

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE COMPUESTOS DE AGAVES Y SU ACCION
SOBRE EL TIGMOTROPISMO Y DIMORFISMO DE
*Candida albicans***

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA**

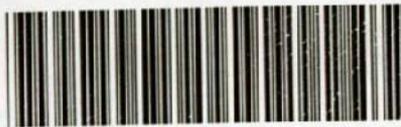
POR

M. C. MA. DE LOS ANGELES VERASTEGUI MONTEMAYOR

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

JUNIO DE 2000

TD
QR201
.C27
V4
2000
c.1



1080124490

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE COMPUESTOS DE AGAVES Y SU ACCION
SOBRE EL TIGMOTROPISMO Y DIMORFISMO DE
Candida albicans

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

POR

EL C. MA. DE LOS ANGELES VERASTEGUI MONTEMAYOR

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

JUNIO DE 2000





TF 616 DOCTORADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

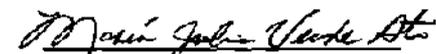
EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS DE AGAVES Y SU ACCION SOBRE EL TIGMOTROPISMO Y DIMORFISMO DE *Candida albicans*

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en ciencias con Especialidad en Microbiología por:

M.C. Ma. de los Angeles Verástegui Montemayor

**COMISION DE TESIS
APROBADA**


Dra. María Julia Verde Star
Directora de tesis


Dr. José Santos García Alvarado
Co-Director de Tesis


Dra. Azucena Oranday Cardenas
Asesora


Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Asesora


Dra. Catalina Rivas Morales
Asesora

San Nicolás de los Garza, N.L.

Junio 2000

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
COMPUESTOS DE AGAVES Y SU ACCIÓN SOBRE EL
TIGMOTROPISMO Y DIMORFISMO DE
*Candida albicans***

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica y en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Ma. Julia Verde Star, la co-dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría de la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, Dra. Norma Laura Heredia Rojas y Dra. Catalina Rivas Morales.

Para realizar este trabajo de investigación y obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología, la tesista recibió el beneficio de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 113521 (CONACYT).

DEDICATORIAS

A MI ESPOSO: Enrique Castro Silva.

Por la confianza, paciencia y comprensión que siempre me brindó. El tiempo que no pude dedicarle y que nunca reclamó fue una demostración de su apoyo y cariño.

A MIS HIJAS: Heidi y Marian.

Por haber sido mi mayor motivación, pero sobre todo por darme la oportunidad de superarme y sentirme realizada completamente como ser humano. Las amo.

A MI MADRE: Lila Montemayor de Verástegui.

Por la semilla que sembró en mi de superación constante y por ser el pilar de una familia llena de amor y unidad.

A MI PADRE: Augusto Verástegui Guillén (†).

Por su imborrable recuerdo y por brindarme la oportunidad de poseer una familia luchadora con grandes valores morales.

A MIS HERMANOS: Hilda, Adela, Myrna, Augusto, Ramón, Jorge, Mario, Raul e Hilda Alicia

Por su invaluable apoyo, estímulo y gran cariño que prodigaron en mis momentos difíciles haciendome ver que la vida es un reto a seguir.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterno agradecimiento a:

Dra. Ma. Julia Verde Star.

Por creer en mí, por su apoyo constante para la realización de este trabajo y por demostrarme su gran calidad humana con su peculiar manera de ver la vida tan optimista.

Dr. José Santos García Alvarado.

Por su interés en la superación integral de sus asesorados proporcionando confianza amistad y consejos profesionales que me motivaron a seguir adelante.

Dra. Azucena Oranday Cardenas.

Por sus valiosas enseñanzas, pero sobre todo por su amistad incondicional en la que me apoye muchas veces cuando mis fuerzas flaquearon.

Dra. Norma Laura Heredia Rojas.

Por su paciencia y disponibilidad en todo momento y su saludable hábito de trabajar con disciplina y orden lo que redituó en un mejor resultado.

Dra. Catalina Rivas Morales.

Por sus acertadas críticas y sugerencias que apliqué en mi trabajo aumentando la calidad del mismo.

M.C. Genoveva Alvarez Ojeda.

Por su gran amistad que perdura a través del tiempo y la distancia.

M.C. Jorge Armando Verduzco Martinez.

Por su valiosa participación en la colecta y clasificación de las plantas estudiadas.

A mis compañeros.

Por que me ayudaron a salir adelante formando un equipo de trabajo

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento por siempre a:

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Por abrirme sus puertas y permitirme hacer mi trabajo de investigación en sus instalaciones.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Por brindarme su apoyo para utilizar el equipo del Laboratorio de Genética y Bioquímica de los Microorganismos y el Laboratorio de Fitoquímica

DIVISION DE POSTGRADO

Por las facilidades otorgadas en toda ocasión que se requirió obtener documentación, información o apoyo financiero.

CONACYT

Por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de investigación.

INDICE

Página de título	I
Comisión de tesis	II
Localización	III
Dedicatoria y Agradecimientos	IV
Indice	VII
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	XI
Abreviaturas y simbología	XII
Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCION	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Antecedentes <i>Candida</i>	16
2.2. Antecedentes agaves	21
2.2.1 Clasificación familia <i>Agavaceae</i>	21
2.2.2. Descripción botánica de agaves	23
2.2.3. Antecedentes saponinas	26
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	34
3.1. Hipótesis	34
3.2. Objetivo general	34
3.3. Objetivos particulares	34
4. MATERIAL Y METODOS	35
4.1. Microorganismos	35
4.2. Material vegetal	37
4.3. Bioensayos	37
4.3.1. Bioensayo preliminar	37
4.3.2. Concentración mínima inhibitoria	38
4.3.3. Detección bioautográfica	39
4.3.4. Inhibición del dimorfismo de <i>C. albicans</i>	40
4.3.5. Inhibición del tigmotropismo de <i>C. albicans</i>	41
4.4. Microscopía	42
4.4.1. Microscopía electrónica	42
4.4.2. Método rápido de deshidratación	43
4.4.3. Microscopía de fluorescencia	43
4.5. Preparación extractos	44
4.5.1. Maceración	44
4.5.2. Reflujo	44

4.6. Métodos de aislamiento e identificación	44
4.6.1. Cromatografía en capa delgada	44
4.6.2. Cromatografía en columna invertida	46
4.6.3. Cromatografía en columna normal	46
4.6.4. Pruebas químicas de identificación	47
4.6.5. Revelado en placas con agentes cromogénicos	48
4.7. Espectroscopía	50
4.7.1. Infrarrojo	50
4.7.2. Ultravioleta	50
4.7.3. Resonancia magnética nuclear	50
4.7.4. Espectrometría de masas	50
5. RESULTADOS	51
5.1. Actividad biológica	51
5.1.1. Cuantificación de microorganismos en estudio	51
5.1.2. Análisis preliminar de inhibición	51
5.1.3. Concentración mínima inhibitoria	53
5.1.4. Inhibición del dimorfismo de <i>C. albicans</i>	54
5.1.5. Inhibición del tigmotropismo de <i>C. albicans</i>	57
5.1.6. Detección bioautográfica del compuesto activo	58
5.2. Separación cromatográfica de los extractos	59
5.2.1. Cromatografía en capa delgada	60
5.2.2. Pruebas químicas positivas con el compuesto activo	61
5.2.3. Revelado cromatográfico	62
5.2.4. Análisis hemolítico	63
5.2.5. Aislamiento del compuesto activo	64
5.3. Resultados espectroscópicos	65
5.3.1. Desplazamiento protónico	66
5.3.2. Análisis generales espectroscópicos de <i>A. lecheguilla</i>	68
5.3.3. Análisis generales espectroscópicos de <i>A. picta</i>	69
5.3.4. Análisis generales espectroscópicos de <i>A. scabra</i>	70
5.3.5. Análisis generales espectroscópico de <i>A. lophanta</i>	71
5.3.6. Estructura básica del compuesto activo	72
6. DISCUSION	73
7. CONCLUSIONES	78
8. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION	79
9. LITERATURA CITADA	80
9. ANEXO ESPECTROS AGAVES	91

LISTA DE FIGURAS

1.- Agaves de la región Noreste de México-----	22
2.- Estrategia analítica general-----	37
3.- Efecto de los extractos de agave sobre el dimorfismo de <i>C. albicans</i> . Microscopía electrónica y óptica. Dosis intermedias-----	55
4.- Efecto de los extractos de agave sobre el dimorfismo de <i>C. albicans</i> Microscopía electrónica y óptica. Dosis inhibitorias-----	56
5.- Efecto de los extractos de agave sobre el tigmotropismo de <i>C. albicans</i> Microscopía óptica. 40 aumentos. -----	57
6.- Efecto de los extractos de agave sobre el tigmotropismo de <i>C. albicans</i> Microscopía óptica. Dosis inhibitoria-----	57
7.- Detección bioautográfica de la fracción activa de <i>A. lophanta</i> expuesta con la inhibición de <i>C. albicans</i> -----	58
8.- Separación cromatográfica del extracto de <i>A. lecheguilla</i> usando como eluentes cloroformo-metanol-----	60
9.- Revelados cromatográficos que demuestran la presencia de grupos funcionales que integran la molécula del compuesto activo-----	61
10.- Localización hemolítica de las saponinas esteroidales espiroestánicas con sangre humana aspergada sobre el cromatograma-----	63
11.- Purificación parcial del compuesto activo por pases en columna invertida utilizando como eluentes cloroformo - metanol-----	64
12.- Estructura básica del compuesto responsable de la actividad antimicrobiana en los cuatro extractos de agaves-----	72
13.- Espectros agaves-----	91

LISTA DE TABLAS

1.- Cuantificación de microorganismos que presentaron actividad biológica-----	51
2.- Actividad antimicrobiana de los extractos de agaves sobre los microorganismos-----	52
3.- Concentración mínima inhibitoria de los extractos de agave-----	53
4.- Separación cromatográfica del compuesto activo de los extractos de agave-----	59
5.- Pruebas químicas de grupos funcionales positivas con los extractos de de agave-----	61
6.- Agentes cromogénicos positivos con los extractos de agave-----	62
7.- Desplazamiento químico protónico del compuesto activo en ¹ HNMR--	66
8.- Resultados de los análisis espectroscópicos de <i>A. lecheguilla</i> Torr.-----	68
9.- Resultados de los análisis espectroscópicos de <i>A. picta</i> Salm-Dick.-----	69
10.- Resultados de los análisis espectroscópicos de <i>A. scabra</i> Salm-Dick.--	70
11.- Resultados de los análisis espectroscópicos de <i>A. lophanta</i> Schdiele.--	71

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

ATP -----	Adenintrifosfato
ATCC -----	American Typical Culture Collection
PDA -----	Papa Dextrosa Agar
CAM -----	Metabolismo ácido craculáceo
CO ₂ -----	Dióxido de carbono
CMI -----	Concentración mínima inhibitoria
cm ² -----	Centímetro cuadrado
CCD -----	Cromatografía en capa delgada
CCP -----	Cromatografía preparativa
CCI -----	Cromatografía en columna invertida
CC -----	Cromatografía en columna normal
CPPF -----	Ciclopentanoperhidrofenentreno
C -----	Carbono
cm ⁻¹ -----	Centímetro a la menos uno
CH ₃ -----	Metilo
2D-RMN -----	Resonancia magnética nuclear en dos dimensiones
δ -----	Unidad espectrofotométrica
E -----	Energía
Et al -----	Colaboradores
EM -----	Espectrometría de masas
g -----	Gramo
°C -----	Grado centígrado
h -----	Hora
HPLC -----	Cromatografía líquida de alta presión
H -----	Hidrógeno
HCl -----	Acido clorhídrico
ICC -----	Infusión cerebro corazón
IPA -----	Indice de productividad ambiental
IR -----	Infrarrojo
Km ² -----	Kilómetro cuadrado
Kg -----	Kilogramo
KMnO ₄ -----	Permanganato de potasio
λ -----	Longitud de onda

ME -----	Microscopía electrónica
m/e -----	Masa-carga
µl -----	Microlitro
µg -----	Microgramo
MB -----	Megabait
ml -----	Mililitro
mg -----	Miligramo
mm -----	Milímetro
min -----	Minuto
PM -----	Peso molecular
mRNA -----	Acido ribonuléico mitocondrial
nm -----	Nanómetro
NaOH -----	Hidróxido de sodio
OH -----	Hidroxilo
ppm -----	Partes por millón
pH -----	Potencial hidrógeno
% -----	Por ciento
¹ HRMN -----	Resonancia magnética nuclear del hidrógeno
¹³ CRMN -----	Resonancia magnética nuclear del carbono
Rf -----	Relación de frentes
UV -----	Ultravioleta
UDP -----	Uridinfosfato
UFC -----	Unidad formadora de colonia
VIH -----	Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Los reportes que surgen de resistencia microbiana son cada día más frecuentes por lo que es evidente la importancia de nuevas opciones terapéuticas. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos provenientes de la familia *Agavaceae* así como determinar la concentración mínima inhibitoria del crecimiento, evaluar su efecto en procesos metabólicos de *Candida albicans*, separar el metabolito activo e identificar el compuesto responsable de la inhibición microbiana.

Se seleccionó a la Familia *Agavaceae* por su gran adaptabilidad ecológica y por ende su gran abundancia. Las cuatro especies seleccionadas crecen en la región noreste de México. Se probó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Agave lecheguilla* Torr, *A. picta* Salm-Dick, *A. scabra* Salm-Dick, *A. lophanta* Schdieler, sobre 15 especies microbianas: 6 de origen fúngico y 9 especies bacterianas. Los hongos mostraron mayor sensibilidad.

Debido a la importancia en salud pública de *Candida albicans*, se decidió profundizar en el efecto de los compuestos activos sobre la levadura. En este trabajo se demostró la inhibición del tigmotropismo, dimorfismo y gemación de esta levadura, los cuales son estrategias moleculares que la capacitan para invadir tejidos y generar enfermedades graves sobre todo en pacientes inmunosuprimidos

Los extractos se sometieron a análisis químicos, cromatográficos y espectroscópicos, los cuales mostraron que el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana es una saponina esteroideal espirostánica. La diferencia del compuesto activo entre las especies de *Agave* se encontró en la clase y cantidad de unidades glucosídicas unidas al núcleo principal, que es el ciclopentanoperhidrofenantreno.

ABSTRACT

Reports on microbial resistance to antibiotics are continuously increasing every day. Thus, it is evident the importance of finding new therapeutic options. The principal objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of extracts from desertic plants of the Chihuahuan desert. Also, to determine the MIC, separate the active metabolites and the chemical identification of the compound responsible of the microbial inhibition.

The Agavaceae family was selected for its large ecological adaptability and its great abundance. The four selected species of *Agave* grow in the northeastern region of Mexico. Extracts of *Agave lechuguilla*, *Agave picta*, *Agave scabra* y *Agave lophanta*, were analyzed against 15 microbial species; (6 fungi and 9 bacteria). Fungi were more sensitive than bacteria:

The morphogenetic changes of *Candida albicans* are multifactorial, and the molecular strategies of this yeast activate mechanisms that facilitate the invasion of tissues, generating serious diseases, particularly in immunocompromised patients. Some of the extracts analyzed showed anticandidal activity. Inhibition of thigmotropism and dimorphism of this yeast by the extracts, was demonstrated by electronic, optic and fluorescence microscopy

The extracts were subjected to chemical, chromatographic and spectroscopical analysis, to isolate and characterize the compound responsible of the antimicrobial activity. It resulted to be a steroidal spirostanic saponin. Differences in the structure of the active compound between the species of *Agave* were found. These were the kind and amount of sugar substituents joining the principal nucleus ciclopentenoperhidrofenentren.

1. INTRODUCCION

Los avances tecnológicos como trasplantes de órganos, quimioterapia del cáncer, alimentos conservados con productos sintéticos o el crecimiento hormonal inducido en animales de consumo humano, ha beneficiado a la humanidad pero también ha generado el aumento en la población inmunocomprometida y por lo mismo, el riesgo a infecciones por microorganismos oportunistas. Un ejemplo clásico lo tenemos en *Candida albicans* que vive como comensal en el organismo humano. Al romperse el equilibrio inmunológico adquiere un papel patógeno apoyado en su cambio morfológico (dimorfismo) que consiste en pasar de su forma de levadura (unicelular) a micelio (pluricelular) lo cual favorece la adhesión (tigmotropismo) de las hifas a superficies sólidas y así se favorece la instalación de este hongo en tejidos para producir enfermedades fúngicas generalmente graves. Los factores que intervienen en la activación de estos fenómenos fúngicos aún no se conocen exactamente pero múltiples estudios al respecto sugieren que el pH, la temperatura, la producción enzimática y la genética están involucrados (Nikawa 97). Aún cuando las especies de *Candida* están creciendo en importancia dentro del campo médico, las interacciones hongo-huésped son pobremente entendidas y constituye un reto para los micólogos, aclarar el cambio morfológico y como inhibirlo o interrumpirlo

Por otro lado las enfermedades alimentarias causadas por contaminación microbiana son un serio problema que sucede frecuentemente en casos aislados o verdaderas intoxicaciones masivas. Actualmente se recomienda utilizar aditivos provenientes de plantas por su estabilidad bioquímica ya que se ha reportado el efecto cancerígeno de algunos de estos productos químicos (Chung 90).

El ritmo demográfico acelerado en nuestro país nos presiona cada vez más y hace necesario el conocimiento preciso de los recursos naturales para su aprovechamiento en diferentes áreas como la alimenticia, ganadera, agrícola o farmacéutica. Las aportaciones provenientes de la riqueza florística son innumerables, los estudios microbiológico y fitoquímico constituyen un punto vital para comprobar suposiciones biogenéticas. Además, esto nos podría conducir a desarrollos de derivados sintéticos con aplicaciones múltiples.

La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de la gente que vive en países en desarrollo utilizan casi exclusivamente la medicina tradicional. Esto indica que 3,300 millones de personas usan plantas medicinales. En 1984 el 25% de las drogas prescritas utilizadas en USA y Canadá fueron derivados de productos naturales (Eloff 1998).

El hombre mediante cuidadosas observaciones registró los efectos de las plantas medicinales heredando a la humanidad un tesoro invaluable que constituye la hipótesis etnobotánica. El conocimiento herbolario de la medicina tradicional que posee la población puede ser compatible con la medicina oficial si se compagina con una adecuada investigación fitoquímica. La selección de una planta basada en su uso etnomédico es un criterio importante además de un factor predictivo, utilizado en la identificación de nuevos agentes antinfectivos. Al introducirnos en la búsqueda de nuevos recursos terapéuticos de origen vegetal debemos apoyarnos en esta hipótesis etnobotánica, que es un cúmulo de experiencias de nuestros antepasados que hicieron de las plantas sus laboratorios ofreciéndonos un futuro prometedor en el campo médico (Greulach 1970).

Se estima que solo el 5 a 15% de las 250,000 especies de plantas superiores que existen en el planeta, han sido estudiadas sistemáticamente para determinación de productos activos biológicos.

La demanda de nuevos y efectivos agentes antimicrobianos para terapia de infecciones producidas por microorganismos es bien conocida por infinidad de reportes que surgen de todo el mundo referentes a la resistencia generada en los organismos blanco. Los datos farmacocinéticos indican la poca o nula actividad de muchos medicamentos que requieren sean sustituidos. Por tal motivo en este trabajo se buscan alternativas de nuevos compuestos con actividad biológica que cumplan con las necesidades actuales.

2. ANTECEDENTES

La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas resulta importante debido a la resistencia que se puede generar a los medicamentos. Los actuales antimicrobianos están lejos de haber alcanzado un alto grado de éxito ya que no son tan específicos para el invasor sino que juegan un equilibrio precario en su acción con bloqueos metabólicos al propio huésped lo que conduce con frecuencia a efectos colaterales indeseables. No son muy efectivos para todo el espectro de microorganismos lo que limita su acción.

Existe actualmente gran demanda de nuevas opciones terapéuticas que puedan solucionar los actuales problemas de resistencia, toxicidad y costo excesivo de los actuales medicamentos que constituyen un importante problema de salud en países subdesarrollados. Aunque en las últimas décadas se han realizado notables esfuerzos, el cuadro terapéutico continua siendo limitado. Además los factores predisponentes a la inmunosupresión se han multiplicado incrementando el número de infecciones microbianas. En México existe la costumbre de utilizar plantas para solucionar problemas de salud, además la flora en nuestro país es única ya que todos los biomas descritos en la superficie de este planeta están representados en sus 2 millones de km² de extensión territorial, los cuales contienen un terreno accidentado con una complicada topografía que origina un mosaico climático que redundando en una gran variedad florística (Rzedowski 1986). De las 3,000 especies de plantas medicinales reportadas, Ferraro- Gonzalez en 1888 asegura que 300 se desarrollan en la región noreste de México y de ellas solo el 10% se han estudiado científicamente.

Una de las plantas más estudiadas por su actividad antimicrobiana es sin duda *Allium sativum*. Pasteur en el siglo pasado ya conocía su extraordinario potencial biológico. Existen

muchos trabajos hechos sobre esta planta o sus derivados y se ha comprobado su actividad sobre muchos microorganismos. Johnson en 1969 demostró su actividad sobre *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. De Witt en 1978 demostró el efecto de esta planta sobre la toxina de *Clostridium botulinum*.

Yashphe en 1979 estudió las partes aéreas de *Artemisia herba alba*, una planta que crece en el norte y medio este de Africa. El aceite de la planta inhibió el crecimiento de 5 especies bacterianas gram positivas y gram negativas. El extracto fue separado por cromatografía en columna y las fracciones fueron sometidas a exámenes antibacterianos. De las 5 fracciones, la número tres mostró ser la responsable de la actividad antibacteriana que se identificó como una alcohol santonina por espectroscopía en IR y RMN.

Los extractos gálicos también los estudió Saleem en 1981 sobre *Bacillus cereus*. En 1985 Delaha demostró la inhibición de micobacterias con el extracto gálico. Koch en 1986 hizo un estudio comparativo de técnicas de conteo con fluorescencia y por hematocitómetro para hacer una evaluación microbiológica de bebidas como agua, jugo de uva, de naranja y refresco de cola los cuales fueron inoculados con las levaduras: *Sacharomyces*, *Candida*, *Pichia Trichosporum* y *Criptococcus*. Los resultados indicaron que la técnica de fluorescencia es mejor por su rapidez y además por que se pueden analizar muestras grandes.

Balandrin en 1985 nos muestra el peligro que existe con la desaparición de plantas silvestres debido al incremento demográfico que conlleva el deterioro ambiental. Aunque también nos muestra el camino de la esperanza apoyándose en nuevas tecnologías enfocada a los cultivos celulares vegetales que nos proporcionaran una nueva alternativa en la agricultura tradicional para la producción industrial de metabolitos secundarios. Se estima que solo el 5 o 15% de las 750,000 especies de plantas que existen, han sido investigadas por su actividad

biológica, lo que indica la indiferencia hacia esta inmensa fuente de nuevos compuestos orgánicos biológicamente activos.

