos son las saponinas y en menor medida los taninos y flavonoides (Díaz *et al.*, 2009), tanto en hojas como en flores se han identificado varias saponinas, como la hecogenina, manogenina, yuvagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gotogenina, tigogenina y clorogenina, las cuales presentan actividad para desparasitar animales, al generar una interacción con el colesterol localizado en la membrana plasmática del protozoo, provocando la disrupción celular (Wina *et al.*, 2005).

Las saponinas extraídas de hojas de *Agave salmiana*, han sido utilizadas como antivirales, inhibiendo el desarrollo del virus VIH (ganoderiol F, ganodermanotriol y ácido ganodérico B) y actuando contra el virus de la gripe A y virus del herpes labial (ganodermadiol, lucidadiol y ácido aplanoxídico); así como agentes antifúngicos (los triterpenos glicosilados) (Calange, 2011).

Y los taninos aislados de hojas de *Agave salmiana*, han sido utilizados como antibacterianos, en contra de *S. aureus*, y como coadyuvantes en el tratamiento contra el virus de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Hipólito, 2007). Por último, los flavonoides aislados de las hojas y flores de ésta planta también han presentado actividad antimicrobiana (abisinona I y V) frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Castillo *et al.*, 2007).

## **1.8 Microorganismos patógenos de importancia en la industria alimentaria**

La salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad sanitaria de los alimentos que consumen diariamente, por ello una de las principales preocupaciones en la industria alimentaria, es aplicar un control sanitario adecuado, que evite el desarrollo y proliferación de microorganismos indeseables (patógenos), que lejos de generar un producto de mala calidad, repercuten directamente en la salud del consumidor, de manera individual o colectiva (Kopper *et al.*, 2009).

Algunas investigaciones indican que existen más de 250 tipos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), siendo la mayoría ocasionadas por bacterias, entre las que se encuentran, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus* (González *et al.*, 2005).

### 1.8.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, posee forma bacilar (**Figura 1.10**), generalmente móvil, con una temperatura apta de crecimiento de 37°C, Gram negativo, puede desarrollarse en medios carentes o escasos de oxígeno y no esporula, coloniza el intestino del hombre y de los animales homeotermos y se le considera un microorganismo de flora normal, pero existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño, produciendo diferentes cuadros clínicos entre ellos diarrea. Por su especificidad está considerado como un índice de contaminación fecal, vive poco tiempo en ambiente extraentérico, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente (Pascual *et al.*, 2010).

De acuerdo al tipo de enfermedad que producen en el hombre y en los animales, *E. coli* se clasifica en seis grupos enterotoxigénica (ETEC), que provoca diarrea aguda y en pocos casos fiebre y vómito, enterohemorrágica (EHEC) con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, enteroinvasiva (EIEC), provocando diarrea acuosa, con sangre y moco, enteropatógena (EPEC), que afecta principalmente a niños menores de 6 meses, provocando diarrea aguda, fiebre baja y mala absorción; enteroagregativa (EAEC), que se manifiesta en diarrea líquida de color verde con moco sin sangre y que en ocasiones puede llegar a ser severa; y de adherencia difusa (DAEC), provocando síntomas como diarrea acuosa sin sangre (Rodríguez, 2002).

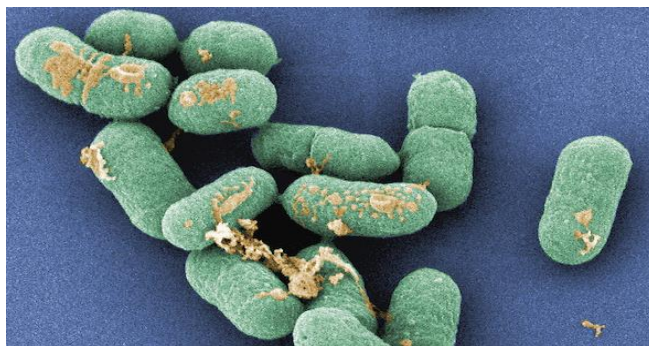


**Figura 1.10** *Escherichia coli* de la cepa O157: H7, tomada con microscopio electrónico de barrido en una ampliación de 8563x, bajo la tinción de Gram (Haney, 2008)

### 1.8.2 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, móvil, no forma esporas y es considerada un microorganismo anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio intervalo de temperaturas (1°C a 45°C) (**Figura 1.11**). Esta bacteria se ha localizado de manera natural en al menos 37 especies de mamíferos, tanto domésticos como salvajes y en por lo menos 17 especies de aves y por su fácil proliferación puede ser aislada del suelo, forraje y otras fuentes ambientales (Carpentier *et al.*, 2011).

La principal vía de contagio es por la ingestión de agua y alimentos contaminados, una vez que se está infectado por *Listeria monocytogenes*, se produce la enfermedad conocida como listeriosis, la cual es usualmente asintomática, sin embargo sus manifestaciones clínicas pueden ser variables según el estado inmune del paciente, puede presentarse como un cuadro gastrointestinal leve y autolimitado en el paciente inmunocompetente, o bien como un cuadro severo y de alta mortalidad, como meningitis y abscesos cerebrales, en el paciente inmunocomprometido (Noriega, 2008).

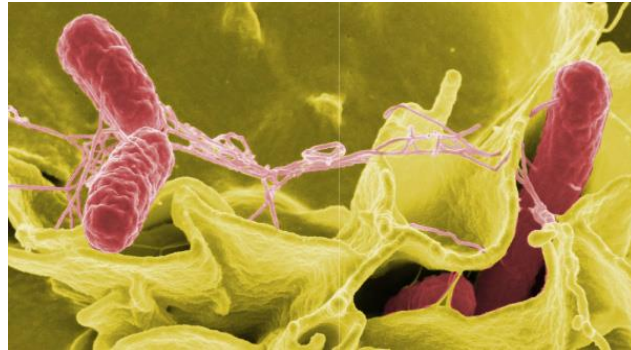


**Figura 1.11.** *Listeria monocytogenes* tomada con microscopio electrónico de barrido, en una ampliación de 10000x (Gary, 2011)

### 1.8.3 *Salmonella typhimurium*

La bacteria *Salmonella typhimurium* (**Figura 1.12**), pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, no encapsulados, flagelados peritricos, con fimbrias y pilis, no producen esporas, son aerobios o anaerobios facultativos, son capaces de crecer en un intervalo de temperatura de 35 a 37°C, ésta bacteria se define como microorganismos ubicuos, que tienen como principal hábitat el intestino de los animales homeotermos y poiquilotermos, sin embargo también se han aislado de los más diversos hábitats, como aguas residuales, heces, suelos, entre otros (Cabello, 2008).

*S. typhimurium*, ha surgido como la causa principal de infecciones humanas de salmonelosis en muchos países; los huevos de gallina son una de las principales fuentes del agente patógeno, ya que coloniza el tejido ovárico de las gallinas y está presente en el contenido de los huevos con cáscara intacta, la salmonelosis se caracteriza por diarrea, fiebre, dolores o calambres abdominales, vómitos, cefalea y náuseas, afectando con mayor frecuencia a lactantes, ancianos y personas inmunodeprimidas (Ruíz *et al.*, 2008).



**Figura 1.12** *Salmonella typhimurium* (rojo), invadiendo cultivos de células humanas tomada con microscopio electrónico de barrido a color (Xie, 2010).

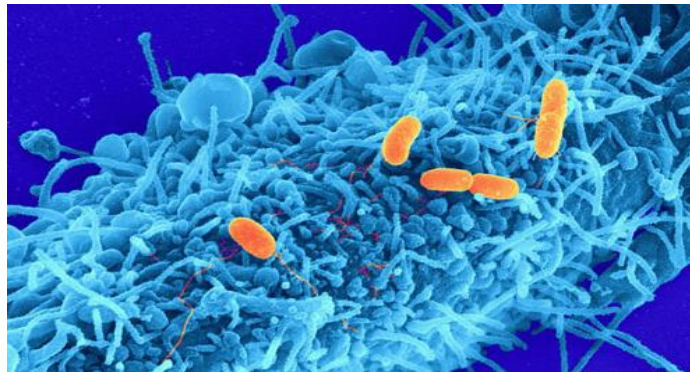
#### 1.8.4 *Shigella sonnei*

*Shigella sonnei* es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra estrechamente relacionada con el género *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas (**Figura 1.13**). Puede desarrollarse en un intervalo de temperatura de 7 a 46°C, siendo el intervalo óptimo para su crecimiento de 25 a 35°C. Se caracteriza por ser inmóvil, anaerobio facultativo, por no formar esporas y por solamente crecer de forma natural en los seres humanos y los monos (Marco *et al.*, 2008)

La infección por *Shigella sonnei* normalmente es a través de la ingestión, generando síntomas como diarrea, fiebre, náusea, vómitos y calambres estomacales. Dependiendo de la edad y el estado de salud del huésped, menos de 100 células bacterianas pueden ser suficientes para causar una infección como la disentería, que resulta en la destrucción de las células epiteliales de la mucosa intestinal en el ciego y el recto (Giugno *et al.*, 2010), o en su caso causar la enfermedad conocida como shigelosis con solo de 10 a 200 microorganismos suficientes para causar la infección. Las infecciones con *Shigella* pueden contraerse por ingerir alimentos y agua contaminados, principalmente por condiciones sanitarias deficientes. Habitualmente se



presenta con síntomas como diarrea, fiebre elevada, aspecto tóxico, dolor abdominal (Martínez, 2011).

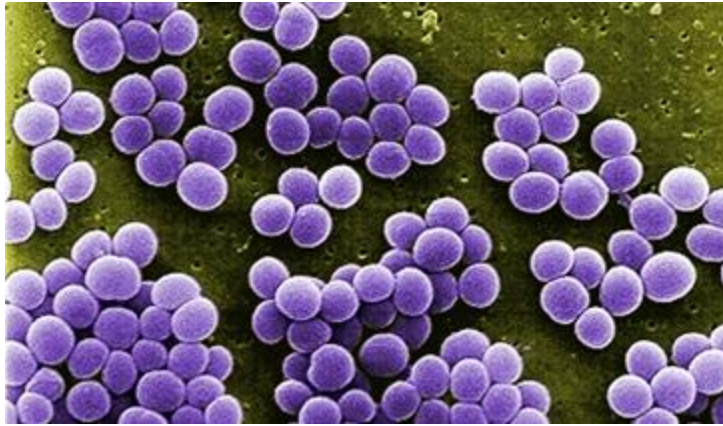


**Figura 1.13** Micrografía electrónica de barrido de *Shigella sonnei* infectando una célula humana (naranja). (Gossmann, 2012)

### 1.8.5 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tetrádas o formando racimos irregulares, son inmóviles, Gram positivas, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, crecen en temperaturas de 35 a 40°C y generalmente no encapsulados (**Figura 1.14**), suele estar en la piel y en las membranas mucosas sin llegar a causar infección, pero cuando penetra en los tejidos (como puede ser en el caso de una herida), puede ocasionar una amplia gama de síntomas debido a las toxinas producidas (Pascual, 2010).

La difusión de esta bacteria es de tipo alimentaria, provocando náuseas, vómito, arcadas (movimiento violento del estómago que se produce antes de vomitar), calambres abdominales, postración; en casos severos puede ocurrir dolor de cabeza, calambres musculares, cambios temporales en la presión arterial y el pulso; y de tipo intrahospitalario, produciendo lesiones cutáneas (granos, impétigo y piel escaldada), así como también osteomielitis, neumonía y endocarditis. En general, la presencia de un número elevado de colonias de *S. aureus*, en un alimento indica una manipulación no aséptica, siendo los alimentos más susceptibles en alojar esta bacteria: los productos de pastelería, las ensaladas con patatas y huevos, pollo, jamón, o lácteos (Kumar *et al.* 2010).



**Figura 1.14** Micrografía electrónica de barrido de *Staphylococcus aureus*, ampliada 10000x, tomada en un medio de cultivo con vancomicina (Arduino, 2009).

## JUSTIFICACIÓN

En algunas regiones de la parte central del territorio Mexicano el cultivo de *Agave salmiana* se ha abandonado, existiendo un alto número de especímenes en etapa de floración, cuya estructura además de ser utilizada como alimento para humanos, en varios municipios del estado de Hidalgo, popularmente se emplea como agente desparasitante de rumiantes, por lo que se considera que el escape de *Agave salmiana*, puede ser una fuente potencial de compuestos antimicrobianos y antioxidantes, los cuales probablemente se sintetizan en mayor concentración durante el desarrollo de esta estructura o bien se generen compuestos distintos a los aislados a partir de las otras estructuras de la planta, que podrían ampliar el espectro de acción contra microorganismos patógenos de interés en la industria alimentaria, por lo que es importante caracterizar el escape floral desde el punto de vista nutracéutico y antimicrobiano.

## **HIPÓTESIS**

El escapo floral de *Agave salmiana*, es una fuente importante de compuestos bioactivos con efecto antioxidante y antimicrobiano contra microorganismos patógenos de importancia en la industria alimentaria, cuya concentración varía de acuerdo a la etapa de desarrollo de la misma.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano de extractos obtenidos de diferentes secciones del escapo floral de *Agave salmiana* utilizando diferentes disolventes y establecer la relación existente entre la concentración y la actividad de los extractos con respecto al estado de desarrollo de dicha estructura.

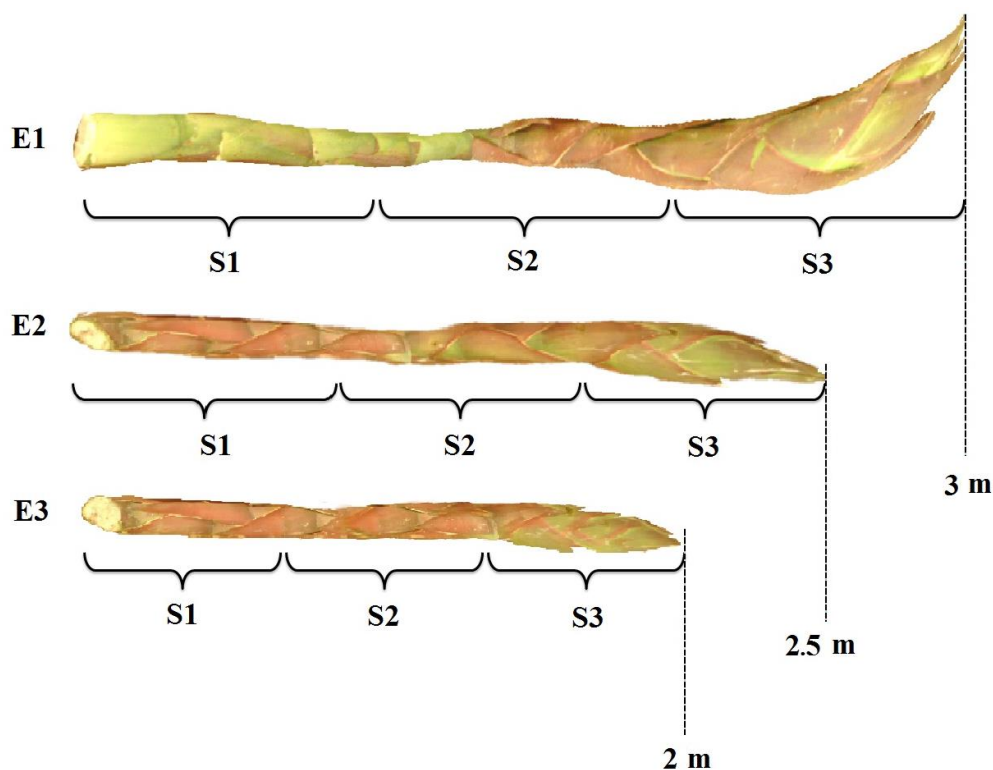
### **Objetivos específicos**

- Estandarizar las condiciones para la obtención de los extractos, utilizando como disolventes metanol, etanol, hexano, acetona y agua.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las 3 secciones de los 3 escapos a analizar.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos obtenidos, utilizando cepas de microorganismos de interés para la industria alimentaria.
- Determinar la relación de la sección del escapo floral sobre la concentración y la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos.

## CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Material vegetal

Los escapos florales fueron recolectados de plantaciones ubicadas en el municipio de Singuilucan, Hidalgo, México (altitud 2640 m; 19°59'20" N, 98°27'52" O), considerando como parámetro de referencia su altura (2, 2.5 y 3 m), se lavaron y seccionaron en tres partes, denominadas como sección 1, la cual es la parte que se encuentra más cercana a la roseta, sección 2, que representa la parte intermedia del escapo y sección 3, que es la parte en la cual se desarrollarán las flores (**Figura 2.1**). Cada sección se cortó en cubos de aproximadamente 1 cm de lado, y se almacenó en lotes de 1 kg en bolsas de PVC, a 4°C, hasta su análisis (González-Cruz *et al.* 2011).



**Figura 2.1** Tres diferentes etapas de desarrollo del escapo y sus secciones

### 2.2 Análisis químico proximal

La composición química proximal de las muestras se determinó de acuerdo con la metodología establecida en el AOAC de 1995 (**Tabla 2.1**):

**Tabla 2.1** Metodologías para la realización del análisis químico proximal

<b>Análisis</b>	<b>Número de método</b>
<b>Proteína</b>	955.04 (Kjeldahl N X 6.25)
<b>Fibra cruda</b>	962.09 (Método de Kennedy modificado)
<b>Humedad</b>	934.01 (Secado en estufa)
<b>Extracto etéreo</b>	920.39 (Soxhlet)
<b>Cenizas</b>	923.03 (Calcinación)

### **2.3 Obtención de extractos**

Se tomaron 100 g de cada una de las tres secciones del escapo, correspondientes a cada una de las etapas de desarrollo mencionadas (2, 2.5 y 3 m) y se sometieron a una maceración en fresco, colocando la muestra vegetal en un mortero junto con 200 mL del disolvente seleccionado (agua, acetona, etanol, hexano y metanol), hasta homogeneizar para luego trasvasar la mezcla a un matraz Erlen Meyer y agitar de manera continua por 24 h. Los extractos resultantes se filtraron utilizando un embudo Kitasato y un papel filtro N°4 y se concentraron a sequedad en un rotavapor (BÜCHI, modelo R-124), almacenándolos a 4°C hasta su análisis (Padilla *et al.*, 2012).

El extracto crudo se obtuvo, utilizando el jugo resultante de 100 g de material fresco triturado con ayuda de una licuadora manual, el cual se filtró con un papel filtro N°4 y se almacenó a 4°C hasta su análisis (Srinivasan *et al.*, 1953, González-Cruz *et al.*, 2011).

### **2.4 Determinación de la actividad antioxidante**

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó la técnica de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) descrita por Brand-Williams, 1995, que consiste en preparar una curva de calibración con una disolución de DPPH 0.1 mM en metanol, para ello se realizaron cinco disoluciones en concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mM, contando con un blanco, el cual sólo contenía 10 mL del disolvente, para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras se utilizaron 2 mL de la disolución de DPPH 0.1 mM y 0.05 mL del extracto leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 514 nm, cada 10 minutos hasta completar 60 minutos.

## 2.5 Determinación de contenido de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu adaptada para alimentos por Singleton y colaboradores en 1999. Esta técnica consiste en realizar una curva de calibración preparando 5 disoluciones a partir de una disolución madre de ácido gálico (GAE) al 0.5%, tomando 0, 5, 10, 15, 25 y 50  $\mu\text{L}$  de la misma, aforando cada uno de ellos a 50 mL con agua destilada, considerando que cada disolución posee concentraciones de fenol de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 y 5 mg/L de ácido gálico, de manera correspondiente.

De cada disolución se toman 1.58 mL (1580  $\mu\text{L}$ ) y se colocan en una celda para espectro, además de 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu. Una vez realizada la mezcla, ésta se deja reposar por 8 minutos y se agregan 300  $\mu\text{L}$  de disolución de carbonato de sodio (20%), se agita hasta su completa homogeneización y se deja reposar por 2 horas a 20°C (o por 30 minutos a 40°C, o bien por 15 min a 50°C), pasado este tiempo se lee la absorbancia a 765 nm, usando como blanco la disolución con 0% de fenol, los resultados se reportan en mg de GAE/g de extracto.

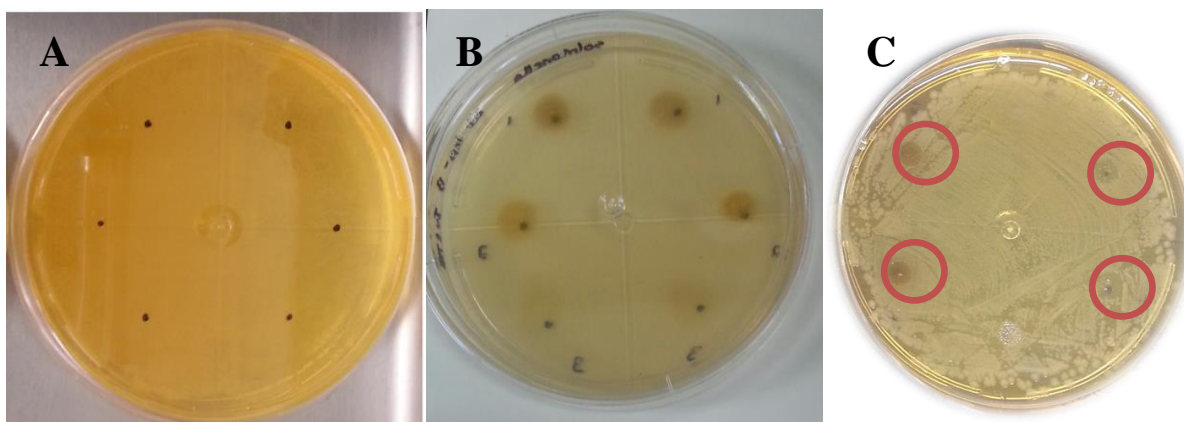
## 2.6 Determinación de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se realizó utilizando el método de difusión en placa, según la técnica de Kirby-Bauer modificado (Gracia *et al.*, 1995; Meurer *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999), se cultivaron cada uno de los microorganismos de manera individual en tubos con agar inclinado utilizando agar de métodos estándar a una temperatura de incubación de 35°C por 18 horas, después se ajustó el inóculo de cada microorganismo realizando dos diluciones consecutivas 1:10, en peptona de caseína, esta última dilución (1:100) que representa de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL se utilizó para sembrar bajo la técnica de extensión, placas con agar de métodos estándar suplementado previamente con el fármaco rifampicina (1 mL/ 100 mL), esto con la finalidad de inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables permitiendo solo el desarrollo de los microorganismos de estudio que se sabe son resistentes a este medicamento (Lizárraga, 1991).

Inmediatamente después se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos previamente preparados (1:5), sobre el agar, en cada una de las marcas situadas anticipadamente en la parte exterior de las cajas Petri (**Figura 2.2**) y se dejó incubar por 18 h a 35°C. Después de este



tiempo, se prosiguió a observar la generación de halos de inhibición y se registró presencia o ausencia de los mismos (Cavalieri, 2005).



**Figura 2.2** Secuencia para determinar la inhibición microbiana de los extractos, A) distribución de los sitios de aplicación de los extractos, B) superficie de acción de los extractos colocados en el agar, C) halos de inhibición producidas por extractos contra *E. coli* (círculos rojos).

Las bacterias utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Escherichia coli* O157:H7 (E09 de la Universidad Autónoma de Querétaro), *Shigella sonnei* ATCC 25931, y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Estas cepas se mantuvieron en refrigeración a 4°C en medios sólidos, utilizando agar (Verástegui *et al.*, 2008).

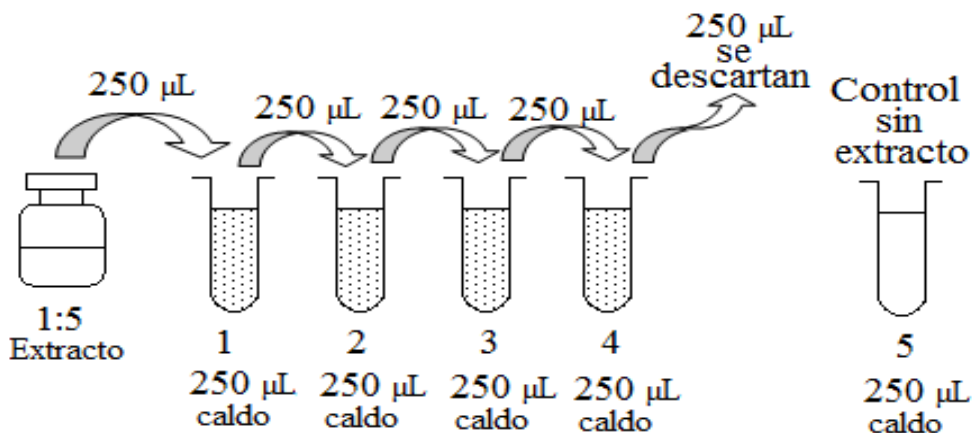
### 2.6.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano se define como la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Esta determinación se realizó de acuerdo con la metodología de micro dilución en caldo (Taroco, 2006), empleada en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

Con un asa estéril se tomó una muestra representativa de colonias de un tubo con agar de métodos estándar colocado inclinado, y se transfirió a otro tubo al que inicialmente se le colocaron 5 mL de caldo soya tripticaseína, para luego dejar incubar a 35°C por 18 h. Una vez realizada esta operación el inóculo se diluyó hasta llegar a 1:200 en caldo, que corresponde a un inóculo bacteriano de  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL (Taroco, 2006).

Inicialmente se realizó una exploración general, donde los extractos se diluyeron consecutivamente 4 veces, de acuerdo a los resultados preliminares obtenidos, se consideraron 3 diluciones más, esto de manera intermedia entre los resultados que dieron positivo, de esta forma las diluciones quedaron de la siguiente manera: 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:120, 1:160 y 1:320. Para ello se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de caldo en 5 tubos diferentes, se prepararon 500  $\mu\text{L}$  de extracto 1:5, de éste último se tomó la mitad (250  $\mu\text{L}$ ) y se colocó en el 1er tubo con caldo, después se tomaron 250  $\mu\text{L}$  del 1er tubo para colocarlo en el segundo tubo, del 2do tubo se tomaron 250  $\mu\text{L}$  para transferirlo a un tercer tubo, el procedimiento se repitió hasta llegar al cuarto tubo, del cual se tomaron 250  $\mu\text{L}$  y se descartaron para mantener las diluciones (Taroco, 2006) tal como se muestra en la **figura 2.3**.

El quinto tubo se consideró como control de crecimiento del microorganismo por lo que permaneció solo con caldo (250  $\mu\text{L}$ ). Una vez preparado el inóculo, se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  del mismo en cada uno de los 5 tubos con caldo y extracto, se dejaron incubar a 35°C por 18 h (Taroco, 2006). Los resultados se reportaron como valores “+” o como “-” de acuerdo a la presencia o ausencia de turbidez respectivamente.



**Figura 2.3** Procedimiento de diluciones de muestras en la técnica de CMI

## 2.7 Análisis estadístico

Con la finalidad de generar datos representativos, todos los estudios se realizaron por triplicado y fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS V.9, considerando la prueba de Tukey para la comparación entre medias y un nivel de significancia de 0.05. En los resultados de análisis proximal, se realizó un ANOVA de un solo factor y comparación entre

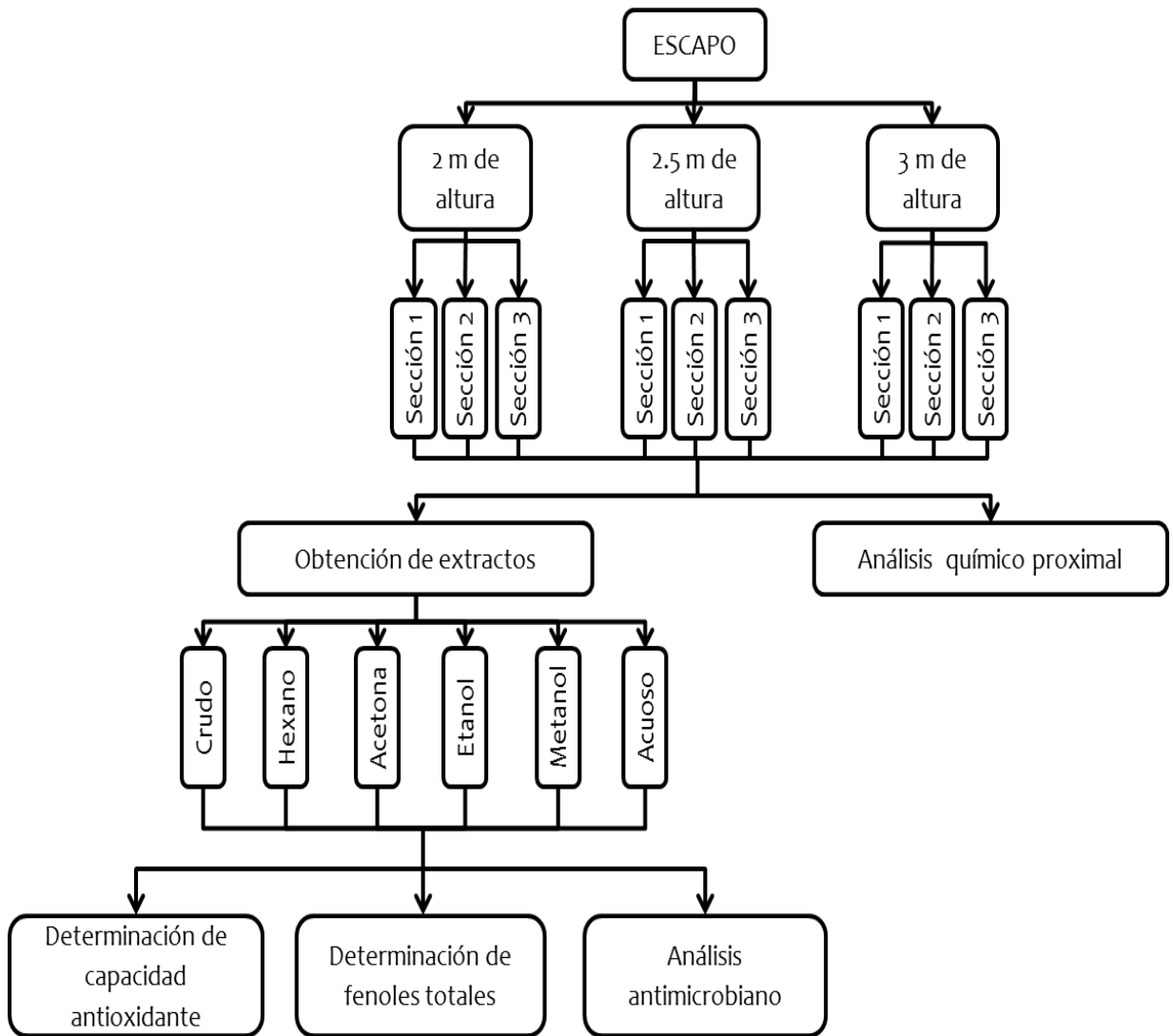
medias (Tukey) para cada componente de manera individual así como también se realizó un diseño estadístico de tipo anidado con jerarquización, para observar las diferencias significativas de 3 factores en el caso de análisis de escapo, sección y actividad antioxidante o contenido de fenoles totales y de 4 factores considerando escapos, secciones, actividad antimicrobiana y microorganismos.