Toda en 1988 investigó los granos de café y hojas de té, los cuales fueron pulverizados y suspendidos en solución buffer de fosfatos. Se estudió la actividad antibacteriana de los extractos por el método de difusión, sobre 24 especies bacterianas que causan enfermedades diarreicas. El potencial más elevado lo mostró el extracto de Té, al inhibir 14 de las especies probadas, entre ellas *Vibrio cholerae*. La caracterización parcial sugiere que los taninos son los responsables de la actividad antibacteriana.

Sakanaka en 1989 analizó los extractos del té verde japonés. Demostró la actividad antibacteriana con método de difusión sobre una bacteria que produce caries (*Streptococcus mutans*). La separación del extracto se hizo con cromatografía en columna y la purificación por HPLC. La identificación del compuesto activo se llevó a cabo por espectroscopía en IR y RMN. Además se realizó espectrometría de masas acoplada a espectrometría de gases. Los compuestos fenólicos fueron los responsables de la inhibición.

Davis en 1990 administró intravenosamente el extracto para resolver casos de meningitis originada por *Cryptococcus neoformans*. La actividad antifúngica también fue estudiada por Holt en 1994 sobre *Alternaria* que contamina los tomates y su estudio se llevó a cabo tanto *in vivo* sobre la planta como *in vitro*.

San Blas en 1990 hizo un análisis sobre los medicamentos utilizados en Micología y menciona que contrario a lo ocurrido en la terapia bacteriana, los avances en el tratamiento de enfermedades micóticas han sido lentos. Los antibióticos de uso más común en micología actúan a nivel de la membrana plasmática como los polienos y los derivados imidazólicos lo que conduce a una resistencia para ambos medicamentos. El precario equilibrio enzimático de los azoles, alilaminas y los tiocarbamatos además de los efectos nocivos de los polienos,

estimulan el desarrollo de nuevas líneas de investigación en esta área. Naganawa en 1996 estudió los compuestos azufrados derivados del ajo sobre bacterias Gram+ y Gram -. Moore en 1977 demostró la actividad antifúngica de un extracto acuoso gárico sobre levaduras de importancia médica asociadas a vaginitis.

La actividad antimicrobiana de extractos de muchas plantas utilizadas como saborizantes en alimentos y bebidas, se conoce desde hace siglos. Conner en 1984 hace una revisión sobre estos productos incluyendo: canela, clavo, pimienta, orégano, mejorana, laurel, pimienta, cilantro, anís, menta, comino, apio, romero, ajo, cebolla, cocoa etc. Los extractos de cada producto se probaron sobre microorganismos que contaminan los alimentos y los resultados demuestran que la mayoría poseen actividad antimicrobiana.

Crombie en 1986 encontró que las avenacinas provenientes de la avena tienen efecto antifúngico. Especies fúngicas que atacan las raíces de estas plantas (*Goumanomyces*, *Fusarium* y *Phialophora*) fueron inhibidos *in vitro*. La evidencia directa experimental indica la deglucosilación de la avenacina A1 lo que hace aumentar su toxicidad.

Polacheck en 1986 aisló un compuesto con actividad antimicótica a partir de las raíces de alfalfa (*Medicago sativa*). Se probó sobre 10 diferentes tipos de levaduras de importancia médica. La CMI fué de 5- 15µg/ml. El compuesto G₂ inhibió 9 de las 10 levaduras. El compuesto responsable de la inhibición es una saponina esteroideal. Se utilizó el método de dilución para demostrar la actividad biológica. Al estudiar la acción hemolítica del compuesto G₂ se observó que no hay efectos negativos aun a concentración de 500 µg/ml.

Un método práctico y rápido que proporcionó una detección directa de la actividad antimicrobiana fue utilizado en 1987 por Hamburger y su equipo al cual denominaron bioautografía. Consiste en la combinación de un cultivo microbiano sobre un cromatograma y

las zonas de la actividad antimicrobiana fueron visualizadas usando colorantes adecuados como las sales de tetrazolium. Ellos trabajaron con *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Este equipo además hizo un estudio comparativo con las tres técnicas de sondeo antimicrobiano: difusión, dilución y bioautográfico.

Fueron estudiadas 81 plantas del área española del mediterráneo por Rios y Recio en 1987, para dar una base científica al conocimiento empírico. Los 162 extractos obtenidos por maceración se probaron sobre 6 microorganismos por el método de dilución. Se localizó el compuesto responsable por bioautografía. En la cromatografía se utilizó como solventes el cloroformo y metanol (9:1) Los resultados demostraron el potencial antimicrobiano de 30 extractos a los cuales se les determinó su MIC. Los mismos autores en 1989 hicieron una revisión de los 3 principales métodos para el estudio de plantas medicinales y mencionan los múltiples factores (volumen del inóculo, composición del medio del cultivo, pH, temp) que pueden influir en los resultados. Demostraron también las ventajas y limitaciones de cada método. Mencionan además el mecanismo de acción 40 terpenóides y llegan a la conclusión que pueden interferir en la actividad enzimática, fosforilación oxidativa y el flujo electrónico respiratorio.

Chung en 1990 estudió los efectos de los extractos de 6 plantas chinas sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Tres de los extractos inhibieron a la bacteria que se hizo crecer en jugo de repollo. El extracto No. 68 inhibió el 100% de las células bacterianas a los 5 días con una dosis de 500µg/ml. Esto nos indica que los alimentos pueden preservarse con compuestos naturales como aditivos ya que este trabajo muestra la evidencia de ello.

El jugo de repollo también ha sido motivo de estudio. Chung en 1990 demostró también su actividad sobre 12 especies de microorganismos que producen desórdenes

gastrointestinales o enfermedades alimentarias al contaminar alimentos de consumo humano. Se utilizó la técnica de difusión con orificios, dentro de los cuales se agregó el jugo de repollo.

Las micro y macrotécnicas de dilución fueron analizadas en un estudio comparativo hecho por Manavathu en 1990. Estudió todos los factores que influyen en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Los efectos del tamaño del inóculo, medio de cultivo, temperatura y periodo de incubación son de vital importancia para determinar la CMI. Estos estudios se llevaron a cabo en antifúngicos conocidos: fluoconazol, ketoconazol, miconazol, itraconzol y nifotericina B y los microorganismos probados fueron diferentes especies del género *Aspergillus*.

March en 1991 investigó la actividad antimicrobiana de 22 especies de plantas colectadas en la comunidad valenciana de España. Se probaron con 9 especies fúngicas y 6 especies bacterianas. Los resultados mostraron la mayor sensibilidad en los hongos seleccionados y el extracto más efectivo contra las bacterias fue el de *Inula dysenterica* al inhibir el crecimiento de las 6 especies seleccionadas.

Proteínas provenientes de las semillas de cebada con propiedades antifúngicas fueron caracterizadas molecular y bioquímicamente por Leah en 1991. Dichas proteínas en forma sinérgica inhiben el crecimiento de los hongos *Fusarium*, *Cladosporium* y *Trichoderma*. Las proteínas glucanasa, quitinasa y una proteína inactivadora del ribosoma actúan como mecanismo de defensa para proteger a la planta de posibles infecciones por patógenos. Con hibridaciones Northern demostraron las diferencias del mRNA acumulado durante la germinación y desarrollo de la semilla y con hibridaciones Southern mostraron que las 3 proteínas son codificadas por pequeñas familias de 3 a 8 genes.

Adikaram en 1992 trabajó con *Colletotrichum gleosporoides* que causa enfermedad postcosecha en el aguacate (*Persea americana*). El fruto en el árbol no presenta señales de

infección, sin embargo después de la cosecha aparecen lesiones. Se analizó la cascara del aguacate y se encontraron compuestos alifáticos que mostraron actividad antifúngica. Se dedujo que al separar el fruto del árbol el metabolismo se interrumpe y los compuestos se pierden. Los bioensayos se hicieron por el método bioautográfico y la estructura del compuesto se determinó por análisis espectroscópicos en RMN y MS.

La importancia de la unión éster entre el ácido gálico y la glucosa para formar ácido tánico o propanol para formar propil galato lo analizó Chung en 1993. Estos compuestos poseen actividad antimicrobiana y se atribuye a la unión éster con azúcares. El ácido tánico inhibió el crecimiento de las 15 bacterias probadas en una concentración de 5 mg/ml. El propil galato inhibió 12 de las 15 especies bacterianas seleccionadas.

McCutcheou en 1994 utilizaron métodos de dilución y difusión para buscar la actividad antifúngica de 100 extractos metanólicos de plantas que son utilizadas por los aborígenes de la colonia British Columbian. Los resultados mostraron que el 81% de los extractos fueron activos contra al menos una de las 9 especie fúngicas seleccionadas.

Irobi y Daramola en 1994 trabajaron con hojas e inflorescencias de *Mitracarpus vellosus*. Los extractos crudos se probaron sobre 6 bacterias con métodos de dilución y difusión. La inhibición se observó en cuatro de las especies seleccionadas. La concentración mínima inhibitoria tuvo un promedio de 0.6 a 8.0 mg/ml. Los extractos etanólicos mostraron mayor potencial antibacteriano que el extracto acuoso.

Kandil en 1994 detectó la presencia de saponinas, flavonoides, aceites esenciales y resinas en los extractos etanólicos y acuosos de *Thymus capitatus*. Este trabajo se apoyó en la hipótesis etnobotánica como factor predictivo en la identificación de nuevos agentes antiinfectivos. Los resultados mostraron que esta planta tiene compuestos antimicrobianos.

Ibrahim en 1994 investigó la actividad antimicrobiana de las hojas de *Cassia alata* sobre 8 especies de bacterias, 3 levaduras y 9 hongos. La inhibición se demostró por el método de difusión con discos y la CMI por el método de dilución. Los resultados muestran la mayor sensibilidad en los dermatofitos y la resistencia de las bacterias y levaduras. Se sospechó que el mecanismo de acción se ejerció en la membrana celular por la morfología irregular y no rígida que presentaron las macroconidias de los dermatofitos.

Babic en 1994 demostró la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de zanahoria. Las bacterias estudiadas fueron microorganismos que contaminan los alimentos. La evaluación se llevó a cabo en zanahoria rallada empaquetada y sin empaquetar. Las muestras se almacenaron a 4°C. Se examinaron durante 7 días. Las bacterias gram positivas fueron más sensibles a la inhibición en concentraciones de 27.5 y 55 mg/ml, no así los gram negativos que requirieron 110 a 220 mg/ml. Los compuestos fenólicos (ac. clorogénicos y ac. p-hidroxibenzoico) fueron los responsables de la inhibición. La zanahoria empaquetada mostró el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* tal vez porque se produjeron compuestos nutritivos para la bacteria formados durante la senescencia de la zanahoria.

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

Tanina en 1994 estudió el potencial terapéutico de la flora de los Emiratos Arabes Unidos. Los 21 extractos se evaluaron por el método de dilución y 10 mostraron actividad antibacteriana. Los extractos se sometieron a pruebas químicas y mostraron la presencia de terpenos o esteroides en todos. La mayoría posee flavonoides, alcaloides y taninos. Solo

Calotropis procera reveló la presencia de glicósidos cardíacos y ningún extracto posee antraquinonas.

Taylor en 1995 analizó 21 plantas utilizadas en la medicina tradicional de Nepal, sobre 8 especies bacterianas y 5 especies fúngicas. El método de difusión con discos mostró que todos los extractos tuvieron actividad al menos con 2 especies bacterianas. *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* no fueron inhibidas por ningún extracto. Los extractos fueron expuestos a luz UV y se observó que 14 de ellos incrementaron su potencial antimicrobiano.

Zohri en 1955 observó el efecto del aceite de cebolla sobre 8 especies bacterianas y 9 especies fúngicas. Las especies bacterianas gram positivas mostraron mayor sensibilidad que las gram negativas. Además se estudió el efecto inhibitorio de toxinas en diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium*.

Vlietinck en 1995 determinó la actividad antimicrobiana y antiviral de 100 plantas medicinales utilizadas en Rwanda. Los microorganismos probados fueron 3 especies bacterianas, 3 especies fúngicas y 5 especies virales que con métodos de dilución y difusión demostraron la mayor sensibilidad en las bacterias gram positivas y los dermatofitos. Solo dos especies de plantas fueron activas contra *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* y *C. albicans*.

La actividad antimicrobiana del árbol *Vochysia divergens* que crece en los pantanos de Mato Grosso en Brasil lo estudió Hess en 1995. Su uso en la medicina folklórica es contra infecciones microbianas y asma. Los 3 compuestos con actividad antimicrobiana fueron β sitosterol, ácido betulínico y ácido serícico. Este último mostró el potencial activo más fuerte. La elucidación estructural se basó en la comparación de datos físicos y espectrales (IR, RMN y EM). De los 4 microorganismos probados solo *E. coli* mostró ser resistente.

Meyer en 1995 analizó el efecto antimicrobiano de *Helichrysum aureoniteus*. Se hicieron diferentes extractos (diclorometánico, metanólico y acuoso). Al inhibir 5 de las 10 bacterias probadas el extracto diclorometánico demostró ser el de más amplio espectro. El extracto acuoso no inhibió ninguna bacteria.

La parte aérea de *Lychnophora salicifolia* es utilizada en la medicina tradicional contra enfermedades inflamatorias. Esta planta comúnmente llamada "Arnica" la analizó Miguel en 1996. Los compuestos con actividad antimicrobiana aislados fueron el ácido licnofólico y el ácido acetil licnofólico los cuales se probaron sobre 2 especies bacterianas y 7 especies fúngicas. Se utilizó la técnica de difusión con orificios y como estandar se usó Ketoconazol. Para determinar la CMI también utilizaron la técnica de difusión pero con discos impregnados con el extracto. El ácido acetil licnofólico exhibió mayor potencial antifúngico y antimicrobiano aunque *E. coli* mostró ser resistente. La esteroquímica de los compuestos fue determinada por análisis de difracción de rayos X.

Mukherjee en 1996 examinó la actividad antifúngica de los extractos crudos alcohólicos de *Cassia tora* sobre *C. albicans*, *A. niger*, *S. cereviceae* y *T. mentagrophytes*. Los efectos antifúngicos se compararon con Griseofulvina como control. Los extractos mostraron inhibición significativa contra todos los microorganismos probados. Su toxicidad ha sido evaluada en ratones de laboratorio. Se aisló de las hojas de esta planta un antraquinona responsable de la actividad antimicrobiana.

Varias plantas utilizadas en la medicina tradicional de Irán fueron examinadas por Mahasneh en 1996. Se analizaron los extractos crudos sobre 4 especies de bacterias, una levadura y un hongo filamentoso. Los resultados mostraron una actividad antimicrobiana comparable a la del estándar utilizado (griseofulvina) y las plantas *Sauceda vermiculata* y *Salsola villosa* mostraron mayor actividad contra *C. albicans* y *F. oxysporum*.

Ulate-Rdz en 1997 determinaron el efecto antimicrobiano de extractos provenientes de la lima, limón y pastinaca, sobre tres microorganismos en un sistema alimenticio modelo. Para separar el compuesto activo se practicó cromatografía en capa delgada, el cual fue identificado por espectrometría de masas acoplada a espectrometría de gases. Se utilizó alimento de bebé como sistema alimentario modelo el cual fue inoculado con los tres microorganismos. Las furanocumarinas lineares fueron los compuestos activos que inhibieron a *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Micrococcus luteus*.

Hili en 1997 demostró la actividad antimicrobiana de 51 aceites esenciales provenientes de plantas utilizadas como saborizantes alimenticios, sobre 3 especies bacterianas y 4 especies levaduriformes. Todos los aceites mostraron actividad inhibitoria contra alguno de los microorganismos. Trece de los aceites inhibieron al menos 5 microorganismos. Las levaduras presentaron mayor sensibilidad.

Balalayev en 1997 analizó las semillas de *Leusea carthamoides* y encontraron un compuesto fitoecdisteroide que purificaron con cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y caracterizaron por espectroscopía en UV, NMR y MS. El ecdisteroide es un análogo de una hormona esteroideal de insecto. Los bioensayos se hicieron con *Drosophila melanogaster*.

Reixach en 1997 estudió la producción de fitoecdisteroides de *Polypodium vulgare*. La producción de estos compuestos se incrementó cuando los cultivos fueron sumergidos en agua, además la temperatura fue otro factor que intervino en la producción. A 25°C se registró una sobreproducción de 20% y a 45°C un 97%. La presencia de agua a temperatura de 45°C durante 10 h incrementó de 14 a 23 veces la producción total de ecdisteroides. Los resultados indican que la planta acelera la biosíntesis del compuesto al diluirse en agua, por lo que se requiere restaurar los niveles intracelulares normales.

Atta-Ur-Rahman en 1997 analizó un pequeño arbusto *Withania coagulans* que se ha utilizado contra desordenes intestinales y su actividad biológica se le atribuye a compuestos llamados withanólidos (lactonas esteroidales). Los compuestos fueron separados por cromatografía en columna y capa delgada. Su identificación se hizo por medio de análisis espectroscópicos incluyendo IR, 2D RMN y MS.

Eloff en 1998 buscó el extractante óptimo ya que es un punto clave en los estudios fitoquímicos. En este trabajo utilizaron 5 solventes (acetona, metanol, cloroformo, diclorometano, y agua), a los cuales se les cuantificó la cantidad y diversidad de compuestos extraídos, la toxicidad en los bioensayos, su facilidad de remoción y su riesgo al manejarlo. La acetona mostró los mejores resultados con las plantas que él seleccionó.

Sarker en 1998 trabajó con las semillas *Axyris amaranthoides*, una planta herbácea originaria de Asia y aisló un nuevo fitoecdisteroide. Los bioensayos para demostrar la actividad biológica se hicieron con la línea celular B-11 de *Drosophila melanogaster*. Para aislar y elucidar el nuevo producto utilizaron radioinmunoensayos, HPLC y RMN.

2.1. ANTECEDENTES *C. albicans*

La virulencia de *Candida* se le atribuye entre otros factores a su dimorfismo y tigmotropismo. Nikawa en 1997 estudió estos fenómenos fúngicos. Promovieron primero la formación del tubo germinativo con el método modificado de Ibrahim con suero humano. Se practicaron además técnicas de bioluminiscencia y se cuantificó el ATP que fue directamente proporcional. Los resultados mostraron que la sensibilidad por contacto (Tigmotropismo) confiere ventaja a *Candida* para penetrar en las células epiteliales humanas, por lo que la naturaleza topográfica de las superficies influye en su patogenicidad.

Nimi en 1988 estudió a *C. albicans* con relación a su morfogénesis enfocando la investigación a la actividad enzimática vacuolar con técnicas moleculares, se manipularon temperatura, pH y morfología. Utilizando análisis Northern blot determinaron que de los genes APRI y HEXi, este último transcrito fue dependiente de la temperatura y pH. La β N-glucosamina se ha identificado como un factor de virulencia en *C. albicans*. Los resultados sugieren que la expresión de los genes APRI y HEXi en *C. albicans* está bajo control de un activador sensible a la temperatura.

Es sorprendente como esta levadura utiliza sus mecanismos bioquímicos para protegerse. Tal es el caso de las bombas de eflujo que transportan vesículas unidas a membrana y bloquean la acción de las drogas azólicas al impedir la producción de lanosterol, un producto básico en la vía biosintética del ergosterol, componente de la membrana fúngica (Wa T. 00).

Amin en 1988 trabajó con la membrana de *C. albicans* alterando la permeabilidad celular de esta levadura, formando poros y causando la salida de elementos citosólicos fúngicos. Con marcadores radioactivos de timidina, uridina y leucina dentro de biopolímeros, se demostró la alteración de la membrana nuclear y la inhibición del transporte electrónico en mitocondria. Además los resultados también sugieren que las fitoalexinas sintetizadas en zanahoria interactúan con los cationes metálicos que son esenciales para la acción enzimática para la actividad de la calmodulina.

Fourie en 1992 aseveró que los resultados de un estudio de 300 plantas muestran al 31% con marcada actividad, 48% con moderada actividad y 21 % fueron inactivas. Morrissey en 1999 menciona que de los 100,000 ó 200,000 especies de hongos que existen, 270 causan infecciones humanas, ubicando a *C. albicans* a la cabeza de dicha lista. Especies nuevas de hongos emergen como patógenos. Además la resistencia a los pocos antifúngicos disponibles,

hace más fuerte la demanda de nuevas opciones terapéuticas. La consecuencia del alto índice de personas inmunosuprimidos es la gran incidencia de nuevas enfermedades micóticas que se reportan día con día. (Morrisey 1999)

Diamond en 1993 aseguró que a pesar de que los hongos oportunistas se enfrentan a mecanismos de defensa muy fuertes, cuando el sistema inmunológico es deficiente se instalan provocando micosis. Actualizadas evidencias indican que la actividad antifúngica de las células fagocíticas lleva a cabo una secuencia de eventos y el mal funcionamiento de alguno de ellos afecta el mecanismo de defensa humano. La invasión fúngica en los tejidos provoca la liberación de citocinas que intervienen en la eficacia del sistema defensivo de los fagocitos. Otra interacción es la que juegan las proteínas de superficie fúngica o la liberación de toxinas que actúan sobre los fagocitos cuando la célula fúngica ha muerto. También hay descarga de productos metabólicos que contrarrestan o alteran las sustancias antifúngicas producidas por el fagocito.

Chant en 1994 determinó que la gemación de *C albicans* está dada por un mecanismo interno específico. La maquinaria molecular responsable involucra vesículas secretoras que son enviadas por los cables de actina del citoesqueleto. Numerosas proteínas se ensamblan generando la polarización de la célula y formando una yema. La actina, los microtúbulos y proteínas en el sitio de la gemación ensamblan de una manera polarizada 10-15 min antes de la formación de la yema.

White en 1997 observó que las opciones terapéuticas contra hongos se limitan, en muchos casos por tener el mismo mecanismo de acción. Esto se observa en el caso de los derivados imidazólicos y antibióticos poliénicos, que tienen como blanco el ergosterol de la membrana plasmática fúngica. Aunque las drogas azólicas inhiben la producción enzimática en la vía biosintética del ergosterol y los polienos son moléculas anfipáticas que forman poros

en la membrana causando la salida de elementos citosólicos fúngicos, ambos tienen el mismo blanco y al generar resistencia contra una de estas drogas los efectos serán similares para los demás.

Magee y Scherer en 1998 comentaron que el incremento de infecciones atribuidos a *C. albicans* es proporcional al número de pacientes inmunosuprimidos. El estudio genético de esta levadura es complicado por su naturaleza diploide. El aislamiento de mutantes por interrupción génica es complicada porque los 2 alelos de cualquier gene puede ser inactivado para dar un fenotipo. Se ha construido una biblioteca genética de *C. albicans* apoyándose en *Sacharomyces cereviceae* utilizando como vector cósmido. Se observó que existe 90 % de similitud entre *C. albicans* y *S. cereviceae*. Entonces aunque solo se tiene el 75% del genoma de *C. albicans* y que consiste en 3,840 clones. El genoma haploide nuclear de *Candida* tiene el tamaño de 16Mb. Así teniendo un catálogo de los genes de *C. albicans* y un mapa de su genoma (tiene 6) tendremos una esperanza de conocer el papel de este microorganismo para establecer estrategias de ataque y evitar se siga incrementando su incidencia.

Stewart en 1999 comenta que la gran cantidad de personas trasplantadas, los agresivos tratamientos tóxicos y la proyección logarítmica de las personas infectadas con VIH. contribuyen en gran medida al cambio de comportamiento de esta levadura que normalmente es inocua. La transición de levadura a micelio puede ser interferida y se sospecha que puede ser a nivel de producción de energía por la fosforilación oxidativa.

Stencel en 1999 nos comenta que a pesar de la importancia de *Candida* que incrementa su incidencia peligrosamente, muchas interacciones son poco entendidas. Esta levadura forma parte de la microflora normal pero cuando el equilibrio se rompe puede transformarse en un peligroso agente patógeno. *C. albicans* es la cuarta causa de infecciones nosocomiales y la mayoría son cuadros clínicos graves, ocurriendo la muerte en el 50% de los casos. El arsenal

antimicótico cada vez es más limitado por lo que es necesario dar mayor ímpetu a la búsqueda de nuevas y mejores drogas antifúngicas con más especificidad y eficiencia. Varios investigadores se han enfocado a la adherencia de *Candida* que es un factor que facilita la entrada a células hospederas como primer paso de una infección. Se ha explorado genéticamente este fenómeno (Tigmotropismo). Se cree que hay dos familias de genes que intervienen (SAP y ALS). El gen SAP controla la secreción de isoenzimas que degradan la superficie celular del huésped, aunque se sabe que la adherencia es un proceso multifactorial. Es un reto para los micólogos esclarecer como ésta levadura lleva a cabo esa transformación y como puede ser interrumpida.

2.2. ANTECEDENTES AGAVES

2.3.1. CLASIFICACIÓN FAMILIA *Agavaceae*

Reino: Vegetal

Division: Spermatophyta

Clase: Angiosperma

Subclase: Monocotiledonea

Orden: Amarilidaceae

Suborden: Iridales

Familia: Agavaceae

Género: Agave

Especie: *lecheguilla*

picta

scabra

lophanta

2.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE AGAVES



Agave scabra



Agave lophanta



Floración

Fig. No. 1 Agaves de la región Noreste de México

2.3.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE AGAVES

Los agaves se desarrollan en gran parte del territorio de la República Mexicana en las zonas áridas o semiáridas, forman parte del matorral xerófilo y tienen la particularidad de captar el agua con rapidez y almacenarla en sus tejidos esponjosos en donde queda protegida de la evaporación, mediante una gruesa cutícula y por una capa de cera. Además llevan a cabo el metabolismo ácido crasuláceo, lo que les permite ahorrar agua ya que capturan el CO_2 , solo de noche para no perderla por apertura de estomas durante el día, cuando la temperatura es alta y la atmósfera seca. Estas plantas compiten entre sí por el territorio, luz y agua. Las sustancias químicas generadas por la planta dañan al competidor así dominan el terreno y forman islas de una densidad de plantas de una sola especie (alelopatía) (Romo de Vivar 1989).

El período generativo de la progenie sexual es larga de 8 a 25 años. La diseminación de estas plantas la ejecutan también los insectos polinizadores. La evolución de los agaves enfatizan que sus especies se componen de poblaciones. Los híbridos son muy comunes de generarse entre estas plantas y suceden no solo entre especies sino entre géneros. Entre los agaves hay especies diploides y poliploides y clones que cambian sus cariotipos. Las variaciones se expresan fenotípicamente en células, órganos, hábitos y fisiologías en desconcertantes secuencias a través del género. Aunque la química total no se conoce, ya que es muy compleja, se han encontrado saponinas, esteroides, terpenos y vitaminas. La reproducción vegetativa en plantas o por raíces tiene la ventaja sobre la reproducción por semilla que no altera las características genéticas de la nueva planta.

A. lecheguilla tiene hojas que miden 40-50 cm distribuidas en roseta y cubierta su orilla con espinas en gancho, tiene además una espina terminal característica de 5 a 8 cm sus flores son amarillas y aparecen de 10 a 20 años después de los cuales la planta muere. Esta planta

tiene un extenso hábitat, hay regiones donde su población es muy densa llegando a contarse hasta 30, 000 plantas por hectárea. Crece en terrenos elevados desde 950 hasta 2,300 m sobre el nivel del mar. El promedio anual de lluvia que favorece el crecimiento de esta planta es de 300 a 500 mm, aunque hay regiones donde llueve menos y crece bien. Se desarrolla en la región comprendida entre los 99° a 106° de longitud oeste y a una latitud entre 21° a 31° localización que corresponde a un nicho ecológico dasonómico de las zonas áridas del norte (Gentry 1982).

La planta de la lecheguilla prospera en suelos calizos que se localizan tanto en planicies como en terreno accidentado donde haya un buen drenaje. También crece en terrenos rocosos y arcillosos y hasta en suelos de origen ígneo. Los cogollos se encuentran en el centro de la planta donde se desarrolla un vástago (quiote) que en la época de la floración alcanza una altura de 2 m.

A. lophanta tiene dimensiones más pequeñas que *A. lecheguilla*, sus hojas miden de 30 a 40 cm. La característica más fuerte en su morfología externa es la espina insertada en un montículo redondeado en toda la orilla de la hoja. Además tiene una línea amarilla en la orilla de sus hojas. Esta especie crece en el mismo terreno que *A. lecheguilla*, por lo que algunos autores creen que es un híbrido.

A. americana contiene muchas variedades y la separación taxonómica es difícil. Crece en regiones donde la lluvia llega a 250 a 800 mm. Es también una planta con gran adaptabilidad ecológica. Su variedad *scabra* según Gentry o *asperrima* según Jacobi es, después de *A. lecheguilla* el más abundante en el desierto de Chihuahua. Sus hojas son rígidas y lanceoladas muy amplias en la base y miden de 60 a 80 cm, crecen en terrenos elevados de 1,200 a 1900 m sobre el nivel de mar, sobre suelos calizos o limosos. La variedad *picta* según

Salm-dick es característica por su banda amarilla a lo largo de sus hojas, las cuales son muy largas llegando a medir hasta 3 m de largo por 30 cm de ancho.

2.3.3. ANTECEDENTES AGAVES Y SAPONINAS.

Las plantas utilizadas en este estudio se seleccionaron por su gran adaptabilidad ecológica y por ende su abundancia. La familia *Agavaceae* tiene cerca de 140 especies nativas de América. Los agaves se incluyen en el matorral xerófilo que es el más vasto de todos los tipos de vegetación en México ya que ocupa el 40% de la superficie territorial, crecen en la región noreste conformando el paisaje característico de las zonas semidesérticas. (Rzedowski).

El uso terapéutico de estas plantas en México es múltiple ya que se ha utilizado contra el cancer, diabetes, mordeduras de serpientes, espasmos estomacales, calentura, golpes, heridas, depurativo de la sangre y como diurético (Mendieta 1981). En la India se utiliza el jugo de la hoja como antisifilítico, las raíces como antiescorbútico y la goma de la hoja contra dolor de cabeza. En Africa se ha utilizado contra el reumatismo, como diurético, purgativo y emenagogo. Además el jugo de la hoja se ha utilizado en papel de pared contra las termitas (Mitchell 1962).

Los componentes de estas plantas varían en contenido químico con la edad, época de recolecta, ubicación geológica, clima etc. Sus carbohidratos no estructurales aumentan en concentración en los meses de lluvia y decrecen en meses secos cuando se requieren para mantener la respiración. El período generativo de la progenie es largo, de 8 a 25 años. Los agaves son plantas que florecen a los 10- 20 años y antes de morir producen alrededor nuevas plantas. Se cree que por eso han perdurado por siglos en este planeta (Howard 1990). Los agaves se han utilizado desde la época prehispánica como alimento, bebida y medicina. (Ludlow, Ojeda). El nombre de "Agave" fue otorgado por Linneo a fines del siglo XVIII y

proviene del griego "admirable". Gentry en 1982 publicó una extensa obra en la que revisa la taxonomía de agaves de Norteamérica, tomando en cuenta factores ecológicos geográficos y genéticos. Vázquez en 1962 estudió *A. lecheguilla* Torr. demostró que posee saponinas, las cuales extrajo con alcohol etílico y las aisló por cristalización, además las identificó con pruebas químicas y constantes físicas.

Aunque la química total de agaves no se conoce, ya que es muy compleja, existen muchos trabajos que se enfocan a su contenido químico. Se ha reportado entre su contenido químico la presencia de esteroides, terpenos, vitaminas y saponinas en sus hojas. Además su contenido lipídico también ha sido investigado y los ácidos grasos encontrados fueron oléico y linoléico contenidos en mayor proporción en las semillas (Howard 1990). Se han llevado a cabo muchos estudios de saponinas en otras plantas con relación a su efecto antifúngico y su toxicidad. Pero en agaves aunque hay antecedentes empíricos de su papel antifúngico poco se ha investigado científicamente. En el fruto es donde se ha encontrado un mayor contenido de saponinas, la hecogenina se ha encontrado en 16 diferentes especies de Agaves nativos de México. La manogenina se ha aislado de 18 especies de Agaves. Las saponinas son compuestos derivados del ciclopentanperhidroofenantreno, parcial o totalmente hidrogenados con 27 átomos de carbonos.

El extenso estudio sobre la familia *Agavaceae* que desarrolló Gentry en 1982 menciona que *A. lecheguilla* es la más abundante en el desierto de México, le sigue *A. scabra* que también crece en suelo calizo y limoso a 1200-1900m sobre el nivel del mar. Además comenta que en las localidades donde crece *A. lecheguilla* también crece *A. lophanta* como forma intermedia o asignada como híbrido. Estas cruces se dan en las montañas que se ubican a lo largo de la sierra Madre Oriental específicamente en Coahuila y Nuevo León.

Peregrin en 1972 analizó la acción enzimática en la biosíntesis de saponinas en *A. americana* Lin. Menciona que la actividad de las enzimas mevalonato y fosfomevalonato kinasa en la fosforilación fue mayor en las flores que en las hojas. Se encontró que es mayor la utilización del ac. mevalónico como sustrato enzimático en la biosíntesis de terpenoides de la planta. De *A. americana* se aislaron 5 saponinas (hecogenina, clorogenina, neotigogenina, kamogenina y 9- dehidrohecogenina)

Basu y Rastogi en 1967 hacen un estudio de saponinas triterpénicas y saponinas, exponen las propiedades de algunas saponinas como antilipémicas, anticoagulantes y antiproteolíticas, mencionan el posible mecanismo de acción que se inicia al alterar la permeabilidad celular con la modificación de los lípidos. También aluden su naturaleza glucosídica y su amplia distribución en el reino vegetal, se ha reportado su presencia en al menos 500 géneros de plantas

Takechi y Tanaka en 1990 estudiaron la saponina α -hederina de *Hedera rhombea*, removieron el azúcar y el metil éster y se comprobó que la saponina es inactiva y además demostraron que los efectos citotóxicos y antimicrobiano dependen de diferentes centros. El azúcar terminal es más importante para la actividad antimicrobiana y el radical ac. carboxílico es más significativo para la actividad citotóxica (hemolítica). Los azúcares más comunes que presentan las saponinas son: glucosa, galactosa, ramosa y xilosa en series de 3 a 6 unidades.

Glz en 1974 reportó la presencia de lactonas esteroidales en la planta española *Withania frutescens* Paug. Estos compuestos muestran grupos oxidrilos y cetónicos con las típicas señales espectroscópicas de IR y RMN. La estructura exhibió un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno además de un anillo lactónico.

Tort y Schubert en 1977 estudiaron una enzima proteolítica (aminopeptidasa) de *A. americana* Lin. que se aisló y caracterizó por electroforesis. Se determinaron sus constantes físicas como punto isoelectrico, coeficiente de sedimentación y difusión así como su composición de aminoácidos. Los resultados termodinámicos se obtuvieron con estudios cinéticos los cuales mostraron que la constante de Michaelis permanece constante aun cuando se incremente la temperatura. La aminopeptidasa no requiere ningún ion metal para su óptima actividad. Todos los resultados indican que la histidina juega un papel importante en el proceso de catálisis.

Kilagawa en 1978 elucidó las estructuras químicas de 2 compuestos antifúngicos extraídos del pepino de mar *Stichopus japonicus* Selenka. Encontraron la presencia de dos saponinas llamadas holotoxina A y B que inhibieron el crecimiento de hongos del género *Trichophyton* y *Candida* además del parásito *Trichomona*. Los análisis espectroscópicos mostraron su naturaleza glicosídica además de un grupo γ -lactona.

Bathia y Nandra en 1978 investigaron el papel de la enzima fructosil transferasa extraída de *A. americana* Linn. que interviene en la biosíntesis de fructosanas. Las condiciones óptimas para la actividad enzimática fueron a pH 6.1 y 37°C de temperatura. Los iones Ca^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} y Li^{+2} actuaron como activadores y el Pb^{+2} , Hg^{+2} , Sn^{+2} , Ag^{+} y CN^{-} actuaron como inhibidores. La enzima fue capaz de formar oligosacáridos y ninguno de los intermediarios de la biosíntesis de fructosana provenientes de la sacarosa actuaron como donadores de fructosa.

Salete y Barros en 1982 determinaron la actividad antimicrobiana y antineoplásica de una saponina triterpenoide aislada de las flores de *Coubretum fruticosum*. Los bioensayos mostraron la actividad de las saponinas sobre microorganismos ácido resistentes (*Nocardia asteroides* y *Mycobacterium tuberculosis*). Además se probó el efecto del extracto sobre el

sarcoma 180, el cual se inhibió en un 64%. La identificación del compuesto activo se apoyó en pruebas químicas y en espectroscopía en IR y RMN.

Romo de Vivar en 1989, menciona que anualmente se publican más de 3,000 artículos referentes a esteroides aislados de plantas o sintetizados a partir de productos naturales. Las plantas generan colesterol por la vía del acetato-ac. mevalónico. Esta molécula se modifica y genera una gran variedad de esteroides. La fórmula esteroideal fue establecida por Reinitzer en 1888. El esqueleto carbonado que funge como núcleo es el ciclopentanoperhidrofenantreno y fue elucidado por dehidrogenación del colesterol por O. Diels en 1927. La esmilagenina fue detectada en *A. lecheguilla* así como la hecogenina en *A. sisalana*.

Nobel en 1989 demostró que los agaves poseen el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), en el cual la apertura estomática y la absorción de CO₂ ocurren principalmente en la noche cuando las bajas temperaturas reducen la pérdida de agua. También se determinó el índice de productividad ambiental (IPA). A su vez mostraron que los efectos de los niveles de nutrientes en el suelo son directamente proporcionales al crecimiento y esto se cuantificó por el índice nutricional que incrementa el poder del IPA.

Mimaki en 1989 trabajó con bulbos frescos de *Lilium browni* que se emplean en la medicina folklórica de China. Aunque ya se habían reportado compuestos fenólicos en otras especies de este género no se habían reportado saponinas esteroidales. Se demostró su presencia con análisis espectroscópicos.

Valeri en 1989 estudió los constituyentes de *Solanum meridense* un árbol que crece en Mérida, Venezuela. Sus frutas son conocidas por la producción de espuma lo que sugirió la presencia de saponinas. La extracción se hizo con cloroformo en soxhlet. Por cromatografía en placa delgada se aislaron saponinas y por hidrólisis ácida se obtuvieron las

correspondientes saponinas. La estructura de los compuestos se estableció por espectroscopia.

Uniyal en 1990 aisló 2 nuevos glicósidos esteroidales de *A. cantala*. Aunque estudios anteriores habían reportado otros glicósidos esteroidales como: hecogenina, clorogenina, gitogenina y tiogenina. Estos nuevos glicósidos provienen del fruto y su separación se realizó en cromatografía en columna. Además se practicaron pruebas químicas, espectroscopia en IR, RMN y espectrometría de masas para su elucidación estructural.

Malaviya en 1991 aisló dos saponinas triterpenoides de *Deutzia corymbosa*, una planta de la India con actividad biológica. El azúcar se determinó gravimétricamente por el método de Fehling y encontraron la arabinosa ramnosa y galactosa como los azúcares unidos al glicósido. También se practicó la prueba química de Liebermann-Burchard. La elucidación estructural se hizo por espectroscopia en IR y RMN.

Peralta y Cuevas en 1992 analizaron los esteroides de *A. angustifolia* que se cultiva en el estado de Oaxaca, Mex. Para la producción de mezcal pero solo utilizan el cogollo que constituye el 40% de la peso de la planta y se desperdician las hojas que constituyen el 60% de su peso. Ellos encontraron hecogenina, tiogenina y dihidrohecogenina que fueron aislados de las hojas y su estructura se elucidó por espectroscopia en IR y RMN.

Velázquez en 1993 demostró en ratones Wistar, que la dosis letal de saponina es muy por arriba de los 6 mg/Kg de peso por que no hubo daño renal ni hepático al administrar esta concentración en forma oral. Verástegui en 1995 estudió el efecto antifúngico de 20 plantas y entre ellas *A. lecheguilla*, *Bacharis glutinosa* y *Larrea tridentata* mostraron actividad antifúngica aunque el potencial más elevado sobre los microorganismos patógenos estudiados fue el de *A. lecheguilla*.

Peana en 1996 obtuvo extractos acuosos liofilizados de *A. americana* colectada en Italia. Extrajeron sapogeninas esteroidales las cuales poseen actividad antiinflamatoria. Los extractos fueron administrados por vía intraperitoneal en ratas albinas Wistar a las cuales se les provocó un edema con carragenina. También se estudió su actividad ulcerogénica. Las sapogeninas se administraron oralmente. Los resultados fueron analizados estadísticamente por la prueba de Tukey. El extracto acuoso inhibió el 50% del edema a las 3 h pero las sapogeninas esteroidales mostraron mejores resultados ya que a la hora ó 3 horas redujeron el edema el 70%.

Paczkowski en 1997 demostró la presencia de 2 glucosiltransferasas en *Solanum melogena*. Estas enzimas intervienen en la biosíntesis de sapogeninas esteroidales y glicoalcaloides y están distribuidos ampliamente en otras plantas de importancia económica. Los metabolitos secundarios antes mencionados juegan un papel muy importante en la protección de la planta contra microorganismos patógenos o herbívoros. Además sus actividades antiviral, antifúngica, citostática e hipocolesterolemica es bien conocida. Los resultados sugieren que la 3-O-glicosilación de las saponinas esteroidales y glicoalcaloides es catalizada por 2 glucosiltransferasas dependientes de UDP-glucosa.

Weltring en 1997 investigó la actividad enzimática de hongos del género *Fusarium*, los cuales destruyen las saponinas generadas por las papas como mecanismos de defensa. Los hongos enzimáticamente remueven el carbohidrato ramnosa de la saponina y este producto es convertido en sapogenina que es metabolizado por productos desconocidos. Los resultados indican que *Fusarium* excreta enzimas específicas para diferentes saponinas

Wang y Lee en 1997 demostraron que las saponinas del Ginseng (GS) de *Panax-sp* producen un efecto ergogénico que involucra mecanismos bioquímicos. Ellos trabajaron con ratas a las que se les obligó a desarrollar ejercicio intenso, después del cual analizaron su

sangre (glucosa y ácidos grasos) y el glucógeno de (hígado y músculo). Los resultados revelaron que el grupo de ratas tratadas con GS fueron más resistentes comparadas con el grupo control. Los niveles de ac. grasos libres se incrementaron en el plasma. La glucosa se mantuvo en su nivel normal y el glucógeno de hígado y músculo fue ligeramente incrementado.

Lavaud en 1997 aisló cuatro saponinas de *Filicium decipiens*, planta que crece en el sur de Africa y se recolectaron en Tanzania. La extracción se hizo con metanol y fueron separadas por cromatografía en columna y aisladas de la fracción más polar, los monosacáridos fueron identificados por HPLC como xilosa y ramnosa. La localización de los enlaces glicosídicos fue elucidada por análisis de 2D RMN, también se practicó para la elucidación estructural IR, ¹H RMN, ¹³CRMN y EM.

Atta-Ur-Rahman en 1997 analizó un pequeño arbusto *Withania coagulans* que se ha utilizado contra desordenes intestinales y su actividad biológica se le atribuye a compuestos llamados withanólidos (lactonas esteroideas). Los compuestos fueron separados por cromatografía en columna y capa delgada. Su identificación se hizo por medio de análisis espectroscópicos incluyendo IR, 2D RMN y MS.

Gawad en 1998 analizó las hojas de *Agave decipiens* y revelaron la presencia de 2 saponinas espirostánicas y 2 saponinas furostánicas en los extractos metanólicos. Las saponinas espirostánicas 2 y 4 mostraron actividad moluscocida contra el caracol *Biomphalaria alexandrina* que es el hésped intermediario de *Schistosoma mansoni*.

Mimaki en 1998 encontró 18 saponinas esteroideas en las raíces de *Hosta sieboldii* planta originaria de Asia. Seis de los compuestos no se habían reportado antes. La actividad citostática de las saponinas aisladas fue evaluada en células humanas HL-60 de leucemia

promielocítica. Los resultados demostraron que las saponinas espirostánicas cuando están unidas a carbohidratos son más activas.

Putalun en 1999 encontró una nueva saponina esteroidal en los frutos de *Solanum khasianum*. La importancia reside en una posible nueva fuente de hormonas esteroideas. La saponina slokhasoside se aisló por cromatografía en columna y se identificó con las pruebas químicas de Libermann- Burchard y Dragendorff. Además se caracterizó su estructura con análisis espectroscópicos en RMN.

Mimaki en 1999 estudió los bulbos frescos de *Allium jesdianum* y demostró su actividad contra células leucémicas promielocíticas humanas HL-60. Encontró 2 glucósidos esteroideos colestánicos y 2 saponinas furostánicas. La identificación y determinación estructural la hicieron en base a los análisis espectroscópicos desarrollados en RMN.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPOTESIS

Los extractos de especies de *Agave* inhiben el crecimiento de hongos y bacterias, además alteran procesos metabólicos de *C. albicans* involucrados en su patogenicidad.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de cuatro especies de *Agaves* sobre 15 microorganismos patógenos y su acción sobre el tigmotropismo y dimorfismo de *C. albicans*, así como determinar la naturaleza del compuesto activo.