Así también se realizó un análisis de correlación para comparar los datos de actividad antioxidante con relación al contenido de fenoles totales y a la actividad antimicrobiana, utilizando la técnica de Pearson con un nivel de significancia de 0.05. En el criterio para definir la correlación entre variables se consideró el valor de coeficiente de correlación mayor que 0.75 o menor que -0.75, de lo contrario, es inexistente la correlación entre variables.

## **2.8 Diagrama del proceso**

El presente proyecto se realizó en 3 etapas, las cuales se muestran en la **figura 2.4**, la primera etapa contemplo el acondicionamiento de la materia prima, la cual consistió en la selección de los escapos con base en su altura (2 m, 2.5 m y 3 m), cada una de las muestras fue seccionada en tres partes, a partir de ellas se obtuvieron cubos de aproximadamente 1 cm de lado, los cuales fueron almacenados en refrigeración (4°C) en lotes de 1 kg hasta su análisis, a cada uno de los escapos se le realizó el análisis químico proximal.

En la segunda etapa se realizó la extracción utilizando diferentes disolventes obteniendo 54 extractos los cuales en la tercera etapa fueron evaluados para determinar su actividad antimicrobiana, actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos.



**Figura 2.4** Esquema general del proceso del proyecto

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Composición químico proximal

La composición química proximal de los escapos mostró que son estadísticamente distintos entre cada uno de ellos siendo  $E_1$  el que mostró la mayor concentración de carbohidratos (solubles e insolubles), lo cual fue resultado de la alta cantidad de fibra presente que le permite soportar la mayor longitud, por lo que los requerimientos de este componente se incrementan para utilizarlo como soporte, por otra parte la lignificación celular de esta estructura aumenta la concentración de este compuesto, mientras que los carbohidratos solubles son utilizados como fuente de carbono para la generación de las estructuras florales, semillas y frutos que en poco tiempo se desarrollaran (Verduzco *et al.*, 2008).

Por su parte,  $E_2$  muestra valores intermedios a los obtenidos para  $E_1$  y  $E_3$ , destacando su alto contenido de cenizas, el cual es superior al de los otros escapos, esto podría ser atribuido a que en esta etapa el escapo se encuentra susceptible al ataque de los depredadores ya que sólo parte de él se encuentra cubierto por las hojas, por lo que podría desarrollar un sistema de defensa basado en la generación de cristales de oxalato (Teniente-Martínez *et al.*, 2010).

Finalmente, el  $E_3$  mostró el mayor contenido de humedad, proteína y extracto etéreo, lo cual podría ser debido a que en esta etapa se inicia el desarrollo de la estructura, por lo que requiere mayor contenido de éstos componentes para favorecer la generación y elongación de tejidos (Verduzco *et al.*, 2008).

En las tres secciones de los tres escapos se observó que el contenido de humedad, proteína, extracto etéreo y cenizas (**Tabla 3.1**), incrementa conforme la sección se aleja de la piña, por lo que el mayor porcentaje se encuentran en la última sección ( $S_3$ ), lo que sugiere que estos compuestos se desplazan de forma vertical ascendente en el escapo, aparentemente porque en esta sección es la parte donde se requiere la mayor cantidad de nutrientes para la generación de flores y frutos de la planta (Verduzco *et al.*, 2008).

Mientras que, el contenido de fibra y carbohidratos mostró un comportamiento contrario, ya que el mayor porcentaje se encuentra en la sección más cercana a la piña ( $S_1$ ) (**Tabla 3.1**), lo cual podría ser atribuido, a que esta especie requiere una base sólida que soporte el peso del

escapo que puede alcanzar alturas de hasta 9 m, por lo cual es necesaria la alta concentración de fibra (Reveles *et al.*, 2012), aunado al hecho de que en *Agave salmiana* se ha reportado una concentración elevada de carbohidratos ( $10.81\% \pm 1.72$ , Vargas, 2009), los cuales se concentran en la base de las hojas que conforman la roseta y son utilizados para la generación del aguamiel y su posterior fermentación para la producción de pulque, por lo que en la base (estructura más cercana a la piña) queda acumulada la mayor concentración de estos componentes (Flores *et al.*, 2010), siendo la etapa temprana de desarrollo del escapo, donde se observó homogeneidad en la concentración de carbohidratos a lo largo de la estructura, mientras que en las etapas subsecuentes se observa claramente la translocación de los carbohidratos de manera ascendente.

**Tabla 3.1** Composición química proximal de los escapos florales de *Agave salmiana* (g/100g de muestra fresca) (promedio de tres repeticiones  $\pm$  D.E)

Muestra	Proteína	Fibra	Humedad	Extracto etéreo	Cenizas	Carbohidratos	
<b>E<sub>1</sub></b>	S <sub>1</sub>	0.41 <sup>a</sup> $\pm$ 0.02	25.73 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09	59.42 <sup>a</sup> $\pm$ 0.24	3.43 <sup>a</sup> $\pm$ 0.08	1.65 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06	9.36
	S <sub>2</sub>	1.06 <sup>b</sup> $\pm$ 0.06	19.87 <sup>b</sup> $\pm$ 0.09	62.76 <sup>b</sup> $\pm$ 0.16	4.69 <sup>b</sup> $\pm$ 0.04	3.41 <sup>b</sup> $\pm$ 0.03	8.21
	S <sub>3</sub>	2.08 <sup>c</sup> $\pm$ 0.03	13.60 <sup>c</sup> $\pm$ 0.16	67.16 <sup>c</sup> $\pm$ 0.09	5.45 <sup>c</sup> $\pm$ 0.08	5.24 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	6.47
<b>E<sub>2</sub></b>	S <sub>1</sub>	0.69 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17	22.47 <sup>d</sup> $\pm$ 0.09	63.53 <sup>d</sup> $\pm$ 0.11	4.51 <sup>b</sup> $\pm$ 0.10	2.89 <sup>d</sup> $\pm$ 0.03	5.91
	S <sub>2</sub>	1.32 <sup>c</sup> $\pm$ 0.04	16.27 <sup>e</sup> $\pm$ 0.09	68.28 <sup>e</sup> $\pm$ 0.08	5.28 <sup>c</sup> $\pm$ 0.04	4.43 <sup>e</sup> $\pm$ 0.02	4.42
	S <sub>3</sub>	2.44 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	11.87 <sup>f</sup> $\pm$ 0.09	71.32 <sup>f</sup> $\pm$ 0.09	6.12 <sup>d</sup> $\pm$ 0.05	5.66 <sup>c</sup> $\pm$ 0.24	2.59
<b>E<sub>3</sub></b>	S <sub>1</sub>	0.74 <sup>b</sup> $\pm$ 0.09	16.60 <sup>e</sup> $\pm$ 0.10	72.51 <sup>g</sup> $\pm$ 0.10	5.37 <sup>c</sup> $\pm$ 0.07	1.34 <sup>a</sup> $\pm$ 0.07	3.44
	S <sub>2</sub>	2.58 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	12.56 <sup>f</sup> $\pm$ 0.12	73.66 <sup>h</sup> $\pm$ 0.32	5.90 <sup>d</sup> $\pm$ 0.29	2.18 <sup>f</sup> $\pm$ 0.03	3.12
	S <sub>3</sub>	3.17 <sup>d</sup> $\pm$ 0.44	7.79 <sup>g</sup> $\pm$ 0.09	75.84 <sup>i</sup> $\pm$ 0.21	6.83 <sup>e</sup> $\pm$ 0.04	3.34 <sup>b</sup> $\pm$ 0.26	3.03

Prueba Tukey. Filas con la misma letra no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$ .

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia.

E<sub>1</sub>=escapo de 3m, E<sub>2</sub>= escapo de 2.5 m, E<sub>3</sub>= escapo de 2 m, S<sub>1</sub>=sección del escapo más cerca de la piña, S<sub>2</sub>= sección del escapo intermedia y S<sub>3</sub>= sección del escapo más alejada de la piña

Considerando la composición media de los escapos de *Agave salmiana* (Tabla 3.2) E<sub>3</sub> mostró un contenido de proteína, humedad y extracto etéreo similar al reportado para el escapo de *Agave lechuguilla* (Santos *et al.*, 2009), lo cual podría indicar que ambas estructuras se encuentran en la misma etapa de desarrollo, donde los nutrimentos sintetizados van dirigidos a la producción de tejidos y crecimiento del escapo (referencia), sin embargo la cantidad de fibra es significativamente mayor en los escapos de *Agave salmiana* (12 a 19%) con respecto al *Agave lechuguilla* (5%), lo cual podría ser debido a la diferencia morfológica de ambas estructuras, donde la mayor longitud y diámetro implica mayores requerimientos de compuestos fibrosos para su soporte (Reveles *et al.*, 2012).

**Tabla 3.2** Comparación de la composición porcentual de escapo de *Agave salmiana* y *Agave lechuguilla* (promedio de nueve repeticiones  $\pm$  D.E)

Contenido	<i>Agave salmiana</i>			<i>Agave lechuguilla</i> <sup>1</sup>
	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	ESCAPO
Proteína	1.18 <sup>a</sup> $\pm$ 0.68	1.48 <sup>a</sup> $\pm$ 0.72	2.16 <sup>a</sup> $\pm$ 1.03	2.20
Fibra	19.73 <sup>a</sup> $\pm$ 4.95	16.87 <sup>a</sup> $\pm$ 4.34	12.32 <sup>a</sup> $\pm$ 3.60	5.30
Humedad	63.11 <sup>a</sup> $\pm$ 3.16	67.71 <sup>a,b</sup> $\pm$ 3.20	74.00 <sup>b</sup> $\pm$ 1.38	72.00
Extracto etéreo	4.52 <sup>a</sup> $\pm$ 0.83	5.30 <sup>a</sup> $\pm$ 0.65	6.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.60	6.40
Cenizas	3.43 <sup>a</sup> $\pm$ 1.46	4.33 <sup>a</sup> $\pm$ 1.13	2.29 <sup>a</sup> $\pm$ 0.81	3.70
Carbohidratos	8.01 <sup>a</sup> $\pm$ 1.18	4.31 <sup>b</sup> $\pm$ 1.35	3.20 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17	10.40

1.-Santos, *et al.* 2006.

Prueba de Tukey. Columnas con la misma letra no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$ .

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia.

Por otra parte, el contenido de carbohidratos en los escapos de *Agave salmiana* se encuentran ligeramente debajo del valor reportado para el escapo de *Agave lechuguilla*, lo cual podría ser atribuido a que *A. salmiana* es un agave pulquero por lo que la mayor concentración de carbohidratos se encuentra ubicada en la piña o cabeza y no en otras estructuras como lo es el escapo y las hojas (González-Cruz, 2011).

De manera general, las diferencias encontradas entre los escapos de ambos agaves podrían atribuirse a diversos factores, entre los cuales se encuentran: especie, ubicación geográfica de la planta, estado de desarrollo del escapo, condiciones de cultivo, sección del escapo analizada, etc. Mientras que las semejanzas en la composición de agua podrían deberse principalmente a que a pesar de ser especies diferentes, ambos pertenecen al mismo género, el cual se caracteriza por su metabolismo CAM y su alta capacidad de almacenamiento de agua (Jiménez, 2011).

### 3.2 Obtención de extractos

Los disolventes empleados generaron diferencias en los rendimientos obtenidos en cada una de las muestras, se observó un incremento en el rendimiento con la utilización de cada uno de ellos. El extracto con hexano generó el menor rendimiento, en el intervalo de 1.0 a 2.6 veces con relación al extracto crudo, dependiendo de la sección estudiada y el mayor rendimiento se obtuvo en el extracto acuoso con un aumento de 1.2 a 5.2 veces con relación al extracto crudo (**Tabla 3.3**).

El uso de los disolventes para la extracción en E<sub>3</sub> generaron los menores rendimientos con relación al extracto crudo (1.1 a 2 veces), lo cual puede deberse a que el tejido vegetal de esta estructura se encuentra menos desarrollado facilitando el proceso de extracción, independientemente del disolvente empleado.

Al contrario, los extractos de E<sub>1</sub>, generaron los rendimientos más elevados (1.4 a 5.2 veces con relación al extracto crudo), lo cual podría deberse a que en esta etapa las paredes celulares del escapo tienden a lignificarse (Novo, 2008), por lo que un simple proceso de presión no es suficiente para realizar una extracción adecuada, sin embargo al adicionar cada uno de los disolventes existe mayor solubilización de los compuestos, incrementando su extracción.

**Tabla 3.3** Incremento en el rendimiento de extracción de compuestos del escapo floral de *Agave salmiana*

Extracto	E <sub>1</sub>			E <sub>2</sub>			E <sub>3</sub>		
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
<b>CRUDO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>HEXANO</b>	1.6	2.6	1.4	1.4	1.6	1.0	2.0	1.9	1.6
<b>ACETONA</b>	2.8	2.7	1.6	2.1	2.6	1.3	1.1	1.4	1.1
<b>ETANOL</b>	3.6	3.6	2.5	3.4	3.7	1.9	1.7	1.8	1.5
<b>METANOL</b>	3.6	3.9	2.1	3.9	3.7	1.8	1.8	1.8	1.6
<b>AGUA</b>	5.2	4.5	2.5	4.7	4.4	1.8	1.4	1.4	1.2

*Nota:* los valores están reportados con respecto al extracto crudo

Por otra parte, los resultados muestran que la polaridad de cada uno de los disolventes presentó distinta capacidad de extracción (**Tabla 3.4**), observándose un aumento en la extractibilidad con relación a la polaridad del extracto, resultando un mayor valor para la extracción acuosa (3.1 a 5.9 g/100g de muestra fresca), lo cual podría ser indicio de que el escapo presenta mayor concentración de compuestos polares que son fácilmente extraídos durante el proceso (Raaman, 2006), mientras que los menores valores de capacidad de extracción fueron obtenidos para los extractos crudos (0.6 a 3.6 g/100g de muestra fresca), debido a que en este caso no se utilizó disolvente alguno que pudiera facilitar la separación de los compuestos, ya que el extracto fue el resultado de la presión mecánica de la estructura. Es importante mencionar que aun cuando la acetona y el etanol tienen índices de polaridad (5.4 y 5.2 respectivamente, Johll, 2008) y miscibilidad (100% en ambos, Johll, 2008) similares, el medio fue determinante para la extracción de compuestos, por lo que se observa diferencia entre los resultados obtenidos con estos disolventes, lo cual pudo deberse a que el primer



disolvente pudo provocar reacciones de esterificación, cuyos compuestos generados podrían ser ésteres de alta volatilidad, evaporándose al eliminar los residuos, disminuyendo el rendimientos (Labrada *et al.*, 1996).