3.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Demostrar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos y refluados de las plantas seleccionadas.
- 2.- Determinar la CMI de los extractos crudos sobre el crecimiento de los microorganismos que mostraron inhibición preliminar.
- 3.- Localizar y aislar el compuesto responsable de la actividad biológica mediante bioautografía y cromatografía
- 4.- Mostrar el efecto de los extractos sobre el tigmotropismo y dimorfismo de *C. albicans*
- 5.- Identificar el compuesto activo

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MICROORGANISMOS

BACTERIAS

Escherichia coli

Bacillus cereus

Enterobacter aerogenes

Listeria monocytogenes

Pseudomonas aeruginosa

Salmonella enteritidis

Staphylococcus aureus

Vibrio cholerae

Yersinia enterocolitica

HONGOS

Candida albicans

Cryptococcus neoformans

Microsporium canis

Microsporium gypseum

Trichophyton tonsurans

Sporothrix schenckii

Las cepas bacterianas y levaduriformes se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Las cepas fúngicas filamentosas fueron donadas por el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

Los microorganismos se mantuvieron en refrigeración a 4°C en medios sólidos. Para hongos se utilizó papa dextrosa agar (PDA) y para bacterias agar cerebro corazón (ACC). Las bacterias utilizadas fueron: *E. coli* 43889 ATCC, *B. cereus*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *L. monocytogenes* Scott A ATCC, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* 196 ATCC y *V. cholerae* 7677 (01

Ogawa) ATCC. Los hongos fueron *M. canis*, *M. gypseum*, *T. tosmurans*, *S. schenckii* *C. albicans* y *C. neoformans*. Todas aisladas de hunamos.

4.2. MATERIAL VEGETAL

Agave lecheguilla Torr.

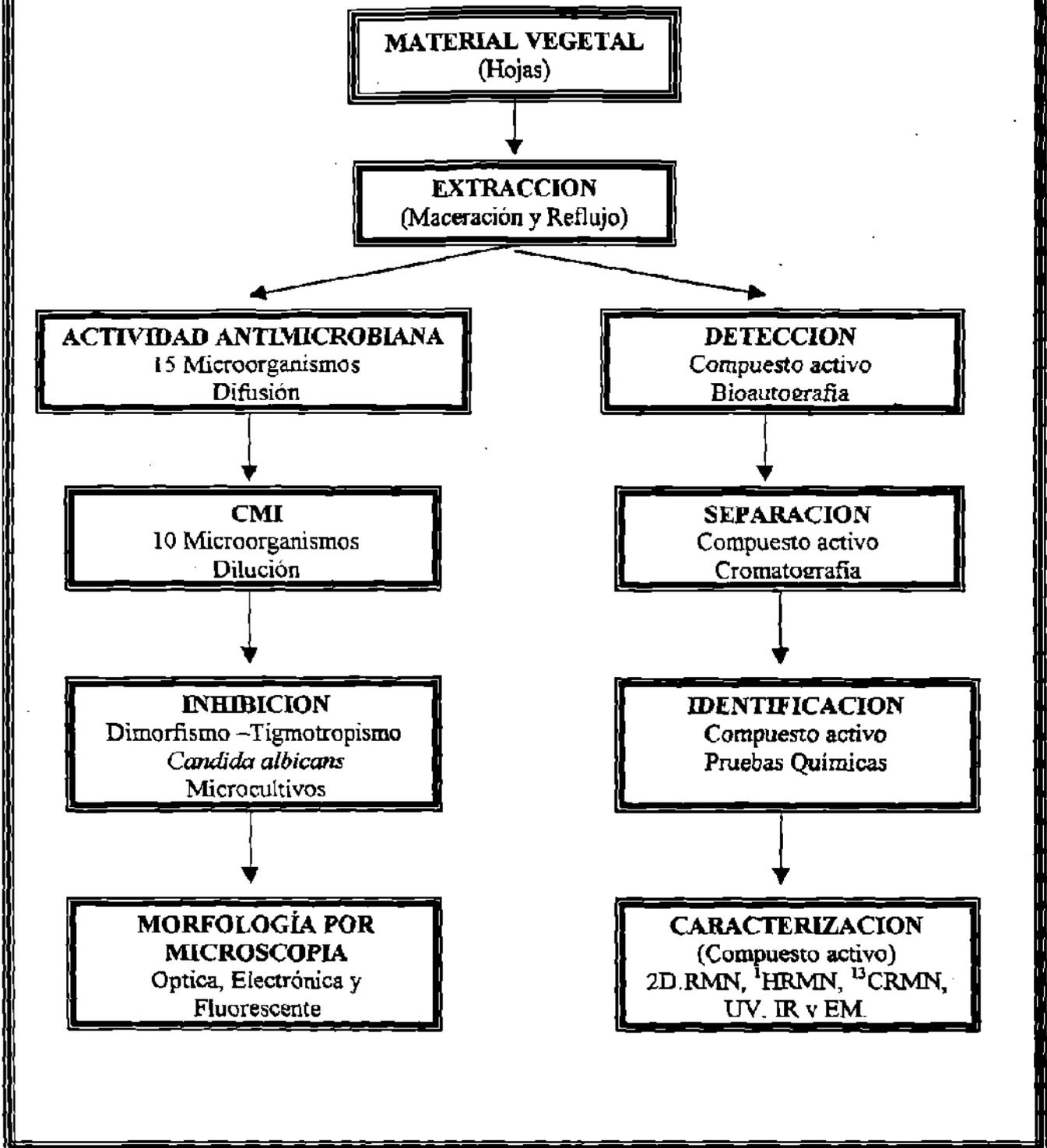
Agave picta Salm-Dick.

Agave scabra Salm-Dick.

Agave lophanta Schdiele.

Las hojas de las plantas seleccionadas se recolectaron de la colección particular del Biólogo Jorge Verduzco, maestro del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL quien también hizo la clasificación de las cuatro especies que se estudiaron. Una muestra de cada especie fue depositada en el Herbario de dicha Facultad. Las especies seleccionadas crecen en la región noreste de México.

ESTRATEGIA ANALITICA GENERAL



4.3. BIOENSAYOS

Para desarrollar los bioensayos se activaron las bacterias en medio ICC (Difco) a 37°C durante 16 h. En el caso de los hongos filamentosos y levaduras se activaron las cepas ya desarrolladas en PDA a temperatura ambiente durante 24 h.

4.3.1. BIOENSAYO PRELIMINAR.

En el bioensayo preliminar se utilizó el método de difusión. En caja de Petri se añadieron 20 ml de PDA, cuando solidificó se formaron orificios sobre el agar con un asa terminada en círculo y orientada en ángulo recto. Los orificios se ubicaron 2 cm separados uno de otro por lo que se pudieron probar 5 extractos en una caja Petri. Se agregó el inóculo y se practicó siembra masiva sobre el agar con el microorganismo seleccionado, se añadieron 50 µl del extracto crudo (1g en 10 ml) en cada orificio. El período de incubación y la temperatura varió de acuerdo al microorganismo en estudio. La zona de inhibición se midió sin tomar en cuenta el diámetro del orificio que midió 5 mm. Además utilizando el mismo método de difusión se hizo un estudio comparativo frente a dos antibioticos conocidos: cloramfenicol para bacterias y nistatina para hongos (controles positivos).

4.3.2. DETERMINACION DE LA CMI DEL CRECIMIENTO.

Para determinar la CMI del crecimiento se utilizó el método de dilución. Se prepararon suspensiones de células microbianas de los microorganismos con dispersión homogénea (Miguel 1996). En un tubo de ensaye se añadieron 1.8 ml de solución salina y se añadió una asada del microorganismo. A partir de esta suspensión se hicieron las diluciones en tubos con 1.8 de solución salina transfiriendo 0.2 ml de la suspensión celular, se incubaron las bacterias

y levaduras por 24 h a 37 C y se tomó lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro y por último se hizo cuenta viable en placa. La dilución que reveló una cuenta viable entre 30 y 300 UFC sirvió como base para todos los siguientes estudios que requirieron medir la concentración celular del inóculo.

Los hongos filamentosos se cuantificaron por el método de Ibrahim. El cual permite el total desarrollo del hongo en un medio inclinado. Después se agregó solución salina hasta cubrir el desarrollo fúngico, se raspó el micelio aéreo con asa y se agitó vigorosamente para desprender las conidias de su conidióforo. Por último se filtró con papel Whatman No. 1. Finalmente las micro y macroconidias se contaron en hematocitómetro (Manavathu 1996). El resultado se corroboró con cuenta en placa para verificar la viabilidad de las conidias.

La CMI se tomó como la menor concentración del extracto capaz de inhibir totalmente el crecimiento del microorganismo. Se utilizaron placas con 3 divisiones en las cuales agregamos: el extracto, el control positivo y en la ultima division no se agregó ningun antimicrobiano para tomarlo como control negativo. Mas tarde se añadieron 5 ml del medio de cultivo a 40°C en cada compartimento y se mezcló por rotación. Se permitió la solidificación del agar a temperatura ambiente, después de lo cual los cultivos se incubaron a temperatura ambiente el período adecuado para cada microorganismo; 3-15 días para hongos y 24 h para bacterias. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y en condiciones de esterilidad.

4.3.3. LOCALIZACION BIOAUTOGRAFICA.

La localización del compuesto activo se hizo por el método bioautográfico, el cual se apoya en los métodos de difusión y cromatografía. Los primeros en utilizar este método en cromatogramas desarrollados en capa delgada fueron Fisher y Nicolaus en 1961. Esta técnica es adecuada para localizar el compuesto responsable de la actividad biológica, cuando se

estudia un extracto crudo que tiene una mezcla de compuestos muy abundante (Rios, Eloff, Hamburger Touchstone 1980).

En este trabajo se modificó el método de Hamburger, se utilizaron placas cromatográficas más pequeñas (2.5 x 7.5) que se colocaron en cajas de Petri, para ahorrar material, tiempo y equipo especial. El cromatograma en el cual se separó el extracto con los solventes adecuados, se midió el Rf de cada fracción, posteriormente se cubrió con una tira de agar previamente solidificado y sobre este se añadió la suspensión celular del microorganismo en estudio. Se incubó en ambiente húmedo al tiempo y la temperatura adecuada para cada microorganismo. La zona de inhibición fué medida y correlacionada con el Rf que ya se había registrado en el cromatograma. En este bioensayo también se manejaron controles negativos y positivos.

4.3.4. INHIBICION DEL DIMORFISMO.

La inhibición del dimorfismo de *C. albicans* se demostró en medio Czapek líquido. En una serie de tubos de ensaye 10 x 70 mm se agregó el medio de cultivo mezclado con Tween 80, diferentes concentraciones del extracto y la suspensión de células levaduriformes (1×10^3 UFC) y se incubó a 37°C durante 72 h. El efecto de los extractos sobre la transformación de la levadura a micelio, se observó en microscópio óptico electrónico y de fluorescencia, siempre se corrió un control negativo sin extracto para comparar resultados.

También se utilizó medio sólido para demostrar la inhibición del dimorfismo. Se practicó la técnica de Ridell para microcultivos (Bonifaz 1993): En una caja Petri se añadió el medio Agar Czapek, Tween 80 y el extracto, se homogenizó por rotación antes de solidificarse. Se dividió este agar en cuadros de 1cm^2 y se transfirió uno de ellos a un portaobjeto que se colocó en una caja Petri. Sobre el cuadro de agar se agregó la suspensión

celular de la levadura en su fase filamentososa desarrollada previamente en caldo Czapek. Sobre todo esto se colocó un cubreobjeto. Se mantuvo un ambiente húmedo con una gasa impregnada en agua estéril y se incubó a 37°C durante 24 h, después se separó el cubreobjeto y se tiñó con Gram para su observación en microscopio. En la misma caja Petri colocamos un cuadro de agar Czpek sin extracto como control negativo.

4.3.5. INHIBICION DEL TIGMOTROPISMO.

La sensibilidad por contacto (tigmotropismo) se demostró con la técnica de Nikawa. Se promovió la formación del tubo germinativo en un tubo de ensaye, se agregó 1 ml de suero humano, mas 100 µl de la suspensión de levaduras 1×10^3 UFC. Se incubó a 37°C durante 2 h y las células que desarrollaron tubo germinativo se contaron en hematocitómetro.

Para demostrar la inhibición del tigmotropismo, se desarrolló la técnica de microcultivo (Ridell), con algunas variantes con respecto al original. En una caja de Petri se puso un potaobjeto y sobre de él un cuadro de PDA de 1 cm² al cual se le coloca encima un fragmento de polietileno de 2 cm² con orificios preformados, sobre este plástico se añadieron 100 µl de la suspensión celular fúngica previamente germinada y por último se agregó el extracto. Se incubó a 37°C por 72 h en ambiente húmedo. Más tarde se removió el plástico, se lavó varias veces con solución salina para desprender las blastoconidias asociadas y los filamentos adheridos a la superficie inerte se tiñeron con eritrocina para la observación en microscopio óptica a 40 aumentos. Se registró la cantidad de filamentos adheridos tomando como 100 % el control negativo sin extracto.

4.4. MICROSCOPIA

4.4.1. MICROSCOPIA ELECTRONICA

El desarrollo de microscopía electrónica se llevó a cabo en el Departamento de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UANL por el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra en un microscopio electrónico de transmisión EM-109 Karl-Zeiss utilizando un ultratomo V-LKB.

Las muestras que se estudiaron por microscopía electrónica se prepararon de la manera siguiente: Las levaduras fueron sujetas a la acción de los extractos utilizando dosis inhibitorias, intermedias y controles sin extracto. En tubos seriados se agregó 2.0 ml de caldo Czapeck más Tween 80 para la filamentación de *Candida*, se añadió el extracto en las dosis antes mencionadas y 100 µl de la suspensión de células fúngicas, se incubaron a 30°C durante 48 h, luego se procesaron con la metodología especial para este microorganismo.

Técnica especial para levaduras

Se lavó dos veces con H₂O Milli Q (3 min cada lavado), y cada uno se agitó y centrifugó (éste paso se trabajo en la campana y se deshecharon los lavados obtenidos). Se fijó con KMnO₄ 1.5% (20 min mínimo, 45 min máximo) a temperatura ambiente. Después se centrifugó 10 min, se lavó dos veces con H₂O Milli Q (3 minutos cada lavado) o más hasta que el sobrenadante mostrara un color transparente. Se agitaron y centrifugaron cada uno de los lavados. Se tiñó con acetato de uranilo al 1% y centrifugó 15 min en la centrifuga para eppendorf. Se dejó en acetato de uranilo minimo una hora o en el refrigerador hasta que se procesó para así igualar todas las muestras.

4.4.2. METODO RAPIDO DE DESHIDRATACION

Se hizo pasar la muestra por etanol 50% 15 min, después en etanol 70% 15 minutos, se rompió el botón con un pincelito o aplicador para obtener piezas pequeñas. Se repitió la operación en etanol al 96% por 15 min. De aquí se tomó otro vial de cada muestra y se guardó en el refrigerador, por si acaso la inclusión en epón tuvo algún inconveniente, se cuente con muestras extras. Se continuó con etanol al 100% por 15 min y 60 min. Enseguida se trató la muestra con óxido de propileno 100% 2 veces por 15 minutos. La muestra se preincluyó en epón-óxido de propileno 1:1 una hora a temperatura ambiente, más tarde en epón-óxido de propileno mezcla 3:1 durante una hora a temperatura ambiente, una vez hecho esto se pasa la muestra por epon puro 30 minutos primero, luego en epón puro durante una hora, después se incluyó en cápsulas de plástico o en plantillas en la estufa durante toda la noche a 60°C. Por último se hicieron cortes finos y se observó al microscopio electrónico escogiendo los campos adecuados para tomar placa fotográfica.

4.4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las muestras para esta microscopía se prepararon en una serie de tubos con 2 ml de caldo papa dextrosa, 100 µl de *C. albicans* (1×10^3) y diferentes concentraciones de los extractos. Se incubaron por 48 h a 37°C. Se prepararon frotis de cada concentración, se secaron, se tiñeron con isotiocianato de fluoresceína y se observaron las alteraciones morfológicas de la levadura.

4.5. PREPARACION DE EXTRACTOS

Maceración.

500 g del material vegetal fresco recolectado se fragmentó en piezas pequeñas y se maceró por 5 días con alcohol etílico en una proporción 1:3 a temperatura ambiente. Después se filtró y el sólido se desechó. El filtrado se evaporó en estufa a 45°C y el residuo totalmente seco se pesó y se almacenó en un lugar fresco y oscuro hasta su uso. (Rios 1987)

Reflujo

Las hojas frescas recolectadas se fragmentaron en piezas pequeñas de 5 cm de largo por 1 cm de ancho y se secaron en estufa a 45°C, posteriormente se molió el material vegetal en un molino tipo “Wiley” Thomas Scientific USA. La extracción de los principios activos se llevó a cabo mediante reflujo continuo en un aparato soxhlet durante siete días con cada solvente de polaridad creciente; hexano, cloroformo y metanol respectivamente. Para la concentración de los extractos se utilizó un rotavapor BUCHI R-3000 para llevarlos a sequedad, las muestras se pesaron y almacenaron en lugar oscuro y fresco hasta su uso. (Adikaram 1992).

El aislamiento de los principios activos con actividad antimicrobiana, se realizó mediante métodos cromatográficos que fraccionaron el extracto basados en la migración diferencial de los componentes de la mezcla.

4.6. METODOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

4.6.1. CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Se utilizó para cubrir varios objetivos:

- a) - Localizar el metabolito activo por medio de la técnica bioautográfica.

b) - Conocer la naturaleza química del compuesto responsable de la actividad biológica con revelado en placa.

c) – Aislar el compuesto activo para su posterior estudio espectroscópico

Las placas se prepararon con silica gel 7G J.T.Baker, como adsorbente o fase estacionaria, la cual se suspendió en agua en una proporción de 1:3, se mezcló por agitación evitando la formación de burbujas de aire y se depositó en placas de vidrio de diferentes dimensiones. Las placas se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se activaron a 120°C durante 1 h. Se almacenaron en cámara deshidratadora SANPLATEC hasta su uso. Los eluentes empleados para su corrimiento con los extractos fueron cloroformo-metanol en una proporción 5:1. La muestra disuelta en agua se aplicó con un capilar calibrado a una distancia de 1.5 cm del borde inferior de la placa activada. La aplicación se hizo por gota o en banda dependiendo el objetivo a cubrir. Se colocó la placa en una cámara cromatográfica de tapa móvil que contenía los eluentes antes mencionados. Se permitió que la muestra corriera por capilaridad hasta una distancia de aproximadamente 1 cm del extremo superior de la placa, se sacó de la cámara y se secó a temperatura ambiente para evaporar los eluentes.

Para calcular el Rf se midió la distancia del punto de aplicación de la muestra hasta la mitad de la mancha o banda estudiada y se dividió este valor por la distancia del punto de aplicación hasta el frente del eluente.

CARACTERISTICAS DE LAS PLACAS CROMATOGRAFICAS

BASE	ALTURA	ESPESOR	FUNCION
2.5 cm	7.5 cm	1 mm	BIOAUTOGRAFIA
5.0 cm	10 cm	2 mm	REVELADO
20 cm	20 cm	3 mm	AISLAMIENTO

4.6.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA INVERTIDA

Las columnas utilizadas fueron de 17 cm de longitud por 20.0 mm de diámetro abiertas por ambos lados. Se colocó un fragmento de algodón en la parte inferior de la columna y sobre él un fragmento de papel filtro Whatman No. 1, posteriormente se añadió 0.5 g de la muestra la cual se mezcló y molió con sílica gel 7G (Baker), se cubrió con otro papel filtro y se terminó de empacar con sílica. Se colocó otro fragmento de algodón en la parte superior. Ya empacada la columna se depositó en una cámara con los eluentes cloroformo-metanol 5:1. Por capilaridad los compuestos se separaron en fracciones y se les determinó su R_f para localizar la fracción que contenía el compuesto activo. Esta técnica se utilizó también para aislar o purificar parcialmente el compuesto activo que más tarde se analizó por espectroscopía. La fracción activa se separó con espátula y se diluyó en etanol, se centrifugó por 10 min, se filtró, se deshidrató a 47° y se almacenó en cámara deshidratadora provista de higrómetro para su posterior análisis espectroscópico.

4.6.3. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA NORMAL

En esta técnica se utilizó una columna de vidrio de 50 cm de longitud y 2.5 de diámetro, provista en su parte inferior de una llave de cambio. Se empacó primero con un fragmento de algodón en la parte inferior de la columna, se colocó un papel filtro y después se añadió sílica gel (60-200 Mesh) BAKER, la cual actuó como fase estacionaria. Se agregó 1g de muestra molida con sílica gel. Se colocó antes y después de la muestra papel filtro para que la separación correcta. Finalmente para terminar de empacar la columna se colocó un fragmento de algodón en la parte superior de la columna para que el eluyente no cayera directo sobre la sílica-gel. Los solventes aplicados fueron de tipo polar en orden creciente; primero

acetona, después etanol y por último metanol. La cantidad de cada eluyente utilizado fue de 300 ml por 1g de muestra (extracto metanólico refluado). Todas las fracciones separadas se sometieron a pruebas químicas de grupos funcionales que permitieron su caracterización.

4.6.4. PRUEBAS QUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN

- a) – Prueba de Ignición: Se realizó colocando una cantidad de muestra en un asa y se expuso a la flama, el compuesto ardió y no dejó cenizas: fue orgánica.
- b) – Insaturaciones: Se disolvió 0.2 mg de muestra en etanol y se agregó gota a gota una solución de KMNO_4 al 2% en agua. La prueba fue positiva al decolorarse con más de tres gotas de reactivo.
- c) – Grupo carbonilo: Se disolvió 1 mg de la muestra en etanol con unas gotas de solución saturada de 2,4 dinitrofenilhidracina en ácido clorhídrico. Un precipitado amarillo o naranja indicó la presencia del grupo carbonilo.
- d) – Esteroles y triterpenos: Liebermann-Burchard. La muestra se disolvió en cloroformo se mezcló con el reactivo, el cual se preparó agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1 ml de cloroformo y 1 ml de anhídrido acético. La prueba fue positiva con la formación de colores azul o verde con esteroides y rojo, violeta o morado con triterpenos.
- e) – Saponinas: Salkowski. Se colocaron 1 a 2 mg de la muestra en 1ml de cloroformo y se añadió 1 ml de ácido sulfúrico. La prueba fue positiva al desarrollar un color rojo.
- f) – Lactonas: Se hizo reaccionar 1 a 2 mg de la muestra con una solución alcohólica de NaOH al 10%. Un color amarillo o anaranjado que se perdió o desapareció al agregar unas gotas de HCl indicó la presencia de un anillo lactónico.