Los capacidad de extracción obtenidos en los escapos fueron mayores en E<sub>3</sub>, la estructura de menor tamaño (2 m) y menores en E<sub>1</sub> (3 m), indicando que el tiempo de desarrollo del escapo está relacionada directamente con la concentración de compuestos presentes en ella, de tal manera que al incrementar el tiempo de desarrollo, la concentración de estos compuestos disminuye considerablemente, debido probablemente a que inicia la etapa de floración y generación de frutos, lo que provoca que la planta tenga requerimientos nutricionales enfocados al desarrollo de éstas estructuras más que para su defensa (Verduzco, *et al.*, 2008).

De manera general, la sección 3 de los escapos (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>), presentó el mayor capacidad de extracción para los 5 extractos, obteniendo valores entre 1.5 y 5.9 g/100 g de muestra fresca, lo cual podría ser atribuido a que esta sección es la que más tarde dará lugar a las flores y frutos de la planta, por lo que es ahí donde aparentemente se encuentran concentrados la mayoría de los compuestos tanto nutritivos como aquellos que forman parte del sistema de defensa de la planta contra depredadores y estrés ambiental como las saponinas, oxalato de calcio, compuestos fenólicos y fitoalexinas (Díaz, 2009), mientras que la sección 1 fue la que generó menores valores de extractibilidad (0.6 a 5.2 g/100 g de muestra fresca), debido probablemente a que es la sección que se encuentra más cerca a la piña la cual está rodeada por hojas que forman la roseta protegiendo al escapo de forma natural, por lo que no requiere concentraciones elevadas de compuestos de defensa.

**Tabla 3.4** Capacidad de extracción de los disolventes sobre compuestos de los escapos florales de *Agave salmiana* (g/100g de muestra fresca)

Extracto	E <sub>1</sub>			E <sub>2</sub>			E <sub>3</sub>		
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
<b>CRUDO</b>	0.625	0.735	1.562	0.659	0.760	1.976	2.625	2.735	3.562
<b>HEXANO</b>	0.978	1.920	2.251	0.931	1.235	1.922	2.978	3.920	4.151
<b>ACETONA</b>	2.219	2.898	3.271	2.583	2.835	3.529	4.785	4.876	5.678
<b>ETANOL</b>	1.742	1.969	2.500	1.407	1.976	2.627	3.742	3.954	4.234
<b>METANOL</b>	2.263	2.670	3.933	2.257	2.827	3.735	4.577	4.879	5.587
<b>AGUA</b>	3.232	3.306	3.935	3.115	3.332	3.496	5.232	5.306	5.935

### 3.3 Determinación de actividad antioxidante

Los resultados obtenidos mostraron que los disolventes con mayor polaridad (etanol y agua) permitieron extraer una mayor concentración de compuestos con actividad antioxidante, incrementando el efecto con respecto al extracto crudo en un intervalo de 3.05% a 14.51% para el primer disolvente y de 3.89% a 9.47% en el segundo caso (**Tabla 3.5**), lo cual podría ser debido a que los disolventes polares tienden a incrementar la extractibilidad de compuestos con actividad antioxidante, principalmente fenoles, antocianinas y taninos, los cuales son solubles en estos disolventes (Benavides-Mendoza *et al.*, 2008), la menor actividad fue encontrada en los extractos obtenidos con hexano, lo cual podría ser debido a la baja polaridad de este disolvente. Por otra parte, el extracto etanólico en E<sub>1</sub> fue el que mostró mayor incremento de la actividad antioxidante con respecto al extracto crudo (14.51%), mientras que E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> mostraron los menores incrementos (3.05% y 4.62%, respetivamente), lo cual puede ser atribuido a que la actividad antioxidante del extracto crudo de ambos escapos fue mayor (57.51% ± 15.41, 58.35% ± 15.32, respectivamente), con respecto al extracto crudo de E<sub>1</sub> (47.75% ± 18.42).

**Tabla 3.5** Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de escapos florales de *Agave salmiana* (%) (promedio de tres repeticiones ± D.E)

Muestra	EXTRACTO						
	CRUDO	HEXANO	ACETONA	ETANOL	METANOL	AGUA	
E <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	67.72 <sup>a,A</sup> ± 0.24	22.56 <sup>a,B</sup> ± 0.16	24.37 <sup>a,C</sup> ± 0.27	65.86 <sup>a,D</sup> ± 0.14	44.58 <sup>a,E</sup> ± 0.59	63.47 <sup>a,F</sup> ± 0.15
	S <sub>2</sub>	52.26 <sup>b,A</sup> ± 0.39	35.22 <sup>b,B</sup> ± 0.17	46.16 <sup>b,C</sup> ± 0.41	70.21 <sup>b,D</sup> ± 0.16	58.27 <sup>b,E</sup> ± 0.66	75.43 <sup>b,F</sup> ± 0.10
	S <sub>3</sub>	23.27 <sup>c,A</sup> ± 0.92	10.22 <sup>c,B</sup> ± 0.18	15.05 <sup>c,B</sup> ± 0.66	50.71 <sup>c,C</sup> ± 1.63	23.92 <sup>c,D</sup> ± 0.57	32.77 <sup>c,E</sup> ± 0.59
E <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	74.71 <sup>d,A</sup> ± 0.20	25.33 <sup>d,B</sup> ± 0.16	30.09 <sup>d,C</sup> ± 0.39	67.60 <sup>a,A</sup> ± 0.32	55.49 <sup>d,D</sup> ± 0.51	68.41 <sup>a,d,E</sup> ± 0.21
	S <sub>2</sub>	60.50 <sup>e,A</sup> ± 0.15	48.69 <sup>e,B</sup> ± 0.17	49.11 <sup>e,B</sup> ± 0.08	73.19 <sup>d,C</sup> ± 0.07	63.06 <sup>e,D</sup> ± 0.29	77.73 <sup>b,E</sup> ± 0.36
	S <sub>3</sub>	37.31 <sup>f,A</sup> ± 0.87	15.31 <sup>f,B</sup> ± 0.17	23.42 <sup>a,C</sup> ± 0.18	40.90 <sup>e,D</sup> ± 0.47	31.36 <sup>f,E</sup> ± 0.80	38.06 <sup>c,e,A</sup> ± 0.18
E <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	75.13 <sup>d,A</sup> ± 0.43	27.51 <sup>g,B</sup> ± 0.40	31.53 <sup>f,C</sup> ± 0.15	69.84 <sup>b,D</sup> ± 0.40	57.18 <sup>b,d,E</sup> ± 0.63	69.73 <sup>d,D</sup> ± 0.69
	S <sub>2</sub>	61.83 <sup>e,A</sup> ± 0.35	49.27 <sup>e,B</sup> ± 0.26	50.97 <sup>g,C</sup> ± 0.36	74.78 <sup>d,D</sup> ± 0.26	66.10 <sup>g,E</sup> ± 0.43	78.55 <sup>b,F</sup> ± 0.56
	S <sub>3</sub>	38.09 <sup>f,A</sup> ± 0.69	16.96 <sup>h,B</sup> ± 0.39	29.63 <sup>d,C</sup> ± 0.23	44.30 <sup>f,D</sup> ± 0.52	32.80 <sup>f,E</sup> ± 0.48	40.74 <sup>e,F</sup> ± 0.79

Filas con la misma letra minúscula y columnas con la misma letra mayúscula, no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$ .

1.- Se consideró como control la vitamina E.

E<sub>1</sub>=escapo de 3m, E<sub>2</sub>= escapo de 2.5 m, E<sub>3</sub>= escapo de 2 m, S<sub>1</sub>=sección del escapo más cerca de la piña, S<sub>2</sub>= sección del escapo intermedia y S<sub>3</sub>= sección del escapo más alejada de la piña

El escapo de menor longitud (E<sub>3</sub>) fue el que mostró la mayor actividad antioxidante, seguido por E<sub>2</sub> (**Tabla 3.6**), lo que podría ser un indicio de que al irse desarrollando el escapo floral, la actividad antioxidante va disminuyendo, lo cual podría ser debido a que compuestos

antioxidantes como es el caso de los fenoles, son producidos por la planta en las etapas tempranas de desarrollo como mecanismo de protección ante el ataque de depredadores naturales, para soporte mecánico o para disminuir el crecimiento de plantas cercanas que compiten por nutrientes (Taiz *et al.*, 2010).

**Tabla 3.6** Determinación de la actividad antioxidante promedio de escapos florales de *Agave salmiana* (%) (promedio de nueve repeticiones  $\pm$  D.E)

Extracto	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
<b>CRUDO</b>	47.75 <sup>a,A</sup> $\pm$ 18.42	57.51 <sup>a,A</sup> $\pm$ 15.41	58.35 <sup>a,A</sup> $\pm$ 15.32
<b>HEXANO</b>	22.67 <sup>a,A</sup> $\pm$ 10.21	29.78 <sup>a,A</sup> $\pm$ 13.99	31.25 <sup>a,A</sup> $\pm$ 13.45
<b>ACETONA</b>	28.53 <sup>a,A</sup> $\pm$ 13.04	34.21 <sup>a,A</sup> $\pm$ 10.88	37.38 <sup>a,A</sup> $\pm$ 9.64
<b>ETANOL</b>	62.26 <sup>a,A</sup> $\pm$ 8.36	60.56 <sup>a,A</sup> $\pm$ 14.09	62.97 <sup>a,A</sup> $\pm$ 13.36
<b>METANOL</b>	42.26 <sup>a,A</sup> $\pm$ 14.12	49.97 <sup>a,A</sup> $\pm$ 13.52	52.03 <sup>a,A</sup> $\pm$ 14.07
<b>AGUA</b>	57.22 <sup>a,A</sup> $\pm$ 17.97	61.40 <sup>a,A</sup> $\pm$ 16.94	63.01 <sup>a,A</sup> $\pm$ 16.15

Prueba Tukey. Columnas con la misma letra minúscula y filas con la misma letra mayúscula no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$ .

Los resultados sugieren que la actividad antioxidante es mayor en las secciones medias (S<sub>2</sub>) de cada escapo en los extractos obtenidos, a excepción del extracto crudo, donde los valores más altos los posee la sección más cercana a la base de la planta (S<sub>1</sub>) (**Tabla 3.7**), lo cual podría deberse a su alto contenido de fibra, ya que se ha demostrado que existe una sinergia entre el contenido de dicho componente y los compuestos fenólicos, donde la biodisponibilidad y la bioaccesibilidad de estos compuestos se ve afectada al quedar atrapados en una matriz fibrosa o bien ejerciendo interacciones químicas, fuertes que difícilmente pueden ser rotas con un disolvente como el agua (Quirós *et al.*, 2011).

**Tabla 3.7** Determinación de la actividad antioxidante promedio de las secciones de los escapos florales de *Agave salmiana* (%) (promedio de nueve repeticiones  $\pm$  D.E)

Extracto	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
<b>CRUDO</b>	62.52 <sup>a,A</sup> $\pm$ 3.40	58.20 <sup>a,A</sup> $\pm$ 4.23	32.89 <sup>b,A,C</sup> $\pm$ 6.81
<b>HEXANO</b>	25.13 <sup>a,B</sup> $\pm$ 2.03	44.39 <sup>b,C</sup> $\pm$ 6.49	14.16 <sup>a,B</sup> $\pm$ 2.87
<b>ACETONA</b>	28.66 <sup>a,B</sup> $\pm$ 3.09	48.75 <sup>b,A,C</sup> $\pm$ 1.98	22.70 <sup>a,B,C</sup> $\pm$ 5.97
<b>ETANOL</b>	67.77 <sup>a,A</sup> $\pm$ 1.63	72.73 <sup>a,B,D</sup> $\pm$ 1.89	45.30 <sup>b,A</sup> $\pm$ 4.07
<b>METANOL</b>	52.42 <sup>a,C</sup> $\pm$ 5.58	62.48 <sup>a,D</sup> $\pm$ 3.22	29.36 <sup>b,B,C</sup> $\pm$ 3.89
<b>AGUA</b>	67.20 <sup>a,A</sup> $\pm$ 2.69	77.24 <sup>b,B</sup> $\pm$ 1.32	37.19 <sup>c,A,C</sup> $\pm$ 3.31

Prueba Tukey. Columnas con la misma letra minúscula y filas con la misma letra mayúscula no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$ .

Aparentemente el extracto acuoso obtenido a partir de la sección S<sub>2</sub> de E<sub>3</sub> es el que se podría considerar adecuado para su posible aplicación en el área de alimentos como un ingrediente nutracéutico por su elevada actividad antioxidante (**Tabla 3.8**), sin embargo otro parámetro que debe considerarse para determinar la eficiencia de los extractos es la velocidad de reacción (**Tabla 3.8**), siendo los extractos de E<sub>2</sub> los que mostraron menor tiempo de reacción (6.82 a 17.93 minutos) y por ende mayor eficiencia, por lo que se podría considerar que los extractos acuosos obtenidos a partir de la sección S<sub>2</sub> de E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>, son los más adecuados para su aplicación en el área de alimentos, toda vez que cuenta con una elevada actividad antioxidante (77.70% y 78.55%, respectivamente) y baja velocidad de reacción (8.90 min. y 8.45 min., respectivamente) Finalmente, los extractos con metanol y con acetona, fueron los menos eficientes ya que para reducir la mitad de la concentración del radical requieren más de 60 minutos.

**Tabla 3.8** Tiempo de vida media de la concentración de DPPH de los extractos de los escapos florales de *Agave salmiana* (min)

Extracto	E1			E2			E3		
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
CRUDO	21.16	9.39	↑60	17.93	6.82	↑60	21.56	10.32	↑60
HEXANO	10.23	6.85	↑60	9.75	8.95	↑60	12.67	6.68	↑60
ACETONA	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60
ETANOL	12.32	9.59	50.65	9.60	8.12	↑60	7.23	6.77	↑60
METANOL	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60	↑60
AGUA	8.01	8.86	↑60	7.34	8.90	↑60	6.68	8.45	↑60

↑= tiempo de vida media que rebasa los 60 minutos

### 3.4 Determinación de contenido de fenoles totales

Los extractos acuosos y etanólicos presentaron las mayores concentraciones de compuestos fenólicos (75 a 199 mg ácido gálico (AG)/g extracto seco) (**Tabla 3.9**), lo cual podría ser debido a que entre los principales compuestos de este grupo aislados a partir de fuentes vegetales se encuentran coumarinas, flavonoides, antocianinas y taninos (Taiz *et al.*, 2010), que son fácilmente extraídos con disolventes polares como el agua y etanol (Raaman, 2006), mientras que los extractos obtenidos con hexano mostraron la menor concentración de compuestos fenólicos (75 a 134 mg AG/g de extracto seco), debido probablemente a la baja polaridad del disolvente (Johll, 2008).