- g) – Carbohidratos: La prueba de Molisch, se hizo con 100 mg de α -naftol sublimado disuelto en 0.5 ml de etanol. En un tubo de ensaye pequeño se colocaron 2 a 5 mg de la muestra, se le añadió el reactivo y se resbaló por las paredes del tubo unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. La prueba fue positiva cuando apareció un anillo violáceo en la interfase.
- h) – Furano: La presencia de un anillo furano se pudo determinar mediante la prueba de Ehrlich. Se preparó una solución al 5% de p-dimetilaminobenzaldheido en etanol y después en cloruro de hidrógeno gaseoso. La prueba fue positiva al generarse un color naranja.
- i) – Insaturaciones. Prueba de bromo en tetracloruro de carbono. Se disolvieron 2 mg de la muestra en una solución de bromo al 3% en tetracloruro de carbono, se añadió gota a gota hasta que la coloración de bromo persista por varios minutos. Si en un principio, la coloración del bromo desaparece es indicativo de insaturaciones.

4.6.5. REVELADO EN PLACA CON AGENTES CROMOGÉNICOS

- a) - Luz ultravioleta. El cromatograma se expuso a la luz ultravioleta de onda larga proveniente de una lámpara UVGL-58 de 254-366 nm, se registraron las fracciones separadas y se calculó el Rf de cada una.
- b) - Vapores de yodo. Las placas cromatograficas se colocaron por 5 min en una cámara con 10 g de yodo resublimado. Los compuestos orgánicos separados generaron bandas color café los cuales fueron registrados.
- c) - Solución de cloruro de cobalto: Se roció el cromatograma con la solución de cloruro de cobalto disuelto en ácido sulfúrico, Se utilizó un atomizador unido a una bomba de vacío. Se

permitió evaporar el reactivo y se calentó en parrilla aproximadamente a 120°C durante 10 min. La muestra con saponinas desarrollaron manchas color violeta.

d) - Reactivo de Ehrlich- Es un revelador de sistemas tipo furano, pirrol o tiofeno. La placa cromatografica se roció con una solución al 5% de p-dimetilaminobenzaldehido en etanol y después se sometió a la acción de vapores de cloruro de hidrógeno gaseoso dentro de una cámara sellada durante 12 h. La presencia del grupo lactónico generó un color naranja.

e) - Reactivo de 2,4 dinitrofenilhidrazina. Es un agente cromogénico para grupos carbonilos. Se mezclaron 3 g de 2,4 Dinitrofenilhidrazina con 30 ml de ácido fosfórico al 80%, se calentó y después se diluyó en 185 ml de etanol al 95%. Se dejó reposar y se filtró. Se roció el reactivo sobre el cromatograma con un atomizador y se calentó a 100°C por 10 min. Los colores rosa o azul indicaron la presencia del grupo carbonilo.

f) - Tricloruro de antimonio. Se esparció una solución de tricloruro de antimonio al 10% en cloroformo sobre la placa y se calentó a 100°C. Se generaron manchas de color rojo para esteroides y azul o violeta para triterpenos.

g) - H₂SO₄ al 25% La aplicación de un rocío sobre el cromatograma con el reactivo y seguida de un calentamiento a 120 °C produjo manchas de diferente color, según el tipo de lípidos: rojo-púrpura para los esteroides. Aún en pequeñas concentraciones hay sensibilidad con este reactivo.

h) - Bicarbonato de sodio. La sal se preparó al 10% en agua, uno ó 2 mg de la muestra disuelta en agua o etanol y se mezcló con unas gotas de la solución de bicarbonato y la aparición de burbujas indicó la presencia de saponinas.

4.7. METODOS ESPECTROSCOPICOS

Las muestras procesadas por espectroscopía se disolvieron en dimetilsulfóxido.

4.7.1. INFRARROJO.- Los espectros se determinaron en la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en un espectrofotómetro FT-IR Paragon 1000 PC. Perkin Elmer por la Dra. Bertha Alicia Guajardo.

4.7.2. ULTRAVIOLETA.- Los análisis se llevaron a cabo en el Departamento de Química del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores Campus Monterrey, NL. Por la Dra. Elda Gómez. Se utilizó un espectrofotómetro L-Perkin Elmer SR.

4.7.3. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.- Se hicieron en la Unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UANL, por la M.C. Verónica Mayela Rivas Galindo. Se utilizó un espectrofotómetro Brucker-Avance DPX 400 MHz.

4.7.4. ESPECTROMETRIA DE GASES-MASAS.- Los análisis se hicieron en el Centro de Investigación en Química Aplicada por El Dr. Ernesto Elizalde en un cromatógrafo de gases-masas 5890 serie II de H.P. provisto de un detector selectivo de masas H.P. 5971.

5. RESULTADOS

5.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Las especies microbianas que se utilizaron en los estudios de actividad biológica se midieron por cuanta viable en placa (Tabla No. 1).

TABLA No. 1

5.1.1 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS QUE PRESENTARON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Microorganismo	Absorbancia	UFC
<i>E. coli</i>	0.008	255
<i>L. monocytogenes</i>	0.010	194
<i>S. aureus</i>	0.010	237
<i>V. cholerae</i>	0.011	302
<i>C. albicans</i>	0.008	262
<i>C. neoformans</i>	0.012	228
<i>M. canis</i>	0.009	184
<i>M. gypseum</i>	0.010	138
<i>T. tonsurans</i>	0.008	286
<i>S. schenckii</i>	0.012	244

Nota: Se eliminó el micelio de los hongos filamentosos y se trabajó solo con conidias.

5.1.2. BIOENSAYO PRELIMINAR

Las cuatro especies de *Agaves* mostraron actividad biológica sobre varias de las especies microbianas seleccionadas. El de espectro más amplio fue *A. picta* al inhibir 6 especies fúngicas (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. tonsurans*, *S. schenckii*, *C. albicans* y *C. neoformans*) y 4 especies bacterianas (*E. coli*, *S. aureus*, *V. cholerae* y *L. monocytogenes*). *A. lecheguilla* mostró mayor actividad sobre los dermatofitos (*M. canis*, *M. gypseum* y *T. tonsurans*). *A. scabra* mostró más acción sobre las levaduras seleccionadas (*C. neoformans* y *C. albicans*) y *A. lophanta* presentó mayor actividad sobre *C. albicans* (Tabla No. 2).

TABLA No. 2

5.1.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE AGAVES SOBRE LOS MICROORGANISMOS

Microorganismo	Inhibición en mm			
	<i>A. lecheguilla</i>	<i>A. picta</i>	<i>A. scabra</i>	<i>A. lophanta</i>
Bacterias				
<i>E. coli</i>	ND	13	ND	ND
<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND
<i>E. aerogenes</i>	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i>	ND	9	ND	ND
<i>P. aureginosa</i>	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i>	ND	12	ND	ND
<i>S. enteritidis</i>	ND	ND	ND	ND
<i>V. cholerae</i>	ND	10	ND	ND
<i>Y. enterocolitica</i>	ND	ND	ND	ND
Hongos				
<i>C. albicans</i>	17	16	20	20
<i>C. neoformans</i>	13	10	20	15
<i>M. canis</i>	19	16	9	10
<i>M. gypseum</i>	18	15	9	9
<i>T. tonsurans</i>	15	16	10	9
<i>S. schenckii</i>	10	16	9	10

ND = No detectada

5.1.3. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

La CMI para el crecimiento varió un rango de 2 a 18 mg/ml. (Tabla no. 3). Estos resultados demostraron la mayor acción antifúngica que poseen los extractos de agaves. Además se observó que las levaduras fueron más sensibles.

TABLA No. 3
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS
DE AGAVES

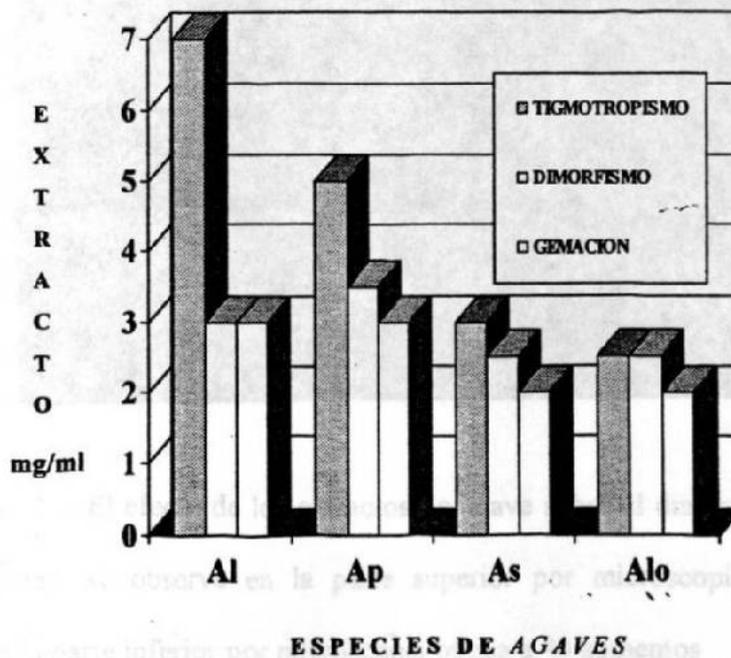
Microorganismo	Concentración en mg/ml			
	<i>A. lecheguilla</i>	<i>A. picta</i>	<i>A. scabra</i>	<i>A. lophanta</i>
Bacterias				
<i>E. coli</i>	NI	6.0 ± 1.3	NI	NI
<i>B. cereus</i>	NI	NI	NI	NI
<i>E. aerogenes</i>	NI	NI	NI	NI
<i>L. monocytogenes</i>	NI	18 ± 2.0	NI	NI
<i>P. aureginosa</i>	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i>	NI	7.0 ± 1.5	NI	NI
<i>S. enteritidis</i>	NI	NI	NI	NI
<i>V. cholerae</i>	NI	6.0 ± 1.0	NI	NI
<i>Y. enterocolitica</i>	NI	NI	NI	NI
Hongos				
<i>C. albicans</i>	2.5 ± 0.5	3.5 ± 0.3	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2
<i>C. neoformans</i>	3.0 ± 0.7	3.0 ± 0.3	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.4
<i>M. canis</i>	3.0 ± 0.3	3.5 ± 0.3	4.0 ± 0.8	5.0 ± 0.7
<i>M. gypseum</i>	3.0 ± 0.5	3.5 ± 0.6	4.0 ± 0.5	5.5 ± 1.0
<i>T. tonsurans</i>	3.5 ± 0.4	5.0 ± 1.2	5.0 ± 0.6	6.0 ± 1.4
<i>S. schenckii</i>	4.0 ± 1.0	5.0 ± 1.0	6.0 ± 1.0	6.0 ± 1.2

5.1.4. INHIBICIÓN DEL DIMORFISMO DE *C. albicans*

La inhibición del dimorfismo de *C. albicans* se registró entre los 2.5 y 5.0 mg/ml (Gráfica No 1). Con microscopía electrónica se observó que a dosis intermedia (3.5 mg/ml) la pseudohifa presentó ligeras alteraciones en membrana (Fig. No.3 superior). A dosis inhibitorias 5.0 mg/ml se observó la completa inhibición de la filamentación, aunque se presentó gemación, ésta fue irregular y la membrana celular mostró el daño ocasionado por el compuesto activo y su deformación (Fig. No 4 superior), nos sugiere una alteración en la permeabilidad de la membrana interfiriendo con ello en la filamentación de esta levadura.

Gráfica No. 1

CONCENTRACION INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS DE AGAVE SOBRE EL TIGMOTROPISMO, DIMORFISMO Y GEMACION DE *Candida albicans*.



DIMORFISMO DE *C. albicans*

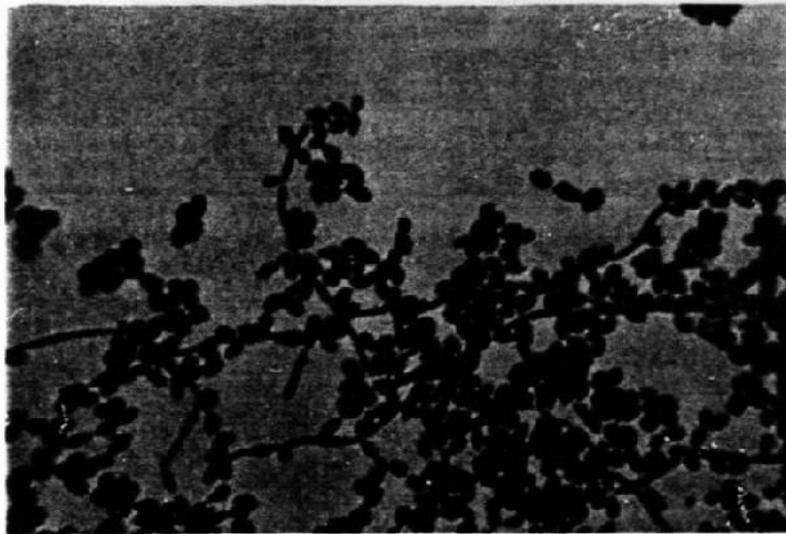
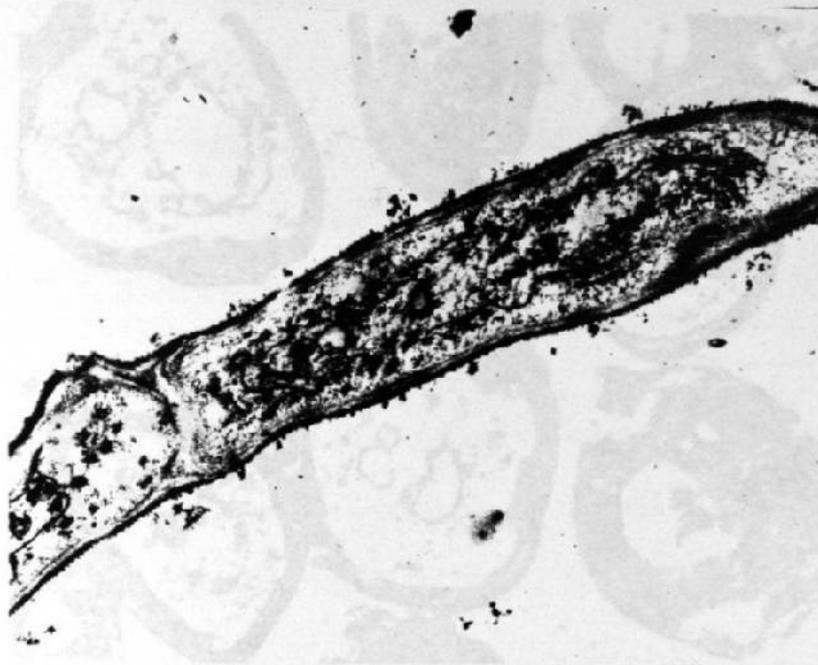


Fig. No. 3 .- El efecto de los extractos de agave sobre el dimorfismo de *C. albicans* a dosis intermedias, se observa en la parte superior por microscopía electrónica a 7,000 aumentos y en la parte inferior por microscopía óptica a 40 aumentos

INHIBICION DEL DIMORFISMO DE *C. albicans*

5.1.5 INHIBICION DEL TRIGMOTROPISMO

La inhibición del dimorfismo de *C. albicans* a 7 mg/ml del extracto de Agave... actividad sobre el...
por dosis 7 mg/ml...
(sin extracto) la...
que se produjo el tubo...
en la membrana...
producción de...
(9)

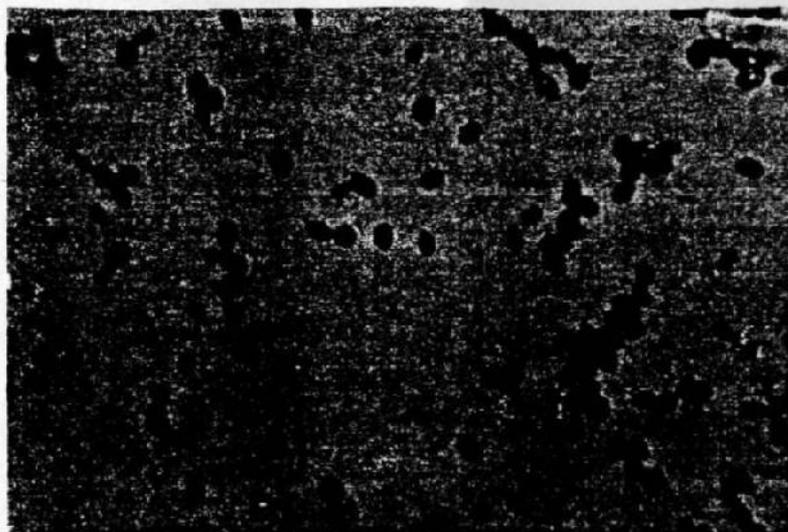


Fig. No. 4 .- El efecto de los extractos de agaves sobre el dimorfismo de *C. albicans* a dosis inhibitorias se observa en la parte superior por microscopía electrónica a 7,000 aumentos y en la parte inferior por microscopía óptica a 40 aumentos.

5.1.5. INHIBICION DELTIGMOTROPISMO

La inhibición del tigmotropismo de *C. albicans* se observó entre 2.5 a 7 mg/ml del extracto. De los cuatro extractos el de *A. lophanta* presentó mayor actividad sobre el tigmotropismo al inhibirlo con 2.5 mg/ml. *A. lecheguilla* requirió la mayor dosis 7 mg/ml. (Gráfica No. 1). La microscopía óptica nos muestra en el control negativo (sin extracto), la filamentación del hongo sobre la superficie inerte (Fig. No.5), después que se produjo el tubo germinativo de la levadura en suero humano. La adhesión de los filamentos en la membrana de polietileno se logró inhibir con los extractos, lo que indica que no hubo producción de adhesinas al interrumpirse el mecanismo tigmotrópico de *C. albicans* (Fig. No. 6).



Fig. No. 5.- Tigmotropismo (adhesión)

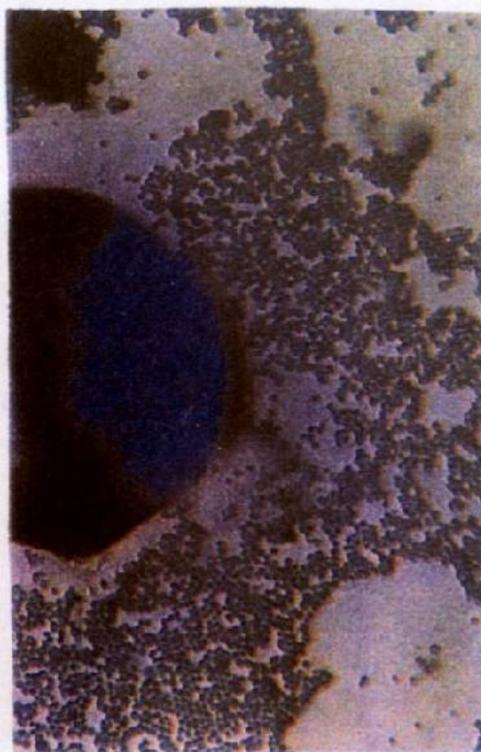


Fig. No. 6. Inhibición del tigmotropismo

Con los resultados obtenidos en los bioensayos se permitió determinar el perfil antimicrobiano de cada extracto en donde *A. lecheguilla* demostró ser el más activo contra los dermatofitos seleccionados en este trabajo. *A. picta* presentó el espectro más amplio al inhibir el crecimiento de 10 de los 15 microorganismos estudiados. *A. scabra* exhibió gran actividad sobre las levaduras y *A. lophanta* mostró el mayor efecto contra el tigmotropismo, dimorfismo y gemación de *C albicans*.

5.1.6. DETECCIÓN BIOAUTOGRAFICA DEL COMPUESTO ACTIVO

La localización del compuesto activo por el método bioautográfico, se ubicó en la zona polar del cromatograma con Rf de 0 a 0.25 (Fig. No. 5). Este método resultó más rápido eficaz y económico de los 3 practicados (difusión, dilución y bioautográfico). La modificación del método original (Hamburger) redundó en economía de material, tiempo y equipo especial.

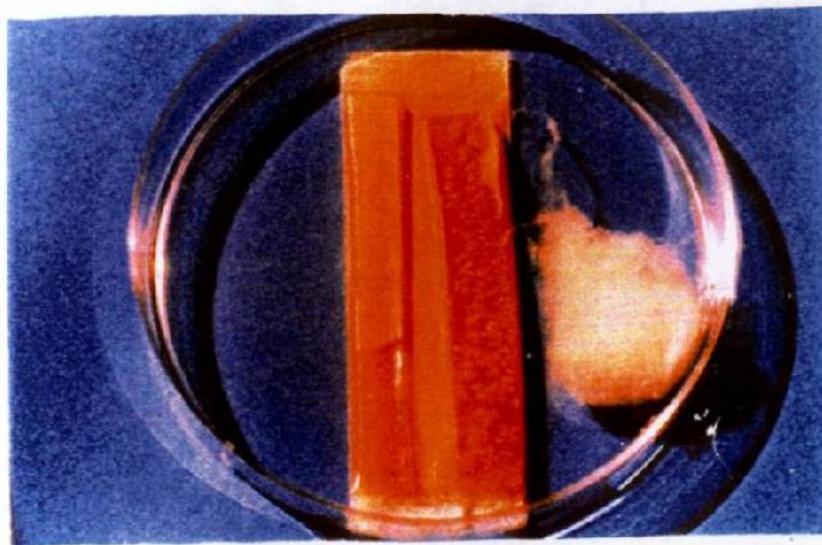


Fig. No. 7.- Detección bioautográfica de la fracción activa de *A. lophanta* sobre *C. albicans*

5.2. SEPARACION CROMATOGRAFICA

El sistema de eluentes utilizado en cromatografía en capa fina, que separó mas eficientemente los extractos fue cloroformo-metanol en una proporción de 5:1. Se obtuvieron 5 bandas . La No. 1 fue la responsable de la actividad antimicrobiana. (Tabla No. 4).

TABLA No. 4

**SEPARACION CROMATOGRAFICA DEL COMPUESTO ACTIVO DE LOS
EXTRACTOS ETANOLICOS DE AGAVE**

FRACCION	Rf	COLOR UV	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
<u>1</u>	<u>0.25</u>	<u>AZUL</u>	<u>POSITIVA</u>
2	0.27	VERDE	NEGATIVA
3	0.43	ROJO	NEGATIVA
4	0.72	AMARILLO	NEGATIVA
5	1.00	ROJO	NEGATIVA

Fración activa subrayada

5.2.2. PRUEBAS QUÍMICAS

Las pruebas a las que fueron sometidos los extractos, detectaron los compuestos

5.2.1. CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

La cromatografía en capa delgada preparativa de los extractos se utilizó para separar la fracción activa que se reveló con UV de color azul en un Rf de 0 – 0.25 (Fig. No. 8).