De manera general E<sub>3</sub> presenta la mayor concentración de compuestos fenólicos (**Tabla 3.10**), al igual que la sección S<sub>2</sub> de todos los escapos (**Tabla 3.11**). Estos resultados permiten establecer que existe correlación en los escapos ( $r_{E1}=0.83$ ,  $r_{E2}= 0.76$ ,  $r_{E3}=0.76$ ) con respecto a los resultados obtenidos en el análisis de actividad antioxidante, donde E<sub>3</sub>, posee los valores más elevados en ambos análisis (**Figura 3.1**), sin embargo no se pudo establecer correlación por secciones ( $r_{S1}=0.58$ ,  $r_{S2}= 0.73$ ,  $r_{S3}=0.39$ ) (**Figura 3.2**), debido posiblemente al flujo de componentes que se origina a lo largo del escapo. Tomando en cuenta la correlación establecida en los escapos podría considerarse que la actividad antioxidante se debe principalmente a compuestos fenólicos, como las cumarinas, flavonoides, ácidos fenólicos y ácido cinámico (Ricco *et al.*, 2010) y está influida por la etapa de desarrollo del escapo (Taiz *et al.*, 2010).

El extracto que mostró mayor concentración de compuestos fenólicos fue el acuoso de la sección S<sub>2</sub> de E<sub>3</sub>, el cual se encuentra correlacionado con la actividad antioxidante ( $r_{AGUA}=0.98$ ), por lo cual la extracción acuosa de la sección media del escapo E<sub>3</sub>, es la más adecuada para obtener compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

**Tabla 3.9** Determinación del contenido de fenoles totales de los extractos de escapos florales de *Agave salmiana* (\*mg AG/mg de extracto seco) (promedio de tres repeticiones  $\pm$  D.E)

Muestra	EXTRACTO						
	CRUDO	HEXANO	ACETONA	ETANOL	METANOL	AGUA	
E <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	141.12 <sup>a,A</sup> $\pm$ 1.19	103.40 <sup>a,h,B</sup> $\pm$ 0.89	125.23 <sup>a,C</sup> $\pm$ 0.59	130.80 <sup>a,D</sup> $\pm$ 1.69	114.27 <sup>a,E</sup> $\pm$ 1.40	144.87 <sup>a,A</sup> $\pm$ 1.31
	S <sub>2</sub>	160.85 <sup>b,A</sup> $\pm$ 1.36	97.74 <sup>b,B</sup> $\pm$ 2.13	147.15 <sup>b,C</sup> $\pm$ 0.98	158.20 <sup>b,A</sup> $\pm$ 1.15	140.75 <sup>b,D</sup> $\pm$ 0.79	173.18 <sup>b,E</sup> $\pm$ 0.79
	S <sub>3</sub>	77.65 <sup>c,A</sup> $\pm$ 2.62	76.73 <sup>c,A</sup> $\pm$ 1.23	85.23 <sup>c,B</sup> $\pm$ 0.45	99.75 <sup>c,C</sup> $\pm$ 0.81	70.52 <sup>c,D</sup> $\pm$ 0.79	75.00 <sup>c,A,D</sup> $\pm$ 0.67
E <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	145.14 <sup>d,A</sup> $\pm$ 0.47	125.59 <sup>d,B</sup> $\pm$ 0.47	139.20 <sup>d,C</sup> $\pm$ 0.81	144.59 <sup>d,A</sup> $\pm$ 0.34	119.66 <sup>d,D</sup> $\pm$ 1.03	169.25 <sup>b,E</sup> $\pm$ 0.68
	S <sub>2</sub>	177.84 <sup>e,A</sup> $\pm$ 1.13	107.14 <sup>a,B</sup> $\pm$ 0.59	161.03 <sup>e,C</sup> $\pm$ 0.90	177.10 <sup>e,A</sup> $\pm$ 0.72	160.85 <sup>e,C</sup> $\pm$ 0.77	183.14 <sup>d,A</sup> $\pm$ 4.08
	S <sub>3</sub>	79.01 <sup>c,A</sup> $\pm$ 0.34	89.24 <sup>e,B</sup> $\pm$ 0.90	98.38 <sup>f,C</sup> $\pm$ 0.59	103.73 <sup>f,D</sup> $\pm$ 0.22	68.42 <sup>c,E</sup> $\pm$ 0.34	93.08 <sup>e,F</sup> $\pm$ 1.27
E <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	164.04 <sup>b,A</sup> $\pm$ 0.34	134.36 <sup>f,B</sup> $\pm$ 0.79	146.69 <sup>b,C</sup> $\pm$ 0.72	146.60 <sup>d,C</sup> $\pm$ 0.59	116.00 <sup>a,d,D</sup> $\pm$ 0.85	177.66 <sup>f,E</sup> $\pm$ 0.26
	S <sub>2</sub>	183.13 <sup>f,A</sup> $\pm$ 0.47	116.83 <sup>g,B</sup> $\pm$ 0.47	171.90 <sup>g,C</sup> $\pm$ 0.79	182.59 <sup>g,A</sup> $\pm$ 0.65	172.08 <sup>f,C</sup> $\pm$ 1.03	199.12 <sup>g,D</sup> $\pm$ 0.79
	S <sub>3</sub>	87.24 <sup>g,A</sup> $\pm$ 0.79	100.75 <sup>b,h,B</sup> $\pm$ 0.56	112.53 <sup>h,C</sup> $\pm$ 0.52	114.27 <sup>h,C</sup> $\pm$ 0.81	117.92 <sup>a,d,D</sup> $\pm$ 1.10	111.99 <sup>h,C</sup> $\pm$ 0.79

Prueba Tukey. Filas con la misma letra minúscula y columnas con la misma letra mayúscula, no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$ .

\*mg AG, son miligramos de ácido gálico.

**Tabla 3.10** Determinación de fenoles totales promedio de los escapos de *Agave salmiana* (\*mg AG/mg de extracto seco) (promedio de nueve repeticiones  $\pm$  D.E)

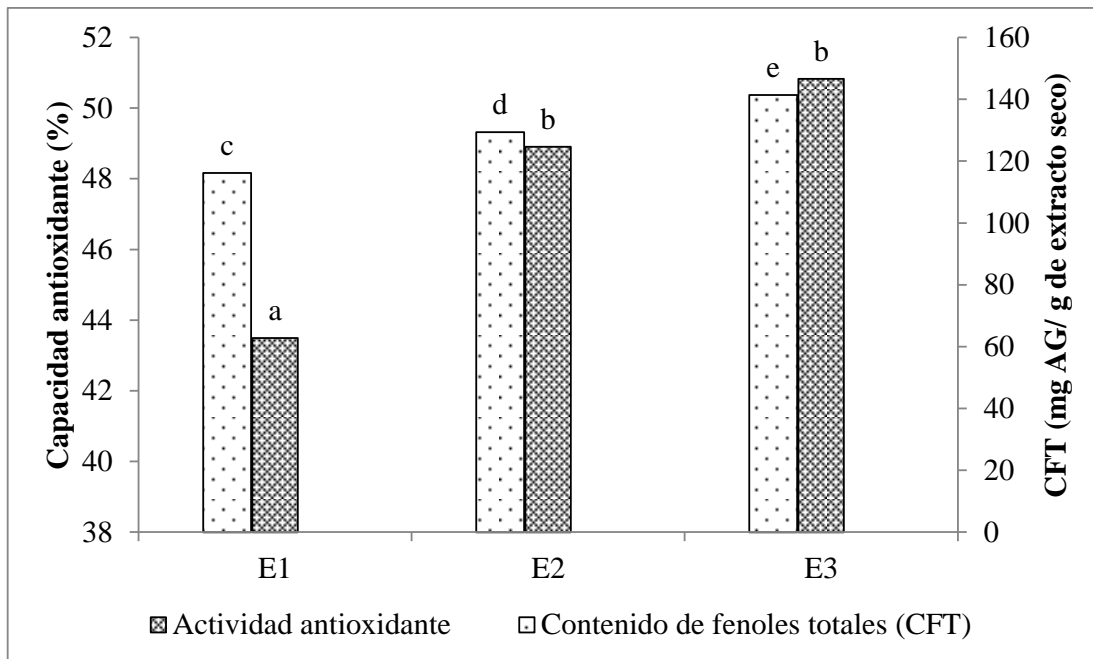
Extracto	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
CRUDO	126.54 <sup>a,A</sup> $\pm$ 35.50	134.00 <sup>a,A</sup> $\pm$ 41.11	144.80 <sup>a,A</sup> $\pm$ 41.44
HEXANO	92.62 <sup>a,A</sup> $\pm$ 11.47	107.32 <sup>a,A</sup> $\pm$ 14.84	117.31 <sup>a,A</sup> $\pm$ 13.73
ACETONA	119.20 <sup>a,A</sup> $\pm$ 25.64	132.87 <sup>a,A</sup> $\pm$ 25.97	143.71 <sup>a,A</sup> $\pm$ 24.33
ETANOL	129.58 <sup>a,A</sup> $\pm$ 23.88	141.81 <sup>a,A</sup> $\pm$ 30.02	147.82 <sup>a,A</sup> $\pm$ 27.90
METANOL	108.51 <sup>a,A</sup> $\pm$ 28.96	116.31 <sup>a,A</sup> $\pm$ 37.81	135.33 <sup>a,A</sup> $\pm$ 26.00
AGUA	131.02 <sup>a,A</sup> $\pm$ 41.26	148.49 <sup>a,A</sup> $\pm$ 39.59	162.92 <sup>a,A</sup> $\pm$ 37.07

Prueba Tukey. Filas con la misma letra minúscula y columnas con la misma letra mayúscula, no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$

**Tabla 3.11** Determinación de fenoles totales promedio de las secciones de escapos florales de *Agave salmiana* (\*mg AG/mg de extracto seco) (promedio de nueve repeticiones  $\pm$  D.E)

Extracto	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
CRUDO	150.10 <sup>a,A,C</sup> $\pm$ 9.99	173.94 <sup>a,A</sup> $\pm$ 9.50	81.30 <sup>b,A</sup> $\pm$ 4.24
HEXANO	121.12 <sup>a,B,C</sup> $\pm$ 13.03	107.24 <sup>a,b,B</sup> $\pm$ 7.79	88.91 <sup>b,A</sup> $\pm$ 9.81
ACETONA	137.04 <sup>a,A,B,C</sup> $\pm$ 8.89	160.03 <sup>a,A</sup> $\pm$ 10.13	98.71 <sup>b,A</sup> $\pm$ 11.15
ETANOL	140.66 <sup>a,A,B,C</sup> $\pm$ 7.02	172.63 <sup>b,A</sup> $\pm$ 10.45	105.92 <sup>c,A</sup> $\pm$ 6.13
METANOL	116.64 <sup>a,b,B</sup> $\pm$ 2.25	157.89 <sup>a,A</sup> $\pm$ 12.96	85.62 <sup>b,A</sup> $\pm$ 22.86
AGUA	163.93 <sup>a,A</sup> $\pm$ 13.91	185.15 <sup>a,A</sup> $\pm$ 10.68	93.36 <sup>b,A</sup> $\pm$ 15.10

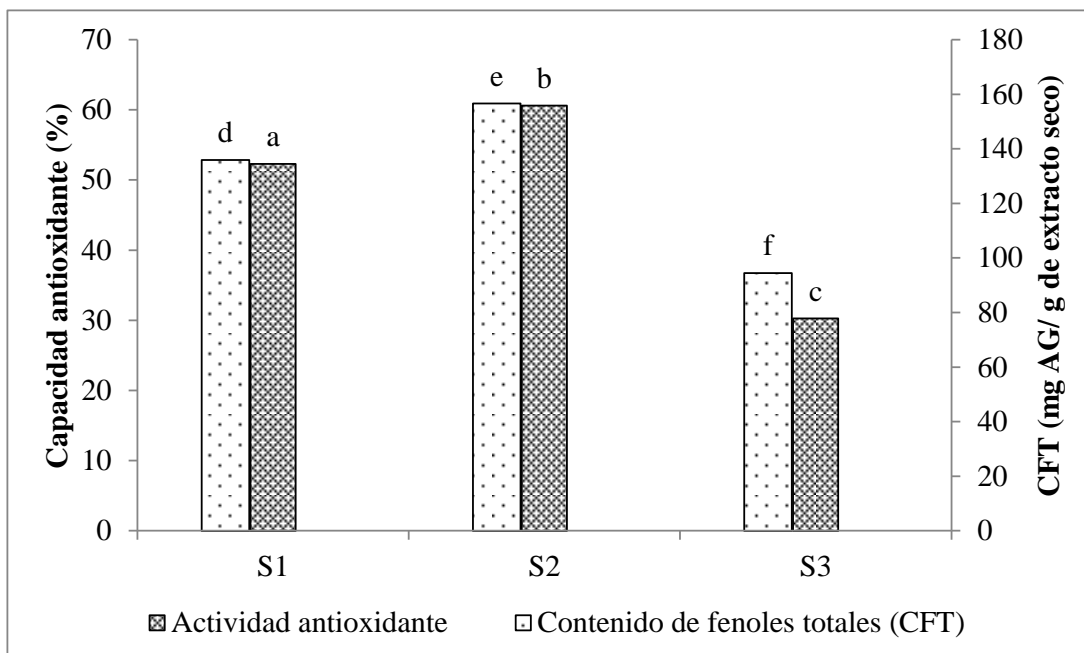
Prueba Tukey. Filas con la misma letra minúscula y columnas con la misma letra mayúscula, no tienen diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$ .



Barras con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).

$r_{E1}=0.83, r_{E2}=0.76, r_{E3}=0.76$ .

**Figura 3.1** Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y CFT en los escapos florales de *Agave salmiana*

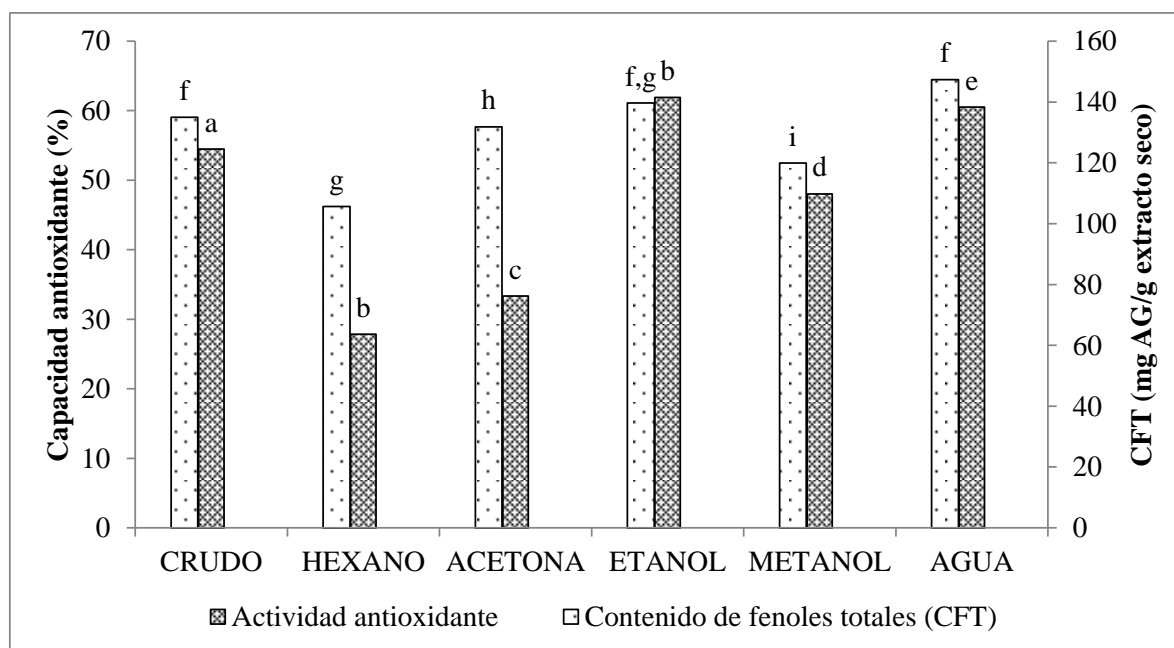


Barras con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).