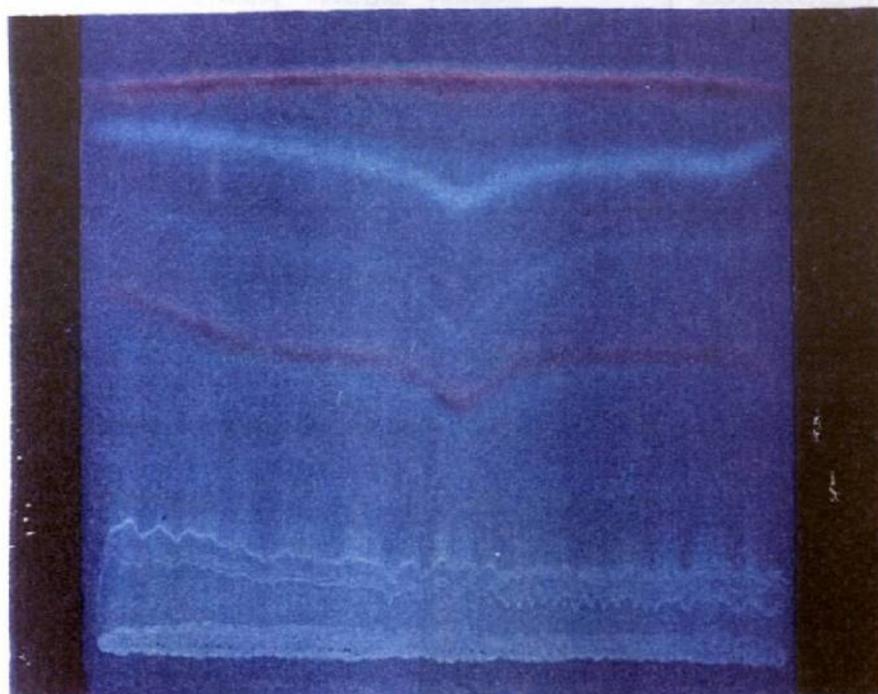


Fig. No. 8.- Cromatografía en capa delgada del extracto etanólico de *A. lecheguilla*

Fig. No. 9.- Revelado cromatográfico de *A. sagra*.

5.2.2. PRUEBAS QUIMICAS

Las pruebas a las que fueron sometidos los extractos, detectaron los compuestos químicos: taninos, flavonas, cumarinas, azúcares y saponinas. Estas últimas resultaron ser las responsables de la actividad antimicrobiana (Tabla No. 5).

TABLA No. 5

PRUEBAS QUIMICAS DE GRUPOS FUNCIONALES POSITIVAS CON LOS EXTRACTOS METANOLICOS DE AGAVE

PRUEBAS	COLOR	COMPUESTO
LIEBERMANN-BURCHARD	AZUL- VERDE	ESTEROLES
SALKOWZKY	ROJO-LADRILLO	SAPONINAS
NaOH + HCL	AMARILLO	LACTONAS
FEHLING	ROJO	CARBOHIDRATOS
BROMO	ANARANJADO	INSATURACIONES
MOLICH	VIOLETA	CARBOHIDRATOS

5.2.3. REVELADO CROMATOGRAFICO

Los revelados en placa confirmaron la presencia de saponinas al detectar la presencia de grupos funcionales que forman parte su estructura (Tabla No. 6), (Fig. No. 9).

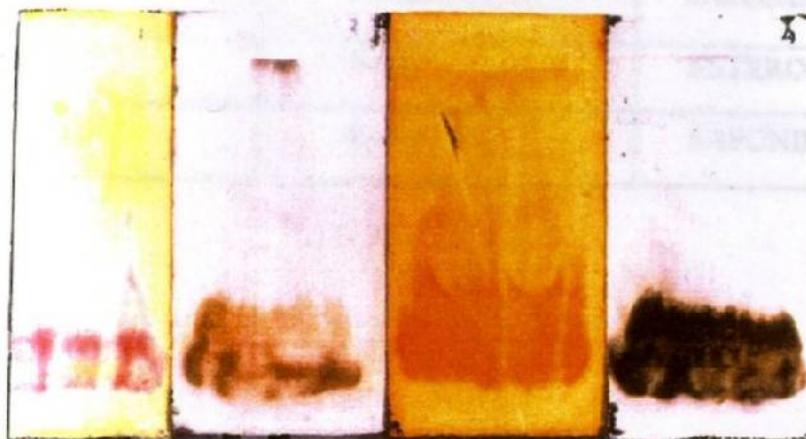


Fig. No. 9.- Revelado cromatográfico de *A. scabra*.

TABLA No. 6**AGENTES CROMOGENICOS POSITIVOS CON LOS EXTRACTOS METANOLICOS DE AGAVE ESTUDIADOS**

REVELADORES	COLOR	GRUPO QUÍMICO
LUZ ULTRAVIOLETA	AZUL	SIST. PLANARES
VAPORES DE YODO	CAFE	COMP. ORGANICOS
CLORURO DE COBALTO	NEGRO	COMP. INSAT.
TRICLORURO DE ANTIMONIO	VIOLETA	TRITERPENOS
	ROJO	ESTEROIDES
AC. SULFURICO	CAFÉ-NEGRO	CARBOHIDRATOS
DNFH	ROSA- AZUL	CARBONILO
EHRlich	NARANJA	FURANO
ACIDO TRICLORACETICO	VERDE	SAPONINAS
AC. SULFURICO 25%	ROJO	ESTEROLES
SANGRE	BLANCO	SAPONINAS

5.2.4. ANALISIS HEMOLITICO DEL COMPUESTO ACTIVO

La actividad hemolítica de las saponinas se demostró cuando el compuesto activo se localizó en el cromatograma aspergado con sangre diluida 1/3 con solución salina. El cromatograma mostró una banda clara bien definida sobre un fondo rojo, la zona que presentó hemólisis se ubicó en el mismo Rf donde se presentó la actividad antimicrobiana en la bioautografía (Fig. No. 10).

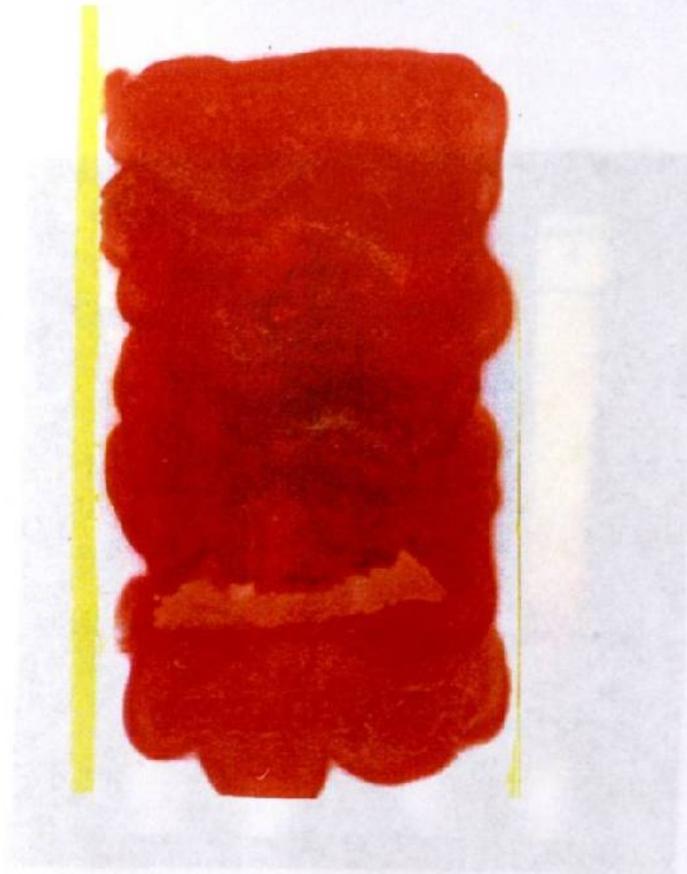


Fig. No. 10.- Localización hemolítica de las saponinas del extracto metanólico de *A. lecheguilla*, con sangre humana

5.2.5. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO ACTIVO

El material vegetal seco y molido se extrajo con solventes de diferente polaridad (hexano, cloroformo y metanol). El rendimiento de los extractos macerados fue de 4-6 %, los refluados de 2-4% y los purificados por cromatografía invertida fue de 0.2-0.4 %.

El compuesto activo se aisló y purificó con repetidas eluciones con coloroformo-metanol 5:1 en columna invertida (Fig. No. 11)

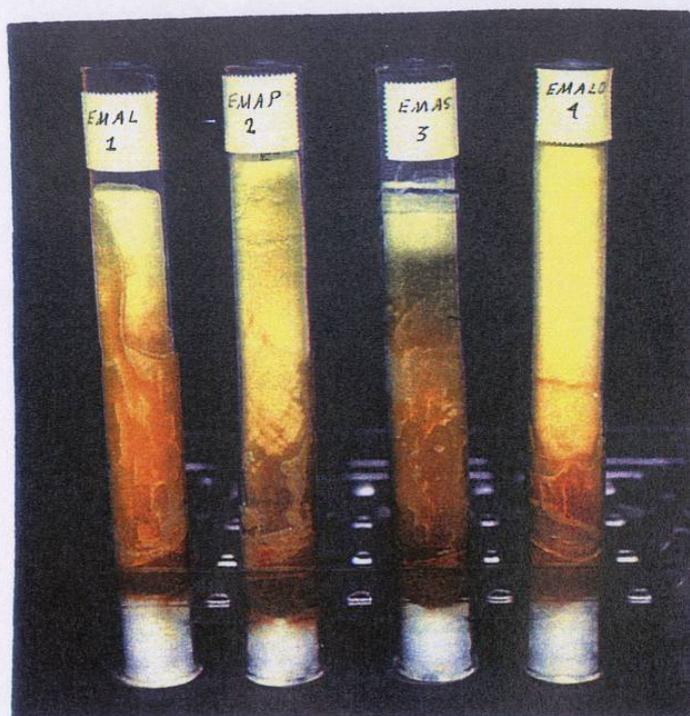


Fig. No. 11 .- Columna invertida de los extractos metanolicos de agave.

5.3. RESULTADOS ESPECTROSCOPICOS

Los resultados espectroscópicos de cada extracto se recopilaron en una sola tabla para facilitar la correlación y obtener una visión general de todos los análisis practicados: *A. lecheguilla* (Tabla No. 8), *A. picta* (Tabla No. 9), *A. scabra* (Tabla No. 10), *A. lophanta* (Tabla No. 11).

Los análisis espectroscópicos en IR de los cuatro extractos metanólicos, mostraron señales de absorción en 3400 cm^{-1} (OH), la señal 2930 cm^{-1} registró la tensión de los grupos metilos, la señal a 1650 cm^{-1} detectó la vibración del doble enlace (C = C). También se detectó la presencia del gem dimetilo a $1455\text{-}1381\text{ cm}^{-1}$ ($\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), además el pico prominente a $1023\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$ corroboró la presencia de los grupos oxidrilo por el enlace (C - O). El pico a 896 cm^{-1} es una señal característica para compuestos espiroacetálico. Además se observó absorción a 697 cm^{-1} que nos indica la presencia de un anillo con doble enlace.

Los cuatro espectros en UV, presentaron una máxima de absorción a $205\text{ }\lambda$ ($E = 6580$) del doble enlace y otra a $268\text{ }\lambda$ que refiere un grupo cetónico.

El espectro $^1\text{HRMN}$ mostró señales diagnósticas de grupos metilos primarios a $\delta 0.72$ (3H del metilo en el C- 27), $\delta 0.82$ (3 H de los metilos 18), metilos secundarios a $\delta 1.02$ (3H C-21), 3.45 (1H de $3\beta\text{ H}$). La presencia del anillo E se mostró con las características absorciones a $\delta 4.29 - 4.28$ para el H del C16. Se observaron también señales de protones anoméricos a $\delta 4.25, 4.30, 4.41, 4.58, 4.62$ y 4.74 ppm. un fuerte indicio de grupo oxidrilo se presentó a 3.50 del C-23.

Las señales a campo alto de los espectros en $^1\text{HRMN}$ indican la naturaleza cetónica de los cuatro extractos. El desplazamiento químico hasta 5 ppm indican la presencia de un enlace vinílico, grupo alquilo, alílico e hidroxílico (Tabla No. 7).

TABLA No. 7

5.3.1. DESPLAZAMIENTO QUIMICO PROTONICO DEL COMPUESTO ACTIVO

EN ¹HRMN

TIPO DE PROTON	GRUPO QUIMICO	ppm
Alquilo 1°	RCH_3	0.8-1.0
Alquilo 2°	RCH_2R	1.2-1.4
Alquilo 3°	R_3CH	1.4-1.7
Alílico	$ \begin{array}{c} R_2C = C - CH_3 \\ \\ C \end{array} $	1.6-1.9
Alcohol	$HOCH_2R$	3.3-4.0
Hidroxilo alcohólico	ROH	0.5-5.0

En los espectros en ¹³CRMN de los extractos se observó una señal de resonancia debido a un carbón cuaternario a δ 108.4 – 110 ppm que corresponde al C-22 unido a 2 átomos de oxígeno que nos sugiere la naturaleza esteroide del compuesto. Además se encontró un carbón olefínico a δ 121.7 que corrobora lo anteriormente dicho. La señal de resonancia a δ 62.3 del C-6 puede corresponder al grupo metileno hidroxilo o a un glicopiranosido no sustituido. Otro grupo hidroxilo, puede estar ubicado en el C-23 a δ 70.9 y otro más en el C-3 a δ 80-81 ppm.

También se muestran señales de carbonos anoméricos a δ 100.0, 101.9, 102.0, 102.8, 103.3, 104.0 que indican la presencia de azúcares en los extractos de *A. Lecheguilla*,

A. picta y *A. lophanta*. *A. scabra* solo presenta una señal a 104.7 lo que indica la poca cantidad de azúcares que contiene este extracto.

El peso molecular del extracto de *A. scabra* fue de 446 $[M]^+$, su fragmentación espectral de masas mostró un ion pico base a 139 m/e que corresponde a $C_9H_{15}O$ característico de saponinas. En el caso del extracto *A. lecheguilla* el pico base se ubicó a 44 m/e que corresponde a una cadena C_2H_4O . Otro fragmento desprendido de este compuesto fue a 139 m/e. La espectrometría de masas de los extractos de *A. picta* y *A. lophanta* no fue posible desarrollarlos por su alto contenido de azúcares así como su escasa volatilidad y la ruptura casi instantánea del enlace hemiacetalico de los glicósidos.

Las pruebas químicas de Liebermann-Burchard, Salkowski, Ehrlich así como la información espectroscópica sugieren una molécula de tipo esteroideal (Fig. No. 12). El compuesto muestra insaturaciones (IR, = 1640 cm^{-1} ; UV, 205 nm). Además se observaron señales de grupos oxidrilos (IR = 3400.25; $^1\text{HRMNa}$ δ 3.42 ó 3.62 ppm, $^{13}\text{CRMN}$ a δ 80.0-82.2 ppm). Las diferencias se encontraron en la cantidad y tipo de azúcares que en el caso de *A. lecheguilla* y *A. picta* el principal carbohidrato fue glucosa (glicósidos esteroidales), en *A. lophanta* (4) se encontró galactosa como principal azúcar y en *A. scabra* xilosa.

TABLA No. 8

5.3.2. RESULTADOS DE LOS ANALISIS ESPECTROSCÓPICOS DE
Agave lecheguilla Torr.

2D-RMN δ (ppm)	¹³ CRMN δ (ppm)	¹ HRMN δ (ppm)	IR cm ⁻¹	EM m/e	UV λ (nm)
108.33 - 4.94	128.31	4.94	3435	44	205
102.86 - 3.65	127.84	4.64	2924	139	268
80.25 - 4.25	110.38	4.25	2728	207	
65.77 - 3.18	108.33	3.65	2110	79	
62.63 - 3.65	104.71	3.42	1731	73	
61.03 - 3.42	103.34	3.18	1655		
55.76 - 1.12	102.86	3.04	1455		
39.21 - 1.66	101.95	1.66	1378		
29.54 - 1.47	81.4	1.47	1023		
23.40 - 1.97	78.59	1.31	896		
	76.74	1.21	777		
	75.60	1.12	636		
	73.82	1.06			
	70.05	0.72			
	65.77				
	62.63				
	61.03				
	55.76				
	41.50				
	39.21				
	41.06				
	39.21				
	34.50				
	29.54				
	23.40				
	17.92				
	16.16				
	14.60				

TABLA No. 9

5.3.3. RESULTADOS DE LOS ANALISIS ESPECTROSCOPICOS DE
Agave picta Salm-Dick

2D- RMN δ (ppm)	¹³ CRMN δ (ppm)	¹ HRMN δ (ppm)	IR cm ⁻¹	EM m/e	UV λ (nm)
55.50 - 1.13	110.30	5.17	3400	—	205
39.90 - 2.50	108.72	4.98	2940		258
39.25 - 1.66	104.44	4.65	1635		
31.00 - 2.11	103.90	4.27	1480		
29.67 - 1.32	102.78	3.89	1395		
26.23 - 1.08	101.86	3.57	1083		
23.45 - 1.48	81.74	3.24	902		
20.33 - 1.22	78.52	3.13	620		
17.85 - 0.72	76.65	3.11			
16.92 - 0.92	75.62	3.05			
15.44 - 0.88	73.74	1.13			
14.53 - 0.77	70.15	0.87			
13.27 - 0.84	62.85	0.84			
	60.95	0.72			
	39.29	0.70			
	34.80				
	26.23				
	23.32				
	20.34				
	17.80				
	16.98				
	16.14				
	15.44				
	14.53				
	13.27				

TABLA No. 10

5.3.4. RESULTADOS DE LOS ANALISIS ESPECTROSCOPICOS DE
Agave scabra Salm-Dick

2D-RMN δ (ppm)	¹³ CRMN δ (ppm)	¹ HRMN δ (ppm)	IR cm ⁻¹	EM m/e	UV λ (nm)
108.31 - 4.9	108.31	4.96	3409	139	205
78.56 - 3.11	104.71	4.65	2929	255	278
61.94 - 3.49	82.14	4.27	2385	44	
55.67 - 1.09	80.23	3.77	2282	69	
41.03 - 1.72	78.56	3.75	1625	284	
39.84 - 2.50	76.68	3.57	1457		
31.38 - 1.23	75.55	3.42	1381		
29.74 - 1.49	73.49	3.36	1112		
28.42 - 1.32	70.00	3.34	778		
23.38 - 1.09	65.85	3.31	669		
20.38 - 0.88	61.94	3.28			
17.03 - 0.85	55.67	3.25			
16.15 - 0.70	40.16	3.19			
	39.84	3.11			
	34.84	3.07			
	29.74	1.49			
	26.28	1.32			
	20.30	1.23			
	17.03	1.13			
	16.15	1.09			
	14.58	0.86			
		0.74			
		0.72			
		0.70			

TABLA No. 11

5.3.5. RESULTADOS DE LOS ANALISIS ESPECTROSCOPICOS DE
Agave lophanta Schdiele

2D-RMN δ (ppm)	¹³ CRMN δ (ppm)	¹ HRMN δ (ppm)	IR cm ⁻¹	EM m/e	UV λ (nm)
121.17 - 5.34	121.17	5.34	3440	—	205
109.61 - 5.16	109.61	4.99	2975		270
104.24 - 4.49	108.42	4.85	2392		
102.90 - 4.25	104.24	4.59	1650		
80.19 - 4.59	103.32	4.49	1450		
76.57 - 3.05	102.90	4.43	1370		
70.05 - 3.05	101.97	4.25	1084		
68.71 - 3.67	96.88	3.74	898		
63.04 - 3.74	81.86	3.67	620		
61.19 - 3.47	76.57	3.54			
55.66 - 2.49	73.53	3.47			
39.42 - 2.52	70.07	3.40			
31.47 - 1.53	68.71	3.35			
31.47 - 1.53	63.04	3.24			
31.47 - 1.49	61.19	3.21			
29.80 - 1.13	55.66	3.19			
20.06 - 0.98	49.39	3.16			
17.09 - 0.84	41.09	3.14			
16.04 - 0.72	37.25	3.05			
14.65 - 0.86	29.80	1.53			
	20.06	1.49			
	17.09	1.13			
	16.04	1.10			
	14.65	0.98			
		0.89			
		0.84			
		0.72			

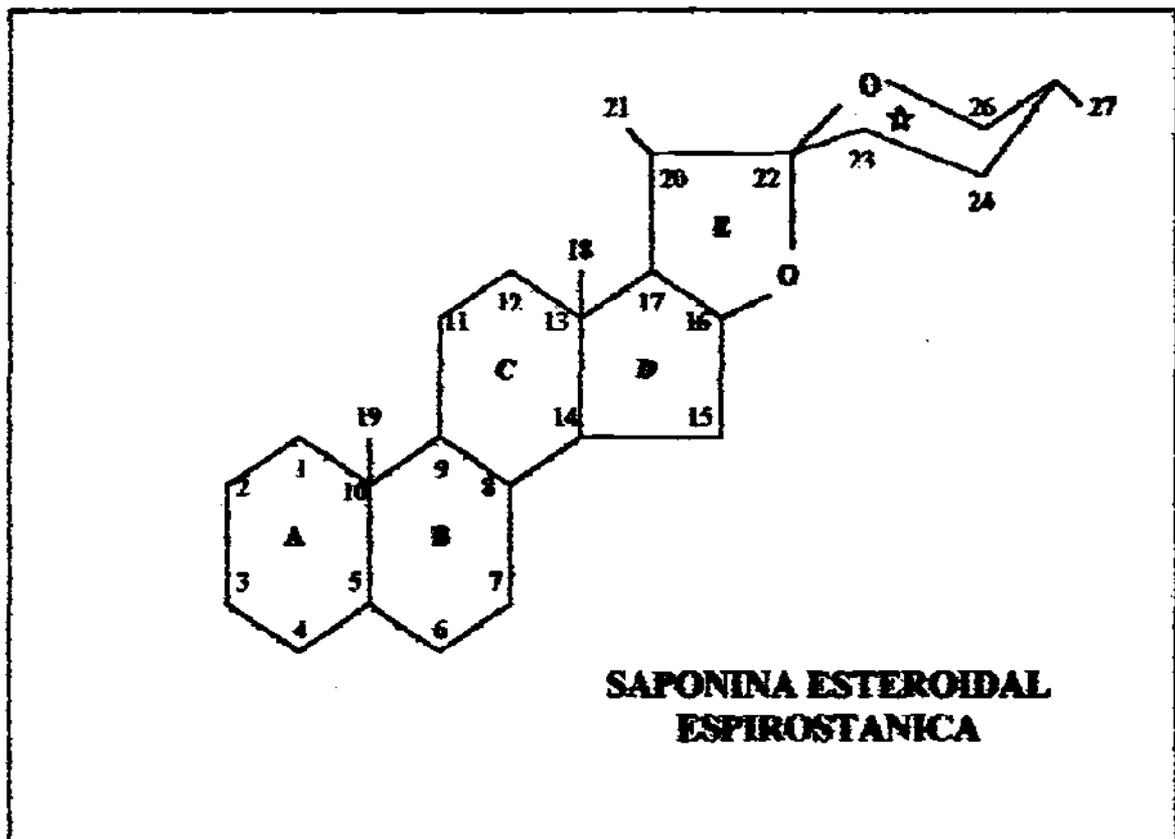
5.3.6. ESTRUCTURA BÁSICA DEL COMPUESTO ACTIVO.