$r_{S1}=0.58, r_{S2}=0.73, r_{S3}=0.39$ .

**Figura 3.2** Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y CFT en las secciones de los escapos florales de *Agave salmiana*

Por otra parte, los resultados indican que la extracción de compuestos fenólicos no tienen correlación con la actividad antioxidante cuando se utiliza como disolvente el hexano (**Figura 3.3**), lo cual indica que éste disolvente utilizado extrae compuestos antioxidantes diferentes a los compuestos fenólicos, como podrían ser carotenoides, ligninas, taninos, algunas vitaminas como la E y la C, y algunas enzimas (Benavides-Mendoza *et al.*, 2008).



Barras con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).  
 $r_{\text{CRUDO}}=0.80$ ,  $r_{\text{HEXANO}}=0.48$ ,  $r_{\text{ACETONA}}=0.90$ ,  $r_{\text{ETANOL}}=0.91$ ,  $r_{\text{METANOL}}=0.88$ ,  $r_{\text{AGUA}}=0.98$ .

**Figura 3.3** Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y CFR en los extractos

### 3.5 Determinación de actividad antimicrobiana

Los extractos acuosos presentaron la mayor actividad antimicrobiana (7 muestras positivas) contra *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium*, además de elevado espectro de acción al inhibir más de un microorganismo por extracto (**Tabla 3.12**), al igual que el extracto etanólico S<sub>2</sub> de E<sub>1</sub> al inhibir a *Escherichia coli* y *Shigella sonnei*, indicando posiblemente que los compuestos antimicrobianos aislados con estos disolventes (carbohidratos, glucósidos, saponinas, proteínas, aminoácidos, fenoles, taninos, antocianinas y catecolaminas) (Raaman, 2006) afectan a las bacterias Gram negativas, lo cual podría ser debido a que en este tipo de bacterias, el polisacárido O (dominio hidrofílico de los lipopolisacáridos localizados en la parte externa del microorganismo, Reyes *et al.*, 2009),



influye en la susceptibilidad de la bacteria contra los compuestos antimicrobianos con elevada polaridad, por ello los extractos acuosos y etanólicos generaron mayor inhibición. De tal manera puede decirse, que los compuestos con actividad antimicrobiana son en su mayoría de polaridad elevada.

Por otra parte, E<sub>2</sub> y S<sub>2</sub> presentaron la mayor cantidad de extractos con actividad antimicrobiana (15 y 16, respectivamente), mostrando E<sub>3</sub> y S<sub>3</sub> las menores cantidades (8 y 1, respectivamente), indicando que la concentración de compuestos antimicrobianos es mayor en escapos maduros, lo cual podría deberse a que la complejidad de los compuestos antimicrobianos necesita de un tiempo prolongado para la síntesis y actividad de los mismos, tal es el caso de los glucósidos aislados del tallo de la planta *Guazuma ulmifolia* Lam. cuya actividad antimicrobiana se observó específicamente en etapas de pre-floración, como mecanismo de defensa ante los microorganismos oportunistas de la flora y frutos de la planta, inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus subtilis* (Villatoro *et al.*, 2010). Mientras que, la mayor cantidad de muestras positivas en S<sub>2</sub>, podría ser debido por un lado a la correlación de las secciones de los compuestos con actividad antimicrobiana y los compuestos con actividad antioxidante ( $r_{S1}=0.79$ ,  $r_{S2}= 0.83$ ,  $r_{S3}=0.76$ ), ya que estos últimos ejercen interacción con el material fibroso del escapo concentrándose en esta sección y por otra parte, podría deberse al desarrollo natural del escapo, que consiste en tres actividades distintas dependiendo de la sección: en la sección 1, la parte baja es la encargada de concentrar compuestos de carácter rígido como fibra y carbohidratos para sostener el escapo de gran altura, lo que le resta porcentaje a los compuestos antimicrobianos y antioxidantes, por su parte la sección media se encarga del transporte efectivo de nutrientes y compuestos a la parte más elevada del escapo, por ello su concentración es la más elevada y finalmente la sección 3, la más alejada del corazón de *Agave*, posee la facultad de comenzar la floración, con la desventaja de retener cantidades elevadas de estos compuestos inhibitorios y antioxidantes ya que por ser la más retirada en el escapo, requiere de un tiempo prolongado para una concentración elevada de estos mismos (Verduzco *et al.*, 2008).

Se ha reportado que la sensibilidad bacteriana ante compuestos antimicrobianos va a depender del tipo de microorganismo en cuestión (Marino, *et al.*, 2001), por ello se analizó el

comportamiento de inhibición con relación a bacterias Gram positivas y Gram negativas, donde los resultados indicaron que las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei*) mostraron mayor inhibición ante los extractos de estudio, en comparación a las Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) (**Tabla 3.12**), lo cual podría ser debido a que usualmente las bacterias Gram positivas ejercen mayor resistencia a los compuestos antimicrobianos con relación a las bacterias Gram negativas (Rameshkumar, *et al.*, 2007; Stefanello *et al.*, 2008). El mecanismo podría deberse por una parte a la estructura externa de cada tipo de microorganismo, donde el grosor de la estructura de peptidoglicano en las bacterias Gram positivas impide la interacción de muchos de los compuestos antimicrobianos con las proteínas de la membrana, no siendo así en las bacterias Gram negativas, las cuales poseen una delgada capa de peptidoglicano más una membrana externa de lipopolisacárido, hecho que determina que respondan en forma diferente a la presencia de estos compuestos (Tereschuk *et al.*, 2007); y por otra parte a los diversos mecanismos que ejercen los compuestos antimicrobianos sobre las células bacterianas incluyendo la disrupción de la membrana lipídica, modificación de los sistemas enzimáticos e interacción con el material genético bacteriano, no obstante los métodos y mecanismos de acción, así como los efectos toxicológicos y sensoriales de estos compuestos, no están completamente entendidos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Otra de las razones importantes que diferencian la sensibilidad antimicrobiana entre bacterias Gram positivas de las Gram negativas, es por el tipo y localización de la enzima que inactiva el efecto inhibitorio de la mayoría de los compuestos antimicrobianos, ya que las enzimas que producen los Gram positivos suelen ser **extracelulares**, facilitando la interacción de dichos compuestos con la enzima; por otro lado las enzimas de las bacterias Gram negativas son de tipo **periplásmicas**, indicando que el compuesto antimicrobiano debe primero atravesar la membrana plasmática para después entrar en contacto con la enzima, representado una mayor dificultad de interacción e inhibición, por ello éstos últimos suelen ser más sensibles ante compuestos de este tipo (Pérez, 2006).

**Tabla 3.12** Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

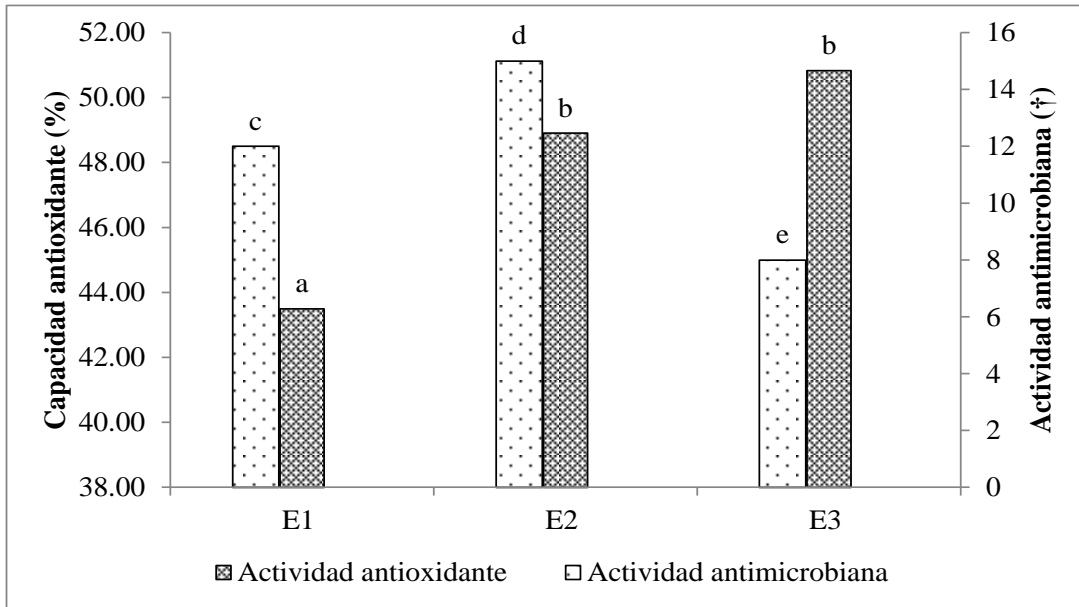
MUESTRA	EXTRACTO																						
	CRUDO			ACUOSO			HEXANO			ETANOL			METANOL			ACETONA							
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>L. monocytogenes</i>			
E <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
	S <sub>2</sub>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	
E <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	S <sub>2</sub>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
E <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	S <sub>2</sub>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

+, indica que la muestra generó inhibición y - indica que la muestra no generó inhibición contra los microorganismos en cuestión.

E<sub>1</sub>=escapo de 3m, E<sub>2</sub>= escapo de 2.5 m, E<sub>3</sub>= escapo de 2 m, S<sub>1</sub>=sección del escapo más cerca de la piña, S<sub>2</sub>= sección del escapo intermedia y S<sub>3</sub>= sección del escapo más alejada de la piña

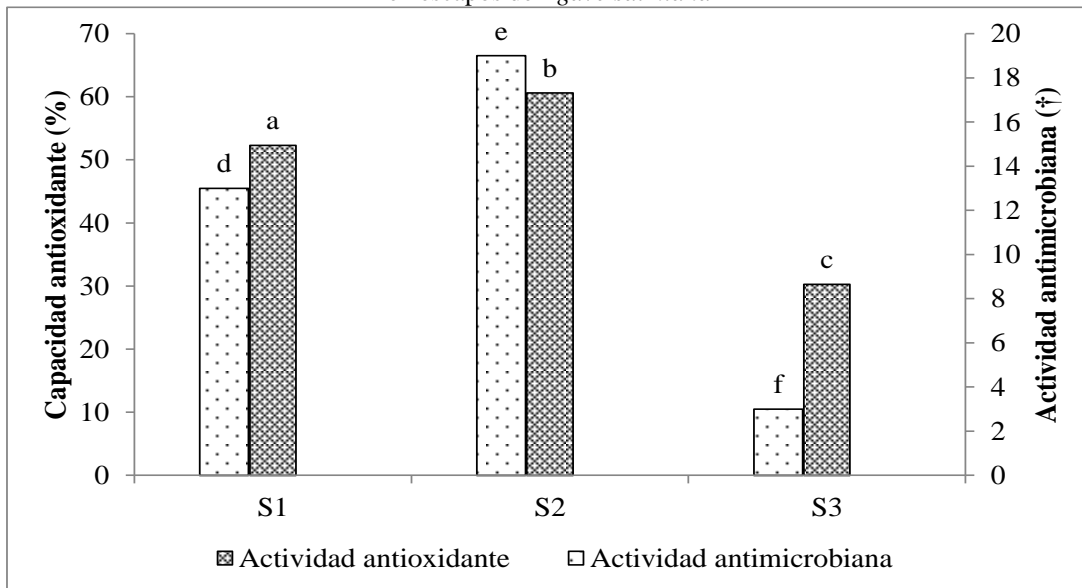
Por otra parte, los resultados por escapo obtenidos en el análisis de actividad antioxidante con relación a los obtenidos en el análisis de actividad antimicrobiana, indican que no existe correlación ( $r_{E1}=0.53$ ,  $r_{E2}=0.62$ , y  $r_{E3}=0.35$ ) que sugiera una dependencia entre los compuestos antioxidantes y los compuestos antimicrobianos presentes en los escapos (**Figura 3.4**), indicando que la actividad antimicrobiana no es generada exclusivamente por los compuestos antioxidantes y que ambos compuestos no están relacionados por la etapa de crecimiento del escapo, sin embargo la correlación por sección ( $r_{S1}=0.79$ ,  $r_{S2}=0.83$ ,  $r_{S3}=0.76$ ) indica que ambos compuestos se trasladan a velocidades similares a lo largo del escapo (**Figura 3.5**).

En promedio S<sub>2</sub> presentó la mayor concentración tanto de compuestos con actividad antioxidante como de compuestos con actividad antimicrobiana (**Figura 3.5**), por lo cual es posible considerar esta sección para su posible aplicación en el área de alimentos como agente antimicrobiano por su elevada actividad antimicrobiana y como ingrediente nutracéutico por su elevada actividad antioxidante, mientras que S<sub>3</sub> mostró los menores valores en ambos compuestos (3 extractos con actividad antimicrobiana y 30.27%, respectivamente).



Barras con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).  
 †=cantidad total de extractos que mostraron actividad antimicrobiana  
 $r_{E1}=0.53$ ,  $r_{E2}=0.62$ , y  $r_{E3}=0.35$ .