La diferencia entre los cuatro extractos de agaves se encontró en la cantidad y tipo de glucósidos unidos al núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, el cual posee además un anillo espirostanico (☆).

FIGURA No. 12

ESTRUCTURA BASICA DEL COMPUESTO RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA EN LAS CUATRO ESPECIES DE AGAVE:

A. lecheguilla, *A. picta*, *A. scabra* y *A. lophanta*.



6. DISCUSIÓN

El propósito principal de este estudio fue evaluar el potencial antimicrobiano de los extractos de las plantas estudiadas, así como conocer la naturaleza química del compuesto responsable de la actividad antimicrobiana. La selección de las plantas se apoyó en la hipótesis etnobotánica (conocimiento herbario), que es un criterio muy importante además de ser un factor predictivo para identificar nuevos agentes terapéuticos. Nos abocamos a demostrar la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de agaves, aún cuando Mitchell en su libro sobre plantas medicinales africanas en 1962 aseveró lo contrario.

Los resultados señalan que las cuatro especies de agaves estudiadas, tienen actividad antifúngica. Solo *A. picta* mostró su papel como antibacteriano, además del antifúngico. De los 15 microorganismos probados, se inhibieron 10 y de estos 6 fueron hongos. En los bioensayos microbiológicos se hizo cuenta en placa, para determinar la concentración celular del inóculo. Sin embargo, los microorganismos con dispersión homogénea ausente se procesaron de manera diferente, con la intención de eliminar los cúmulos de micelio que interfieren en una correcta lectura espectrofotométrica. Con ayuda de un hematocitómetro se corroboró el número de conidias contenidas en la suspensión celular como lo hizo Manavathu en su trabajo con *Aspergillus fumigatus* en 1996.

Se probaron los extractos macerados con etanol así como los refluados con metanol, sobre los 15 microorganismos seleccionados. Se utilizaron 3 métodos diferentes: difusión, dilución y bioautográfico. Este último resultó ser el más adecuado para nuestro trabajo que requirió conjuntar aspectos microbiológicos y fitoquímicos. Además, la modificación que se hizo a la técnica original practicada por Hamburger en 1987, redundó en ahorro de tiempo, material y equipo especial.

Los resultados en la CMI nos señalan al extracto de *A. picta* como el de más amplio espectro al inhibir 10 de los 15 microorganismos estudiados. El extracto de *A. lecheguilla* mostró una acción antidermatofítica mayor, al inhibirlos con menor concentración. Los extractos de *A. scabra* registraron mayor acción contra levaduras y *A. lophanta* fue el que ejerció mejor efecto sobre el tigmotropismo y dimorfismo de *C. albicans*. Además si tenemos en cuenta que el 80% de los adultos padece algún tipo de micosis, este estudio podría beneficiar a la mayoría de la población.

Los resultados obtenidos en los bioensayos con *C. albicans* nos indican que los extractos de agaves poseen gran capacidad inhibitoria sobre las levaduras y por ende sobre sus mecanismos moleculares, como nos asegura Stencel con su trabajo en 1999, la patogenicidad de *Candida* se apoya en la producción de adhesinas y formación de micelio, que facilitan su instalación en los tejidos humanos. De allí la importancia de buscar la inhibición de estos fenómenos fúngicos: dimorfismo y tigmotropismo, los cuales activan mecanismos moleculares que según lo expone Nimii en 1997, son de origen genético, enzimático o bioquímico.

Aunque los cuatro extractos mostraron actividad sobre el dimorfismo, tigmotropismo y gemación de *C. albicans*, los extractos de *A. scabra* y *A. lophanta* mostraron mayor capacidad inhibitoria. Esto nos indica que los agaves son una posible alternativa para eliminar el peligro que representa la transformación morfológica de *Candida* y por ende su incidencia que se ha incrementado de forma alarmante en los últimos años, como lo demostró White en su estudio en 1997.

Por medio de la microscopía electrónica y de fluorescencia se observaron los efectos de los extractos sobre la levadura, la cual sufre alteraciones en su membrana celular y nuclear,

además se produjeron grandes vesículas que nos refiere daño interno que posiblemente influye en los procesos intracelulares de naturaleza genética como lo expuso Stewart en 1995.

Las pruebas químicas mostraron que los compuestos contenidos en los extractos etanolicos son taninos, flavonas, cumarinas, saponinas y azúcares. Los extractos que se refluaron por extracción continua con solventes de polaridad creciente, se separaron por cromatografía con cloroformo-metanol 5:1 y se observaron 5 fracciones, de las cuales la banda con Rf de 0 a 0.25 correspondió al compuesto responsable de la inhibición. Esta fracción se aisló por cromatografía en columna normal e invertida.

La presencia de saponinas en la fracción aislada se demostró con las pruebas químicas que presenta el maestro Domínguez en su libro de Fitoquímica en 1988, la de Salkowski y Liebermann-Burchard hace suponer que las saponinas son la causa de la inhibición antimicrobiana. La naturaleza esteroideal se sospechó cuando se desarrolló un color azul-verde con esta prueba, que es característico de este tipo de compuestos, no así con las saponinas triterpénicas que generan un color rojo. Los carbohidratos se pusieron de manifiesto con las pruebas de Molisch y Fehling. De acuerdo al resultado de Uniyal en 1990 los glucósidos presentan un perfil parecido a los encontrados en nuestros extractos. Las insaturaciones de la molécula fueron demostradas con la prueba con $KmnO_4$. El anillo furanósico contenido en el compuesto se detectó con la prueba de Ehrlich.

La hemólisis de las saponinas quedó de manifiesto al aspergar el cromatograma de los extractos con sangre y observar una zona hemolítica en el mismo lugar donde se visualizó la actividad antimicrobiana en la bioautografía ($R_f = 0-0.25$). Vázquez en 1962 nos expone esta propiedad de las saponinas y agrega que no son absorbidas en el intestino, por lo que se elimina el peligro de un posible tratamiento sintomático con estos compuestos..

La sospecha generada por las pruebas químicas, que las saponinas esteroidales son los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana se confirmó con los resultados de los análisis espectroscópicos. De los cuatro extractos al de *A. picta* y *A. lophanta* no fue posible practicárseles espectrometría de masas, debido a su escasa volatilidad y a la casi instantánea ruptura del enlace hemiacetalico de los glicosidos. El extracto de *A. scabra* mostró un PM de 446 con un prominente pico base a 139 m/e (Tabla No. 10, Anexo p) generado por el desprendimiento de un sistema anular espiroacetálico ($C_9H_{13}O$). Este pico base confirmó que los grupos hidroxilo no se localizan en los anillos E o F (Vladimirov 1991). En el caso del extracto de *A. lectuquilla*, el pico base se ubicó en 44 m/e (Tabla No. 8, Anexo f) producido por la fragmentación de una cadena C_2H_4O unida al grupo espiroacetálico. Además también se observó un pico a 139 m/e característico de saponinas.

Los espectros en IR de los 4 extractos mostraron señales similares de grupos químicos específicos que integran la molécula de saponina. Las señales típicas de los estiramientos del grupo hidroxilo registraron en una gran banda a 3400 cm^{-1} , los estiramientos de los enlaces de los grupos metilos se observaron en 2900 cm^{-1} . La vibración del doble enlace se detectó en 1640 cm^{-1} . Las vibraciones tipo tijera del gem dimetilo, exhibió una pequeña absorción en $1420\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$. El pico prominente que se generó a $1023\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$, corroboró la presencia del grupo oxidrilo. La absorción registrada en $865\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ pone de manifiesto la presencia de un enlace espiroacetálico y por último la señal en $600\text{-}690$ sugiere la presencia de aun anillo con doble enlace (Tabla No. 8,9,10 y 11. Anexos b, h, ll y r)

Los espectros en $^1\text{HRMN}$ de los 4 extractos presentaron perfiles semejantes aunque observaron características distintivas cada uno. Las señales diagnósticas de los grupos metilos se observaron con un desplazamiento químico a $\delta\ 0.82$ (3 H del metilo en el C-18) y 0.72 (3 H

del metilo del C-27), 1.02 (3 H del metilo de C-21). La presencia del anillo E intacto se mostró con la característica absorción a δ 4.29 - 4.28 ppm para el H del C-16. (Yang 1989). Se observaron señales de protones anoméricos a δ 4.25, 4.30, 4.41, 4.58 4.62, 4.74 ppm en los extractos No. 1, 2 y 3 y a δ 4.37, 4.49, 4.99 y 5.3 ppm en el extracto No. 4 (Tablas 8,9,10 y 11. Anexos d, j, n y v) como las encontradas en el trabajo desarrollado por Uniyal en 1990. Otra señal de la presencia de un grupo hidroxilo puede ubicarse en el C-23 a δ 3.50 ppm como lo demostró Putulan en 1999. El espectro en $^{13}\text{CRMN}$ exhibió señales de carbonos anoméricos a δ 100.0, 101.9, 102.0, 102.8, 103.3, 104.0, 104.5 ppm en los extractos: *A. lecheguilla*, *A. picta* y *A. lophanta*, que confirmó la unión de 7 unidades de azúcares al núcleo ciclopentano-perhidrofenantrero. En el caso del extracto de *A. scabra* se observó una señal a δ 104.7 ppm. lo que sugiere que este extracto no tiene muchas uniones glicosídicas. El esqueleto espiroestánico se determinó por la resonancia a δ 108.6–110.0 ppm del C-22. La orientación del metilo del C-27 fue confirmado por la señal a δ 16.2 ppm como lo señaló Abdel –Gawad en 1998. Una señal que confirma el grupo hidroxilo en el C-23 es a δ 70.9 ppm. Otra señal que involucra la formación de un enlace glicosídico en el C-3 es a δ 80-81 ppm. (Tablas 8,9,10 y 11. Anexos e, k, o, y t)

Los espectros en UV de los cuatro extractos mostraron absorción para dobles enlaces con una fuerte señal a 205 λ , característica de saponinas y otra del grupo cetónico a 268 λ , como lo expone Domínguez en 1988. (Tablas 8,9,10 y 11. Anexos a, g, l y q).

Con todos estos resultados se confirma que el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana en los cuatro extractos de agaves, es una saponina esteroideal espiroestánica y la diferencia entre los cuatro extractos se encuentra en el tipo y cantidad de glucósidos unidos al núcleo ciclopentanoperhidrofenantrero

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el objetivo establecido en este trabajo se cumplió al determinarse la actividad antimicrobiana de las cuatro especies de agaves estudiadas.

- La actividad antimicrobiana presentada por los extractos etanolicos de *A. lecheguilla*, *A. picta*, *A. scabra* y *A. lophanta* correspondió a las saponinas esteroidales espirostánicas presentes en las hojas de las plantas.
- La inhibición del tigmotropismo y dimorfismo de *C. albicans* se manifestó en los cuatro extractos de agaves, aunque fue más marcada con *A. lophanta* y *A. scabra*.
- La actividad biológica ejercida sobre las cepas fúngicas la presentaron las cuatro especies de *Agaves*
- *A. lecheguilla* exhibió la acción más fuerte sobre los dermatofitos *M. canis*, *M. gypseum* y *T. tonsurans*.
- *A. picta* presentó el espectro más amplio al inhibir hongos levaduriformes y filamentosos así como bacterias gram positivas y gram negativas.
- La modificación hecha a la técnica original bioautográfica de Hamburger, redundó en ahorro de tiempo, material y equipo especializado.
- La estructura básica del compuesto responsable de la actividad antimicrobiana, fue el ciclopentanoperhidrofenantreno con un anillo espirostánico.
- La cantidad y tipo de glucósidos marcó la diferencia entre los compuestos activos de los cuatro extractos de agaves.
- Los resultados indican que las plantas seleccionadas poseen un gran potencial antimicrobiano, lo que nos hace pensar en una alternativa en el campo terapéutico.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACION

- 1- Probar el compuesto bioactivo de agaves sobre otra clase de organismos.
- 2- Mostrar la presencia de adhesinas y determinar su efecto en la patogenicidad de *C. albicans*.
- 3- Determinar la relación que existe entre la producción de proteínas del stress y el dimorfismo y tigmotropismo de *C. albicans*.
- 4- Estudiar el mecanismo de acción del compuesto activo.
- 5- Desarrollar en el laboratorio tejidos vegetales de agaves que contengan el compuesto activo.
- 6- Evaluar la toxicidad del compuesto activo en cultivo de células humanas o en animales.
- 7- Buscar el estadio de la planta que contenga mayor concentración del compuesto activo.

8. LITERATURA CITADA

- Abdel-Gawa D M.M., El-Sayed M.M., Abdel-Hameed E.S. 1999. Molluscicidal Steroidal Saponins and Lipid Content of *Agave decipiens*. *Phytotherapy*. 70. pp 371-381.
- Acebes B., Diaz-Lanza A.M. and Bernabé M. 1998. A Saponin from the Roots of *Gypsophila bermejoi*. *Phytochemistry*. 49/7, pp. 2077-2098.
- Adikaram N.K.B., Ewing D.F., Karunaratne A.M. and Wijerante E.M. 1992. Antifungal Compound from Immature Avocado Fruit Peel. *Phytochemistry*. 31/1, pp.93-96.
- Ahmad V.U., Khalig U.Z., Zaman S.M., Shameel S., Perveen S and Ali Z. 1998. Steroidal Saponins from *Asparagus dumonsus*. *Phytochemistry*. 50, pp. 481-484.
- Ahmed W. 1979. Classification of Solvents According to Interaction Mechanisms. *Journal of Chemical Education*. 56/12, pp. 795-798.
- Arenas R. 1993. *Micología Médica. Interamericana*. 20, pp. 223-233.
- Bartnicki G. and McMurrrough T. 1971. The Yeast. *Biochemistry of Morphogenesis in Yeast*. Rose & Harrison. Vol. 2, pp. 441-491.
- Barros M.S., Bieber L.W., Da Silva A.A., Martins D.G. 1982. Saponina antineoplásica Isolada de *Cobretum Fruticosum* (Combretaceae). *Revista del Instituto Antibióticos*. 3, pp. 21-25.
- Beuchat L.R. 1986. Growth and Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Cabbage Juice. *Can. J. Microbiol.* 32, pp. 791-795.
- Beuchat L.R. and Golden D.A. 1989. Antimicrobials Occurring Naturally in foods. *Food Technology. Symposium IFT*. pp. 134-142.
- Bonifaz A. 1990. *Micología Médica Básica*. Francisco Méndez Cervantes. 1a. Ed., pp. 443-449.

- Brantner A. and Grein E. 1994. Antibacterial Activity of Plants Extracts Used Externally in Traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **44**, pp. 35-40.
- Cabib E., Mol C.P., Shaw A. and Choi W. 1993. Biosynthesis of Cell Wall and Septum during Yeast Growth. *Archives of Medical Research*. **24**, pp. 301-303.
- Calderone R. A. 1993. Molecular Interactions at the Interfase of *Candida albicans* and Host Cell. *Archives of Medical Research*. **24/3**, pp. 275-279.
- Castro R. 1994. Desarrollo de un Bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringensis* y Extracto de *Agave lechuguilla* para el Control de *Sodoptera frugiperda* (J.B. Smith). Tesis. UANL. Mex.
- Chandler R. F. Hooper S. N. 1981. Ethnobotany and Phytochemistry of Yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. *Economic Botany*. **36/2**, pp. 203-223.
- Chart J. 1994. Cell Polarity in Yeast. *Reviews*. **10/9**, pp. 328-333.
- Chung K.T. and Stevens S.E. 1993. Growth Inhibition of Select Food-borne Bacteria by Tannic Acid, Propyl Gallate and Related Compounds. *Letter in Applied Microbiology*. **17**, pp.29-32.
- Chung K.T. Thomasson W.R. and Wu-Yuan Ch. 1990. Growth Inhibition of Select Food-borne Bacteria, particularly *Listeria monocytogenes*, by plant Extract. *Journal of Applied Bacteriology*. **69**, pp. 498-503.
- Creswell C.J. Runquist O. And Cambell M.M. 1979. Analisis Espectral de Compuestos Orgánicos. Diana. 1ª. Ed.
- Crombie W. M. and Crombie L. 1986. Phathogenicity of "Take-All" Fungus to Oats. Its Relationship to the Concentration and Detoxification of Four Avenacins. *Phytochemistry*. **25/9**, pp. 2075-2083.

- Davis L.E. Shen J.K. and Cai Y. 1990. Antifungal Activity in Human Cerebrospinal Fluid and Plasma after Intravenous Administration of *Allium sativum*. Antimicrobial Agents and chemotherapy. **34**, pp. 651-653.
- Devon T.K. and Scott A.I. 1972. Naturally Occurring Compounds. Vol II Terpenos. Academic Press. pp. 385-447.
- De Wit J.C., Notermans S. 1979. Effect of Garlic Oil or Onion Oil on Toxin Production by *Clostridium botulinum* en Meat Slurry. Journal of Food Protection. **42/3**, pp. 224-226.
- Delaha E.C. and Garagusi V.F. 1985. Inhibition of Mycobacteria by Garlic Extract (*Allium sativum*). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **34**. 485-486.
- Diamond R. D. 1993. Interactions of Phagocytic Cells with *Candida* y other Opportunistic fungi. Archives of Medical Research. **24/3**, pp. 361-369.
- Dominguez X.A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. 2ª. Ed. Pp. 149-159.
- Dupuis G., Johori B. 1972. Cinnamylphenols as inhibitors of Fungal Growth. Canadian Journal of Microbiology. **18**, pp. 929-933.
- Ferraro G. E. Broussalis A. M. 1988. Compuestos Polifenólicos Aislados de *Coyza bonariensis* (Compositae). Rev. Latinoamericana de Química **19/3**, pp. 141-143.
- Fessenden R.J. and Fessenden J.S. 1983. Química Orgánica. 2ª.Ed. Editorial Iberoamericano. Cap. 8, pp. 320-382.
- García-Peregrin E. Suárez M.D. 1972. Mevalonate Phosphorylation in *Agave Americana*. Phytochemistry. **11**, pp. 2495-2498.
- Gentry H.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. 1ª. Ed. pp. 131- 197.

- Graham T.W. 1988. Fundamentos de Química Orgánica. LIMUSA. 1ª. Ed. Cap.13, pp. 461-500.
- Grybill J.R. 1993. Treatment of Sistemic Mycoses in Patients with AIDS. Archives of Medical Research. 24/4, pp. 403-412.
- Greger H. And Werner A.1990. Comparative HPLC Analyses of Alkamides whitin the *Achillea millefolium* Group.Plant Medical. 56, 482-486.
- Grosvenor P.W., Supriono A. and Gray D.O. 1994. Medical Plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part. 2. Antibacterial and antifungal Activity. Journal of Ethnopharmacology. 45, pp.97-111.
- Guerrero C., Campos G. and Taboada J. 1988. Estudio Químico de *Eupatorim brevipes* y algunas Actividades Biológicas de la Brevipenina. Rev. Latinoamericana de Química 19/3, pp. 147-149.
- Gullo V.P.1994. The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential. 1ª. Ed. butterworth-Heinemann., pp. 389-444
- Hamburger M.O. and Codell G.A. 1987. A Direct Bioautographic TLC Assay for compounds Possesing Antibacterial Activity.Journal of Natural Products. 50/1, pp. 19-22.
- Hess S.C. Brum L.R. 1995. Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae) Journal of Ethnpharmacology. 47, pp. 97-100.
- Holt L.D. and Gomez-Almonte N. 1994. Anti Micotic Activity of Garlic Extracts and Fractions *in vitro* and in Plant. Journal of Food Protection. 58/3, pp. 322-325.
- Hostetmann K., Wolfender I. and Rodriguez S. 1996. Rapid Detection and Subsecuent Isolation of Bioactive Constituents of Crude Plants Extracts. Planta Médica 63, pp. 2-10.
- Howard J., Darrow K. 1990. Effect of *Agave americana* "in vivo". Journal of Engl. Med. 342, pp 1678-1679.

- Ibewuike J.C., Ogungbamila F.O. 1997. Antiinflammatory and Antibacterial Activities of C-methylflavonols from *Piliostigma thomningii*. *Phytotherapy Research* **11**, pp. 281-284.
- Ibrahim D. And Osman H. 1995. Antimicrobial Activity of *Cassia alata* from Malasia. *Journal of Ethnopharmacology* **45**, pp.151-156.
- Irobi O.N. and Daramola S.O. 1994. Bactericidal Properties of Crude Extracts of *Mitracarpus villosus*. *Journal of Ethnopharmacology*. **42**, pp. 39-43.
- Johnson M.G. and Vaughn R.H.1969. Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the Presence of Freshly Reconstituted Dehydrated Garlic and Onion. *Applied Microbiology* **17/6**, pp. 903-905.
- Kandil O., Radwan N.M., Hassan A.B. and Amer A.M.M. 1994. Extracts and Fractions of *Thymus capitatus* Exhibit Antimicrobial Activities. *Journal of Ethnopharmacology*. **44**, pp. 19-24
- Kinghorn A.D. and Balandrin M.F. 1993. *Human Medicinal Agents from Plants*. 1st. Ed. American Chemical Society., pp. 2-11.
- Koch H.A., Blander R and Gibson R. 1986. Fluorescence Microscopy Procedure for Quantitation of Yeast in Brevages. *Applied and Environment Microbiology*. **52**, pp. 599-601.
- Kozel T.R. 1993. Opsonization and Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Archives of Medical Research*. **24/3**, pp. 211-218.
- Lavaud C. and Voutquenne L. 1997. Saponins from the Stem Bark of *Ficium decipiens*. *Phytochemistry*. **47/3**, pp. 441-449.
- Leah R., Tommerup H., Svendsen I. and Mundy J. 1991. Biochemical and Molecular Characterization of Three Barley Seed Proteins with Antifungal Propieties. *Phytotherapy Research* **266/3**, pp. 1564-1573.