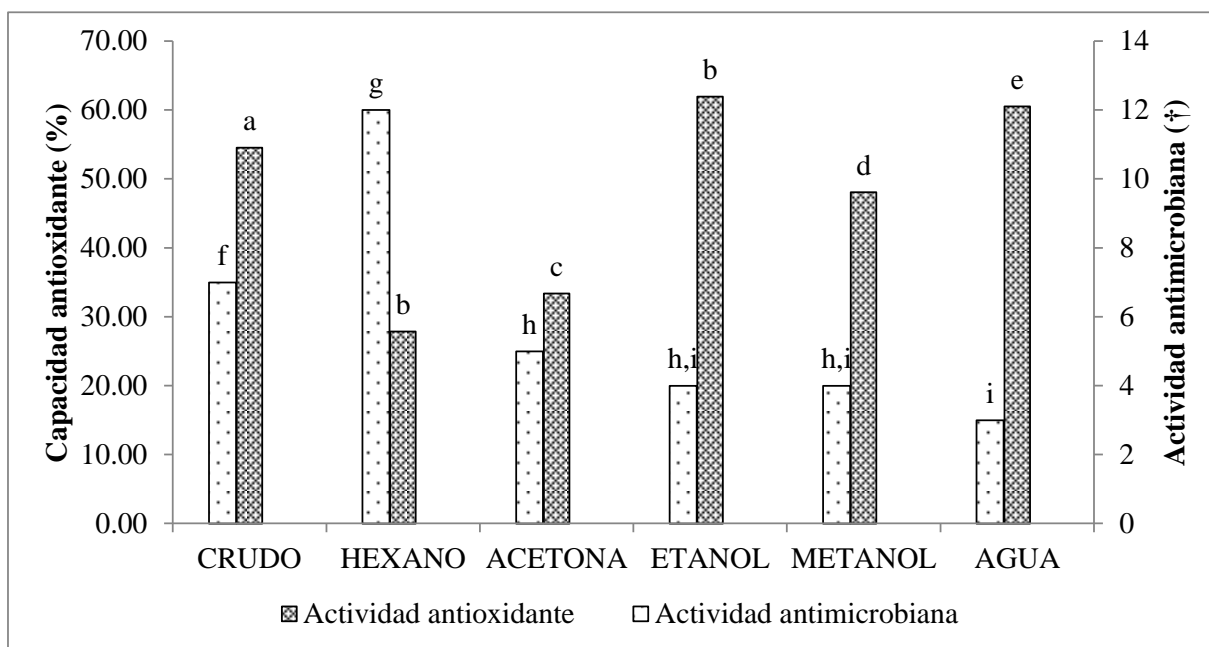
**Figura 3.4** Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y antimicrobiana en escapos de *Agave salmiana*



Barras con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).  
 †=cantidad total de extractos que mostraron actividad antimicrobiana  
 $r_{S1}=0.79$ ,  $r_{S2}=0.83$ ,  $r_{S3}=0.76$ .

**Figura 3.5** Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y antimicrobiana en secciones de los escapos de *Agave salmiana*

El extracto acuoso presentó la mayor cantidad de extractos con actividad antimicrobiana así como el porcentaje más elevado de actividad antioxidante (**Figura 3.6**), resultados que permitieron establecer la correlación entre ambos análisis ( $r_{AGUA}=0.97$ ), indicando que este disolvente es muy útil en la extracción tanto de compuestos con actividad antimicrobiana como de actividad antioxidante. Mientras que, los resultados muestran que la actividad antimicrobiana no tiene correlación con la actividad antioxidante cuando se utiliza la acetona como disolvente ( $r_{ACETONA}=0.54$ ).



Barras con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).

†=cantidad total de extractos que mostraron actividad antimicrobiana

$r_{CRUDO}=0.78$ ,  $r_{HEXANO}=0.75$ ,  $r_{ACETONA}=0.54$ ,  $r_{ETANOL}=0.82$ ,  $r_{METANOL}=0.77$ ,  $r_{AGUA}=0.97$ .

**Figura 3.6** Comparación de valores promedio obtenidos en el análisis de actividad antioxidante y antimicrobiana en los extractos de escapos de *Agave salmiana*

Por otro lado, se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de 28 extractos que mostraron actividad antimicrobiana de las 52 muestras iniciales, donde los resultados obtenidos indican que los extractos acuosos (7) mostraron un amplio espectro de acción inhibiendo microorganismos como *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. sonnei*, con una CMI de 7.81, 20.83 y 15.63 mg/mL, respectivamente (**Tabla 3.13**), debido principalmente a la diversificación de compuestos antimicrobianos obtenidos con agua (carbohidratos, glucósidos, saponinas, proteínas, aminoácidos, fenoles y taninos) (Raaman, 2006), por el contrario, los extractos de acetona solo inhibieron a un solo tipo de bacteria (*E. coli*) con

valores de CMI relativamente más altos, entre 10.83 mg/mL y 31.25 mg/mL, en función de la sección y escapeo (**Tabla 3.13**).

De acuerdo a la clasificación de bacterias en función a su sensibilidad antimicrobiana reportada por Cruz-Carillo *et al.* (2010), donde clasifica a un microorganismo como sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12.5 mg/ml, de mediana sensibilidad antimicrobiana, entre 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad antimicrobiana cuando la CMI está entre 50 a 100 mg/mL, se tiene de manera general que los valores de CMI obtenidos se encuentran dentro de la clasificación de bacterias con mediana sensibilidad.

Las CMI más bajas que se registraron para las diferentes bacterias corresponden a: los extractos acuosos específicamente en la sección media (S<sub>2</sub>) de los escapeos 1 y 3, con un valor de 7.81 mg/mL, contra la bacteria *E. coli*; a los extractos etanólicos de la misma sección pero en E<sub>1</sub>, inhibiendo a *Shigella sonnei* con un CMI de 7.81 mg/mL; así también a los extractos metanólicos de la sección 2 tanto de E<sub>2</sub> como de E<sub>3</sub> con un CMI de 10.42 mg/mL al inhibir a *S. typhimurium*; y finalmente en la misma sección y escapeos (S<sub>1</sub> de E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>), el extracto con hexano, que inhibe a *L. monocytogenes* con un valor de CMI de 10.42 mg/mL.

**Tabla 3.13** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

DISOLVENTE	ESCAPO	SECCIÓN	MICROORGANISMO	CMI (mg/mL)
CRUDO	E <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	<i>S. sonnei</i>	20.83
		S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	10.42
	E <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	<i>E. coli</i>	20.83
		S <sub>2</sub>	<i>S. sonnei</i>	10.42
		S <sub>3</sub>	<i>E. coli</i>	20.83
	E <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	<i>S. sonnei</i>	31.25
S <sub>2</sub>		<i>E. coli</i>	10.42	
ACUOSO	E <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	<i>S. sonnei</i>	20.83
			<i>S. typhimurium</i>	20.83
		S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	7.81
	E <sub>2</sub>		<i>S. sonnei</i>	15.63
		S <sub>1</sub>	<i>E. coli</i>	20.83
			<i>S. typhimurium</i>	20.83
		S <sub>2</sub>	<i>S. sonnei</i>	15.63
			<i>E. coli</i>	10.42
		S <sub>3</sub>	<i>S. sonnei</i>	20.83
	E <sub>3</sub>		<i>E. coli</i>	20.83
		S <sub>1</sub>	<i>E. coli</i>	31.25
		S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	7.81
HEXANO	E <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	<i>S. typhimurium</i>	15.63
	E <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	<i>S. typhimurium</i>	20.83
		S <sub>2</sub>	<i>L. monocytogenes</i>	10.42
	E <sub>3</sub>		<i>E. coli</i>	15.63
		S <sub>2</sub>	<i>L. monocytogenes</i>	10.42
METANOL	E <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	<i>S. sonnei</i>	15.63
	E <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	<i>S. sonnei</i>	15.63
		S <sub>2</sub>	<i>S. typhimurium</i>	10.42
	E <sub>3</sub>	S <sub>2</sub>	<i>S. typhimurium</i>	10.42
ETANOL	E <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	<i>E. coli</i>	20.83
		S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	15.63
		<i>S. sonnei</i>	7.81	
	E <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	15.63
ACETONA	E <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	31.25
	E <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	20.83
	E <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	<i>E. coli</i>	31.25

De manera general los extractos de *Agave salmiana* presentan valores de CMI más bajos con relación a los extractos de otras plantas (**Figura 3.14**), como es el caso de los extractos acuosos al inhibir *E. coli* con un CMI de 7.81 mg/mL en comparación al extracto acuoso de

*Azadirachta indica* la cual necesita de 150 mg/mL para inhibir el mismo microorganismo, así también los extractos metanólicos y hexanólicos de *Agave salmiana* (10.42 mg/mL y 10.42 mg/mL, respectivamente) al inhibir a *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* respectivamente, con relación a los extractos metanólicos de *Centaurea calcitrapa* (612 mg/mL) y hexanólicos de *Amaranthus hybridus* (35.4 mg/mL), lo cual indica evidentemente que éstos últimos requieren de mayor cantidad de extracto para lograr inhibir el mismo tipo de bacteria. Mientras que el extracto etanólico perteneciente a *Agave salmiana* fue la única muestra que presentó una CMI más elevada con respecto a los valores reportados con el mismo disolvente pero de *Rosmarinus officinalis* L. contra *Shigella sonnei* (7.81 mg/mL y 1.02 mg/mL, respectivamente).

A diferencia de extractos de plantas con alto contenido en aceites esenciales (**Tabla 3.14**) ninguno de los extractos del escapo de *Agave salmiana* presentó efecto contra *S. aureus*, lo cual podría deberse a que esta bacteria es uno de los patógenos principales que presenta multirresistencia a diversos compuestos antimicrobianos (Sierra *et al.*, 2010).

Los diferentes extractos obtenidos de *Agave salmiana* a diferencia de otras plantas (**Figura 3.14**) lograron inhibir diversas bacterias de actual importancia en la industria alimentaria como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spp., y *Escherichia coli* (Coutiño *et al.*, 2008). En adición, la industria alimentaria ha mostrado un especial interés por la bacteria *Listeria monocytogenes*, debido a que las tecnologías de procesamiento de alimentos, tales como conservantes químicos, no han podido eliminar dicho patógeno de forma eficaz (Tajkarimi *et al.*, 2010), por lo cual los compuestos antimicrobianos aislados de los extractos de escapo de *Agave salmiana*, podrían ser de gran utilidad como agentes naturales a fin de generar una alternativa a dicho problema, los cuales en comparación a otras plantas presentan CMI muy bajas.

Por otra parte, dentro de las estructuras estudiadas bajo este tipo de análisis (CMI), cabe resaltar que en su mayoría son seleccionadas las hojas y raíces, siendo pocos los estudios enfocados a otras partes de la planta como las flores e inflorescencias, desaprovechando del todo, en el caso de *Agave salmiana* la parte del escapo floral.



**Tabla 3.14** Comparación de CMI de diferentes plantas y escapos de *Agave salmiana*

Especie vegetal	Parte de la planta	Tipo de extracto	Microorganismo que afecta	CMI (mg/mL)	
<i>Agave salmiana</i>	Escapo	E <sub>1</sub> y E <sub>3</sub>	Acuoso	<i>Escherichia coli</i>	7.81
		E <sub>1</sub>	Etanólico	<i>Shigella sonnei</i>	7.81
		E <sub>2</sub> y E <sub>3</sub>	Metanólicos	<i>Salmonella typhimurium</i>	10.42
<i>Agave lechuguilla</i> <sup>1</sup>	Hojas		Hexanólicos	<i>Listeria monocytogenes</i>	10.42
			Metanólicos	<i>Bacillus cereus</i>	14.2
				<i>Staphylococcus aureus</i>	28.5
				<i>Enterobacter aerogenes</i>	42.8
<i>Aloe vera</i> <sup>3</sup>	Hojas		Acuoso	<i>Listeria monocytogenes</i>	100
<i>Azadirachta indica</i> <sup>4</sup>	Hojas		Acuoso	<i>Escherichia coli</i>	150
<i>Larrea tridentata</i>	Hojas		Metanólicos <sup>1</sup>	<i>Escherichia coli</i>	7.1
			Etanólicos <sup>2</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.77
<i>Centaurea calcitrapa</i> <sup>5</sup>	Hojas		Metanólicos	<i>Salmonella typhimurium</i>	612
<i>Perejil</i> <sup>2</sup> ( <i>Petroselinum sativum</i> )	Hojas y raíz		Agua-Etanol (50:50, v/v)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.77
<i>Amaranthus hybridus</i> <sup>7</sup>	Hojas		Hexano	<i>Listeria monocytogenes</i>	35.5
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <sup>6</sup>	Hojas		Etanólico	<i>Shigella sonnei</i>	1.02

1.- Castro-Franco, et al., 2001. 2.- García, et al., 2009. 3.- Guillermo et al., 2012. 4.- Yumar et al., 2012. 5.- Toribio et al. 2004. 6.- Castaño et al. 2010. 7.- Orozco et al., 2011.

## CONCLUSIONES

1. El estado de desarrollo del escapo floral influye directamente en la concentración y tipo de compuestos presentes, concentrándose en la última sección ( $S_3$ ), a excepción de la fibra y carbohidratos.
2.  $E_3$  es posee los mayores rendimientos de extracción siendo el extracto acuoso de este escapo obtenido a partir de  $S_2$  el que mostró la mayor actividad antioxidante, el menor tiempo de reacción y la mayor concentración de compuestos fenólicos, mostrando que los disolventes con polaridad alta son más eficientes para la extracción de los compuestos responsables de estas propiedades.
3. El mayor espectro de actividad antimicrobiana se obtuvo con el extracto acuoso de la sección 2 de  $E_2$ .
4. Las bacterias Gram negativas que se analizaron mostraron mayor sensibilidad antimicrobiana ante los diferentes extractos, en comparación a las Gram positivas.
5. No existe correlación entre la actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir del escapo.
6. Las CMI más bajas para *E. coli* se registraron en los extractos acuosos de  $E_1$  y  $E_3$ , para *Shigella sonnei* se obtuvo en los extractos etanólicos de  $E_1$ , para *S. typhimurium* en los extractos metanólicos de  $E_2$  y  $E_3$ , mientras que para *L. monocytogenes* fue en los extractos hexanólicos de  $E_2$  y  $E_3$ .

## REFERENCIAS

1. Arduino, M. 2009. *Staphylococcus aureus*.  
<http://www.extension.org/pages/28432/staphylococcus-aureus>
2. Baldwin, D. 2009. *Agave americana*. <http://collagelandscapedesign.com/foilage-vs-flowers/>
3. Baldizán, A., Domínguez, C., García, D., Chacón, E., Aguilar, L. 2007. Metabolismos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque deciduo tropical de los llanos centrales Venezolanos. *Zootecnia Tropical*. 24(3): 213-232.
4. Benavides-Mendoza, A., Ramírez, H., Roblado-Torres, L. 2009. Antioxidantes en las plantas: algunos factores edáficos y ambientales que los modifican. *Temas modernos de Nutrición Vegeta*. 3(7): 13-26.
5. Bueno-Sánchez, J., Martínez-Morales, J., Stashenko, E. 2009. Actividad antibacteriana de terpenos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*. 41(3):112-126
6. Cabello, R. 2008. *Microbiología y parasitología humana*. Editorial Panamericana. 3era edición. México, D.F. pp. 874.
7. Calange, F. 2011. *Hongos medicinales*. Editorial Mundi-Prensa. 1era edición. España. 29-34 p.
8. Carpentier, B., Cerf, O. 2011. Persistence of *Listeria monocytogenes* un food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*. 145(1): 1-8 p.
9. Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J., Jiménez, R. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 17(2): 149-154
10. Castillo, G., Martínez, S. 2007. *Manual de fitoterapia*. Editorial ELSEVIER. 1era edición. Barcelona, España. 255-256 p.
11. Castro-Franco, R., Meza-Herrera, A., Contreras-Quiróz, M., Santos-García, J. 2001. Uso de fitoextractos en el control del crecimiento *in vitro* de bacterias enteropatógenas. *Revista de Chapingo serie zonas áridas*. 8(1): 96-99.
12. Causse, C. 2010. *Los secretos de la salud de los antioxidantes*. Editorial Hispano Europea. 1era edición. 45-47 p.

13. Cavalieri, S., Rankin, I., Harbeck, R., Sautter, R., McCarter, Y., Sharp, S., Ortez, J., Spiegel, C. 2005. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Library of Congress. Seattle, Washington. 241 p.
14. Cirilo, B. 2008. Determinación bioquímica reductora, ponderal y supresora de apetito de *Smilax moranensis* Martens y Galeotti y *Centaurium quitense* (Kunth) B. L. Robinson. Tesis (Doctor en Ciencias biológicas con especialidad en productos naturales. Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. 133 p.
15. CONABIO. 2008. *Agave*, mezcales y diversidad. [www.biodiversidad.gob.mx/usuarios/mezcales/mMapa.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/usuarios/mezcales/mMapa.html)
16. Cortés, L., Basurto, F. 2009. Guía de colección Nacional de agaváceas y nolináceas del jardín botánico. Tesis profesional. México. UNAM, Facultad de Biología. 14-17 p.
17. Coutiño, R., Rodríguez, E., Pérez, R., Igartúa, E., López, F. 2008. Bacterias transmitidas por agua y alimentos que producen enfermedades. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana. 21(2): 245-249.
18. Cruz-Carillo, A., Rodríguez, N., Rodríguez, C. 2010. In vitro evaluation of the antibacterial effect of *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* and *Silybum marianum*. Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Actualidad y Divulgación Científica. 13(2): 117-124.
19. Díaz, P., Luz, N. 2009. Interacciones moleculares y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Revista de estudios transdisciplinarios. 1(2): 32-55.
20. Domingo, D., López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia. 16(4): 385-393.
21. Fallarero, A. 2009. Actividad antioxidante y neuroprotectora *in vitro* del extracto acuoso del alga *Bryothamnion triquetrum*. Tesis (Doctor en Ciencias biológicas). Habana, Cuba. Facultad de biología. Universidad de la Habana. 46 p.
22. FAOSTAT.2010.<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
23. Fernández, L. 2008. Fitoquímica del *Agave salmiana*. Tesis de grado doctoral. Puebla. Universidad de las Américas, Facultad de química y biología, Escuela de Ciencias. 344-356 p.

24. Flores, A., Castañeda, E., Sánchez, F., Romero, L., Ruíz, J. 2010. Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el altiplano mexicano. Tesis de grado magisterial. Tlaxcala. Instituto tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Facultad de biología. 1-10 p.
25. Fuertes, C., Roque, M., Tristan, M. 1998. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* C.P.Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación. 1(2):345-361
26. García, A. 2007. Los agaves de México. Ciencias. 2(87): 14-23.
27. García, C., Alonso, E., Rodríguez, R., Martínez, A., Ramírez, P. Moreno, A. 2009. Susceptibilidad *in vitro* de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a diferentes extractos vegetales. Revista agraria. 6(1): 19-23.
28. García, E., Méndez, S., Talavera, D. 2010. El género *Agave* spp. En México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. Revista salud pública y nutrición. 15(5): 109-129.
29. Gary, G. 2011. Visuals.Unlimited.  
[http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000fx5oYi\\_NAWA](http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000fx5oYi_NAWA)
30. Gentry, H. 1982. Agaves of continental North America. Editorial The University of Arizona Press. 1era edición. Arizona, EUA. 601-609 p.
31. Giugno, S., Oderiz, S. 2010. Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 44(1): 320-325.
32. González, E., Quiñónez, E. 2005. Falsa apendicitis *Yersinia enterocolítica*. Revista digital universitaria. 6(4): 1-9.
33. González-Cruz, L. 2011. Influencia de la edad del *Agave atrovirens* karw, en la actividad del complejo enzimático 1-SST-1-FFT, en la concentración de carbohidratos solubles y su relación con la microestructura. Tesis (Doctor en Ciencias con especialidad en alimentos). México, D.F. Instituto Politécnico Nacional. 109 p.
34. González-Cruz, L. Jaramillo, E., Bernardino, A., Mora, R. 2011. Influence of plant age on fructan content in fructosyl transferasa activity in *Agave atrovirens karw* leaves. African Journal of Biotechnology. 10(71): 15911-15929.
35. González, T., Rojas, R. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud pública de México. 47(5): 345-348.

36. Gossmann, C. 2012. SciTechDaily. <http://scitechdaily.com/scientists-reveal-the-structure-of-bacterial-injection-needles-at-atomic-resolution/>
37. Gracia, C., Correa, E., Rojas, N. 1995. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 23(1): 42-48.
38. Guillermo, L., Morón, A., Carinella, R., Castillo, L. 2012. Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de *Aloe vera* sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 1(62): 73-78.
39. Hernández, R., Lugo, E., Díaz, L., Villanueva S. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *Revista digital científica y tecnológica*. 3(11): 1-9.
40. Haney, J. 2008. *Encyclopedia Británica*.  
<http://www.britannica.com/EBchecked/media/147082/Colorized-scanning-electron-micrograph-depicting-a-number-of-Gram-negative>
41. Hipólito, J. 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*. 13(33): 13-18.
42. Jaramillo, B., Stashenko, E., Martínez, J. 2010. Composición química volátil de *Stureja brownei* (sw.) Briq. Colombiana y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de plantas medicinales*. 5(15): 566-570.
43. Jiménez, C. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista digital Universitaria*. 12(1): 1-23.
44. Johll, M. 2008. *Química e investigación criminal: una perspectiva de la ciencia forense*. Editorial Reverté. Barcelona, España. 254-456 p.
45. Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. y Gutiérrez, G. 2009. *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. Editorial FAO Fiat Panis. 1era edición. México. 45-47 p.
46. Kumar, V., Abul, K., Fausto, N. 2010. *Patología estructural y funcional*. Editorial Elsevier. 7ma edición. Madrid, España. 651-660 p.
47. Labrada, R., Caseley, J., Parker, C. 1996. *Manejo de malezas para países en desarrollo*. Editorial FAO. Roma, Italia. 201 p.
48. Lizárraga, R., Panta, A., Jayasinghe, U., Dodds, J. 1991. *Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos*. 2da edición. Editorial CIP. Lima, Perú. 22 p.

49. Lozano, M., García, S., Heredia, N., Castro, R. 2011. Species of *Agave* induces morphological changes in *Aspergillus parasiticus* speare and *Aspergillus flavus* link ex fries. *Journal of food agriculture and environment*. 9(2): 768-771.
50. Marcano, D., Hasegawa, M. 2009. *Fitoquímica orgánica*. Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 593 p.
51. Marco, F., Mensa, L., Vila, J., Ruíz, J. 2008. Quinolone resistance among *Shigella* spp isolated from travellers returning from India. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(3): 279-281.
52. Marino, M., Bersani, C., Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*. 67(3-5): 187-195.
53. Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Tuñón, M. 2011. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 17(6): 271-278.
54. Martínez, M. 2011. Enfermedad diarreica aguda en niños. Agentes causales más comunes en una comunidad de Chalco Central. *Pediatría*. 38(3): 45-51.
55. Martínez, M., González, A., Cazares, L., Moreno, M., García, A. 1999. Activity of *Byrsonima crassifolia*. *Ethnopharmacol*. 66(1): 79-82.
56. Martínez, S. González, J. Culebras, J., Tuñón, M. 2009. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 6(1): 271-278.
57. Melton, C. 2008. *Nature Photography*.  
<http://www.nearfamous.com/Pages/NectarBats.html>
58. Meurer, B., McBeth, D., Hallihan, B., Delph, S. 1996. Antimicrobial activity in medicinal plants of the *Escrophulariaceae* and *Acanthaceae*. *International Journal of Pharmacology*. 34(4): 243-248
59. Montes, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista de micología*. 29(1): 34-45.
60. Noriega, L. 2008. *Listeria monocytogenes*: vieja bacteria, desafío permanente. *Revista Chilena de Infectología*. 25(5): 326-327.
61. Novo, E. 2008. Lignificación en cultivos celulares de gimnospermas basales. Tesis de grado, Doctoral. A Coruña. Universidad de Coruña. Facultad de Ciencias. 240 p.

62. Orestes, J., Meneses, A., Simonet, A., Macías, F., Nogueiras, C., Gómez, A., Escario, J. 2008. Saponinas esteroidales de la planta de *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. Revista de biología tropical. 56(4): 45-56.
63. Orozco, A., Escareño, J., Vaquera, S., Ramírez, M. 2011. Bactericidal evaluation total extracts of *Amaranthus hybridus* and *Ruta graveolens* transmitters applied to bacteria ETA's. British Journal of Biomedical Science. 63(2): 345-351.
64. Padilla, G., Gil, E. 2012. Anti-bacterial action of extracts and fractions from *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC (limoncillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 17(1): 35-39.
65. Pascual, R., Calderón, V. 2010. Microbiología alimentaria. Editorial Díaz de Santos. 3era edición. Madrid, España. 100-110 p.
66. Pérez, D. 2006. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 22(1): 57-67
67. Pérez, L. 2010. Hablemos de tequila.  
<http://hablemosdetequila.com/tequilapedia/?p=218>
68. Perricone, N. 2004. La promesa de la eterna juventud. Editorial Robin Book. 1era edición. Barcelona, España. 67-71 p.
69. Quirós, A., Palafox H., Robles R., González G. 2011. Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 13(3): 3-11.
70. Raaman, N. 2006. Phytochemical techniques. Agencia de Nueva Delhi. Nueva Delhi, India. 311 p.
71. Rameshkumar, K., George, V., Shiburaj, S. 2007. Chemical constituents and antibacterial activity of the leaf oil of *Cinnamomum chemungianum* Mohan et Henry. Journal of Essential Oil Research. 19(1): 98-100.
72. Rangel, D., García, I., Velazco, J., Buitrago, D., Velazco, E. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Bacharis nítida* (Ruz et Pavón) Pers. Revista de la facultad de farmacia. 42(1): 43-46.



73. Reveles, J., Reveles, O. 2012 Método para la extracción de subproductos de bagazo del *Agave azul tequilana weber*. Valdés, C. IP. Com. C12F3/100. 4667296. 26, Agosto, 2012.
74. Reyes, R., Ramírez, H., Solís, C., Ortiz, M., Coria, R. 2009. Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 51(1-2): 32-43
75. Reynoso, S., García, J., López, W., López, A. 2012. Identificación taxonómica de las especies de *Agave* utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas. Editorial Postal. 1era edición. México. 11-16 p.
76. Ricco, R., Wagner, M., Portmann, E., Reides, C., Llesuy, S., Gurni, A., Carballo, M. 2010. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippa* y *Aloysia* (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 9(5): 388-396.
77. Rizwon, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-U-Haq, M., De Feo, V. 2012. Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. *International Journal of molecular sciences*. 13(5): 6440-6451.
78. Rodríguez, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*. 44(1): 464-475.
79. Rojas, J., García, A., López, A. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 4(2): 28-32.
80. Rosas, A., Sánchez, E., García, S., Heredia, N., Bhatnagar, D. 2011. Extracts of *Agave americana* inhibit aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *World Mycotoxin Journal*. 4(1): 37-42.
81. Ruíz, G., Constantino, F., Quintana, J., Cedillo, C., Urquiza, O. 2008. Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda. *Patología veterinaria de México*. 39(2): 145-160.
82. Ruíz, G., Peña, C., Trejo, L., Sánchez, A. 2007. Reacción fisiológica del maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) a la seguía intermitente. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 23(1): 318-325.

83. Salazar, G. 2010. Taxonomic review of the *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae) complex: new taxa and neotypification.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-71512010000200008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512010000200008)
84. Santos, S., Ruíz, V., Gutiérrez, M., Jiménez, H., Aguirre C. 2006. Quiote *Agave lechuguilla*, una fuente importante como alimento nutritivo. *Revista Latinoamericana de Química*. 38(7): 11-13.
85. SIAP. 2011. Cierre de la producción agrícola por cultivo y por estado.  
[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=35](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=35).
86. Siddhapura, S., Maharshi, A., Thaker, V. 2011. Varietal difference in antifungal activity of some species of *Agave*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 44(2): 135-141.
87. Sierra, J., Vila, J. 2010. Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram positivas. *Infecciones e Inmunología*. 12(3): 23-32.
88. Srinivasan, M., Bhatia, I. 1953. The carbohydrates of *Agave Veracruz* Mill. *Bioquímica*. 56(1): 256-259.
89. Stefanello, M., Cervi, A., Ito, I., Salvador, M., Wisniewski, A., Simionatto, E. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 20(1): 75-78.
90. Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Fisiología vegetal*. Editorial Book Print. 3era edición. USA. 541-548 p.
91. Tajkarimi, M., Ibrahim, S., Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21(1): 1199–1218.
92. Taroco, R., Sejia, V., Vignoli, R. 2006. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En: Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. *Temas de bacteriología y virología médica*. 2da edición. Uruguay. Editorial FEMUR. 663-671 p.
93. Teniente-Martínez, G. González-Cruz, L., Juárez-Goiz, J., Bernardino-Nicanor, A. 2010. Cambios en la concentración de oxalato de calcio y características de sus cristales durante las etapas de desarrollo de *Agave atrovirens*. Congreso Nacional de Ingeniería

- Bioquímica. 17<sup>va</sup>, 2010. Acapulco, Guerrero. San Álvaro Azcapotzalco, México, D.F. Instituto Tecnológico de Celaya.
94. Tereschuk, M., Quarenghi, M., González, M., Baigorí, M. 2007. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de Tagetes del Noa. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 6(6):364-366.
95. Toribio, M., Oriani, D., Skliar, M. 2004. Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis* y *Centaurea calcitrapa*. Ars Pharmaceutica. 45(4): 335-341.
96. UNIBIO: colecciones biológicas. 2010.  
<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AGA1020173>
97. Vargas, C. 2009. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del *Agave mezcadero potosino (Agave salmiana)*. Tesis de posgrado, magisterial. Michoacán, México. Instituto Politécnico Nacional. 35-55 p.
98. Ventura, C., Martínez, N., Basurto, M., Pérez, R. 2010. Los compuestos esteroidales o saponinas en la planta del desierto (*Yucca shidigera*) y sus aplicaciones. Aventuras del pensamiento. 5(8): 16-18.
99. Verástegui, A., Verde, J., García, S., Heredia, N., Oranda, A., Rivas, C. 2008. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(7): 1249-1252.
100. Verduzco, J., Predo, C., Mercado, R. 2008. Caracterización e identificación taxonómica del Maguey. Producción y aprovechamiento de plantas en el noroeste de México. 4(2): 233-240.
101. Villatoro, R., Luna, L., González, A. 2010. El cuaulote, recurso herbolario de Chiapas. Revista de Cultura Científica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. 25(3): 18-26.
102. Wina, E., Muetzel, S., Becker, K. 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production. J. Agric. Food Chem. 53(21): 8093-8105.
103. Xie, Y. 2010. Scientific method. <http://arstechnica.com/science/2010/09/salmonella-causes-then-feeds-off-gut-inflammation/>
104. Yu, P., Chi, Y., Hui, C., Hsiung, Y., Kuo, C. 2009. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. Molecules. 14(1): 1789-179.

105. Yumar, E., Cabrera, L. 2012. Inhibition of *Escherichia coli* isolated from milks of bovine with subclinical mastitis using aqueous extract from the Neem leaves in Valledupar Colombia. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*. 2(2): 22-34.