- Linton C. J. and Wright S.J.L.1993. Volatile Organic Compounds: Microbial Aspects and some Technological Implications. **75**, pp. 1-12.
- Madrigal D., Cuevas C. 1992. Identificación de Esteroides en *Agave angustifolia* Haw. *Rev. Latinoamericana* **22/4**, pp. 28-30.
- Magee P.T. and Sherer S. 1998. Genome Mapping and Gene Discovery in *Candida albicans*. *ASM News*. **64/9**, pp. 505-511.
- Mahasneh A.M. Abbas J.A. and El-Oqlaha A.A.1996. Antimicrobial Activity of Extracts of Herbal Plants used in the Traditional Medicine of Bahrain. *Phytotherapy Research*. **10**, pp. 251-253.
- Maiti R. 1995. Fibras Vegetales en el Mundo. Trillas. 1ª. Ed. pp. 117-123.
- Malaviya N., Pal R. and Khanna N. M. 1991. Saponins from *Deutzia corymbosa*. *Phytochemistry*. **30/8**, pp. 2798-2800.
- Manavathu E.K., Alangaden G. J. and Lerner S.A. 1996. A Comparative Study of The Broth Micro and Macro-dilution Techniques for the Determination of the *in vitro* Susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. *Can. Journal Microbiology*. **42**, pp. 960-964.
- March C., Sanz I. and Yufera P. 1991. Antimicrobial Activities on Mediterrean Plants. *Zentralb. Microbiol*. **146**, pp. 291-295.
- Meckes M., Torres J., Calzada F. and Rivera J. 1997. Antibacterial propieties of *Helianthemum glomeratum*, a Plant used in Maya Traditional Medicine to Treat Diarrhea. *Phytotherapy Research*. **11**, pp. 128-131.
- Meyer J.J. and Afolayan A.J. 1995. Antibacterial Activity of *Helichrysum aureonitens* (Astraceae). *Journal of Ethnopharmacology* **47**, pp. 109-111.
- Mickey C. 1981. Separation Technology. *Journal of Chemical Education*. **58/12**, pp 157-166.

- Verástegui M.A. García J.S. and Heredia N.L. 1995. Antimicrobial Activity of Extract of Three Major plants The Chihuahua Desert. *Journal of Ethnopharmacology*. **52**, pp. 175-177.
- Vladimirov S.M., Zivanov D.S. and Ribar B.J. 1991. A Steroidal Sapogenin from *Helleborus multifidus* subsp. *Serbicus*. *Phytochemistry*. **30/5**, pp. 1724-1725.
- Vlietnick A.J. Van Hoof L. Totte J. Lasure A., Vanden D. 1995. Screening of Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral Propieties. *Journal of Ethnopharmacology* **46**, pp. 31-47.
- Watt J.M. and Breyer-Brandwijk M.G. 1962. *The Medicinal and Poisonous Plants of southern and Eastern Africa*. 2^a Ed. E & Livingstone LTD. Pp. 19-20.
- White T.C. 1997. Antifungal Drug Resistance en *Candida albicans*. *ASM News*. **6318**, pp. 427-433.
- Yang M., Blunden G., Patel A., Crabb T., Brain K. and Gtiffin W.J. 1990. Two Furostane Sapogenins from *Cordyline rubra*. *Phytochemistry*. **29/4**, pp. 1332-1334.
- Yasphe J., Segal R. Breuer A. and ErdreichNaftali G. 1979. Antibacterial Activity of *Artemisia herba-alba*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **68/7**, pp. 924-925.
- Zohori A.N., Abdel- Gawad K., Saber S. 1995. Antibacterial Antidermatophytic and Antitoxigenic Activities of Onion (*Allium cepa* L.) Oil. *Microbiol. Res.* **150**, pp. 167-172.

ANEXO

ESPECTROS DE AGAVES

ULTRAVIOLETA

INFRAROJO

2D-RMN

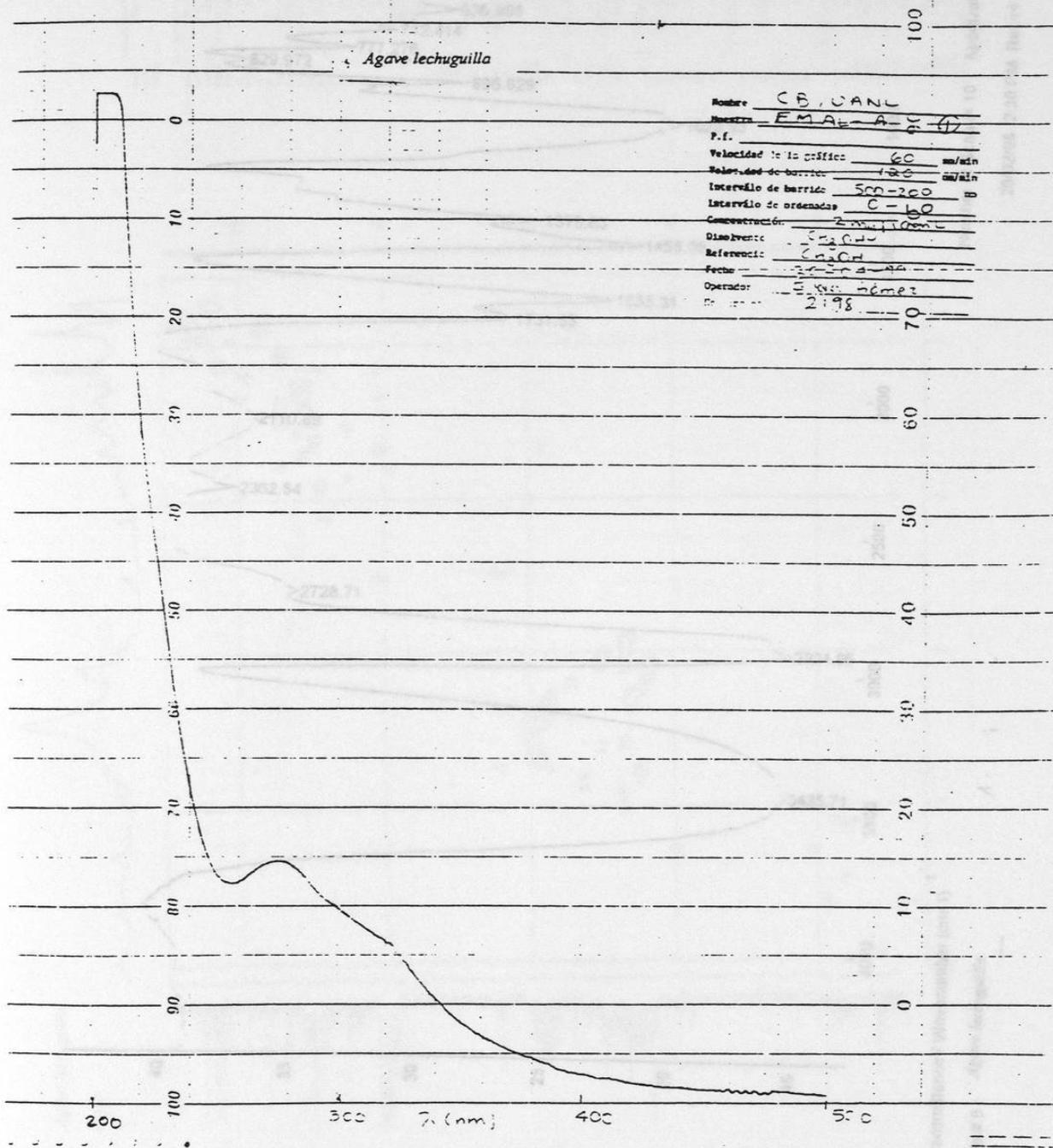
¹H RMN

¹³C RMN

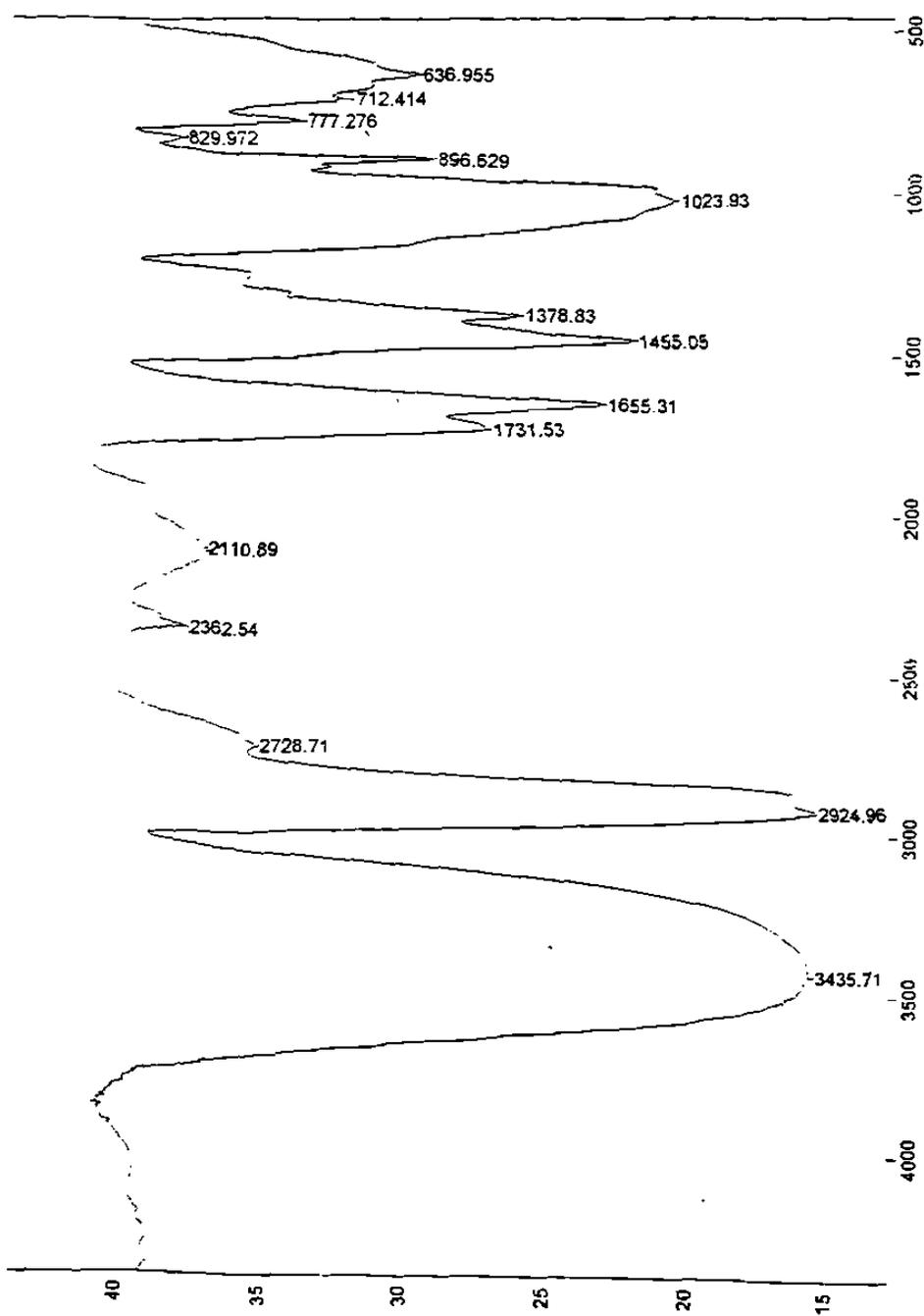
EM

Agave lechuguilla

Nombre CB, CANL
Muestra EMA-A-1-11
P.f. _____
Velocidad de la celdita 60 cm/min
Velocidad de barrido 120 cm/min
Intervalo de barrido 500-200 nm
Intervalo de ordenadas C-100 mV
Concentración: 2 mg/100ml
Disolvente: CH₂OH
Referencia: CH₂OH
Fecha: 27/11/88
Operador: E. S. Gómez
No. 2198



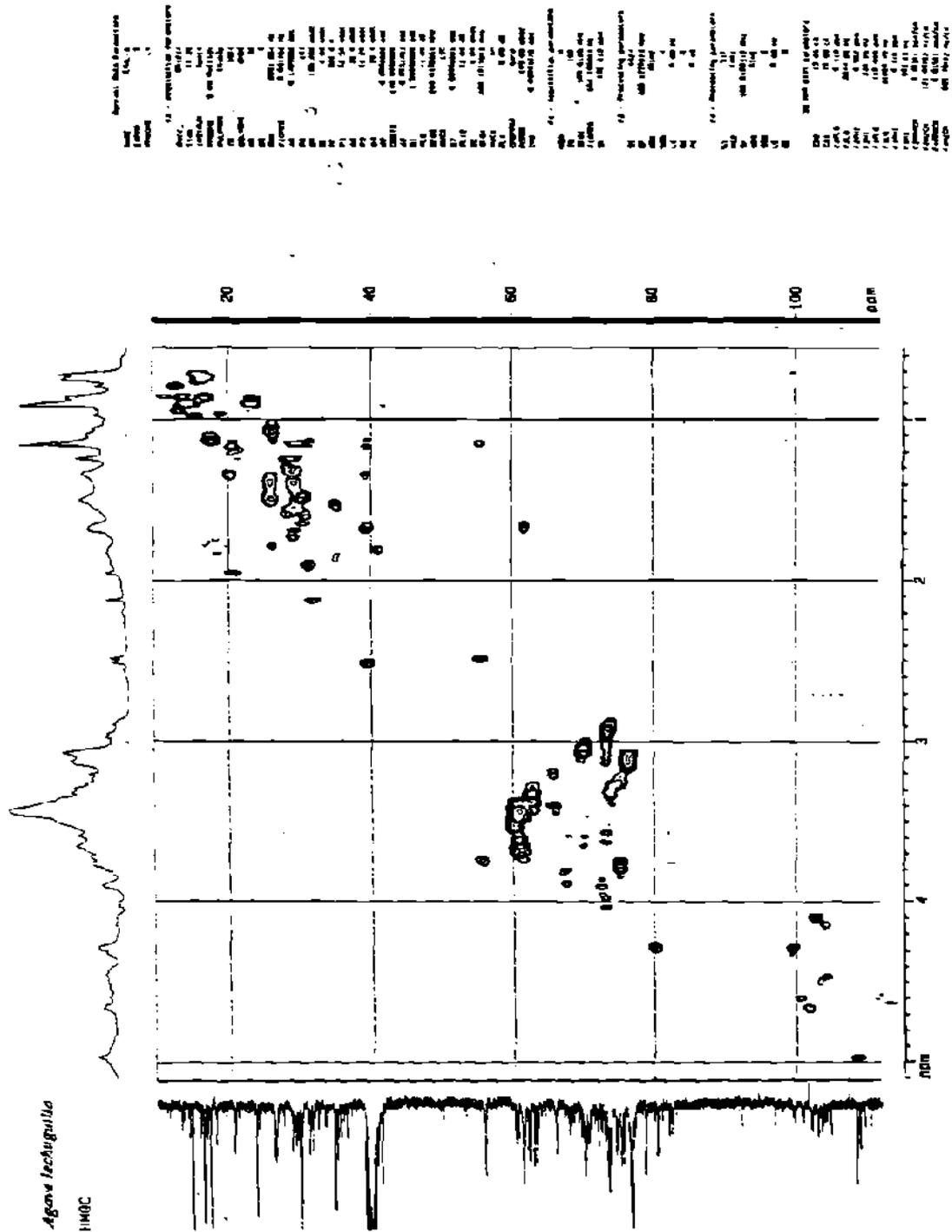
Anexo a) - Espectro en UV del compuesto activo de *A. lechuguilla*



Number of Scans= 10 Apodization=

File # 6 : *Agave lecheguilla* 28/02/98 2 30 PM Res=4 cm⁻¹

Anexo b) – Espectro en IR del compuesto activo de *A. lecheguilla*



General Data Parameters

Acq. 1	1000 MHz
Acq. 2	1000 MHz
Acq. 3	1000 MHz
Acq. 4	1000 MHz
Acq. 5	1000 MHz
Acq. 6	1000 MHz
Acq. 7	1000 MHz
Acq. 8	1000 MHz
Acq. 9	1000 MHz
Acq. 10	1000 MHz
Acq. 11	1000 MHz
Acq. 12	1000 MHz
Acq. 13	1000 MHz
Acq. 14	1000 MHz
Acq. 15	1000 MHz
Acq. 16	1000 MHz
Acq. 17	1000 MHz
Acq. 18	1000 MHz
Acq. 19	1000 MHz
Acq. 20	1000 MHz
Acq. 21	1000 MHz
Acq. 22	1000 MHz
Acq. 23	1000 MHz
Acq. 24	1000 MHz
Acq. 25	1000 MHz
Acq. 26	1000 MHz
Acq. 27	1000 MHz
Acq. 28	1000 MHz
Acq. 29	1000 MHz
Acq. 30	1000 MHz
Acq. 31	1000 MHz
Acq. 32	1000 MHz
Acq. 33	1000 MHz
Acq. 34	1000 MHz
Acq. 35	1000 MHz
Acq. 36	1000 MHz
Acq. 37	1000 MHz
Acq. 38	1000 MHz
Acq. 39	1000 MHz
Acq. 40	1000 MHz
Acq. 41	1000 MHz
Acq. 42	1000 MHz
Acq. 43	1000 MHz
Acq. 44	1000 MHz
Acq. 45	1000 MHz
Acq. 46	1000 MHz
Acq. 47	1000 MHz
Acq. 48	1000 MHz
Acq. 49	1000 MHz
Acq. 50	1000 MHz
Acq. 51	1000 MHz
Acq. 52	1000 MHz
Acq. 53	1000 MHz
Acq. 54	1000 MHz
Acq. 55	1000 MHz
Acq. 56	1000 MHz
Acq. 57	1000 MHz
Acq. 58	1000 MHz
Acq. 59	1000 MHz
Acq. 60	1000 MHz
Acq. 61	1000 MHz
Acq. 62	1000 MHz
Acq. 63	1000 MHz
Acq. 64	1000 MHz
Acq. 65	1000 MHz
Acq. 66	1000 MHz
Acq. 67	1000 MHz
Acq. 68	1000 MHz
Acq. 69	1000 MHz
Acq. 70	1000 MHz
Acq. 71	1000 MHz
Acq. 72	1000 MHz
Acq. 73	1000 MHz
Acq. 74	1000 MHz
Acq. 75	1000 MHz
Acq. 76	1000 MHz
Acq. 77	1000 MHz
Acq. 78	1000 MHz
Acq. 79	1000 MHz
Acq. 80	1000 MHz
Acq. 81	1000 MHz
Acq. 82	1000 MHz
Acq. 83	1000 MHz
Acq. 84	1000 MHz
Acq. 85	1000 MHz
Acq. 86	1000 MHz
Acq. 87	1000 MHz
Acq. 88	1000 MHz
Acq. 89	1000 MHz
Acq. 90	1000 MHz
Acq. 91	1000 MHz
Acq. 92	1000 MHz
Acq. 93	1000 MHz
Acq. 94	1000 MHz
Acq. 95	1000 MHz
Acq. 96	1000 MHz
Acq. 97	1000 MHz
Acq. 98	1000 MHz
Acq. 99	1000 MHz
Acq. 100	1000 MHz

Anexo c) – Espectro en 2D - RMN del compuesto activo de *A. lecheguilla*

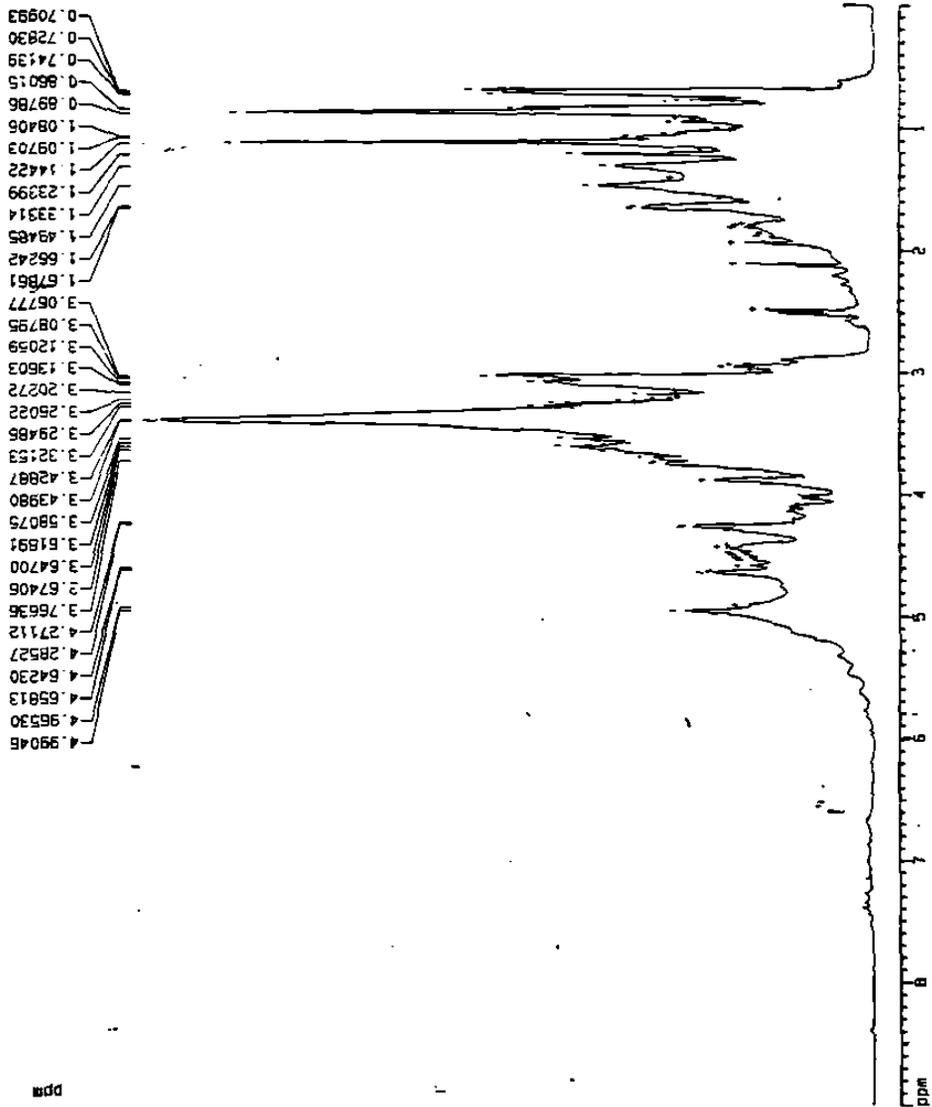
Agave lecheguilla

Current Data Parameters
 NAME ENAL-A
 EXPHO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 981214
 Time 15.10
 INSTRM spect
 PRORG 8 mm Millim
 PULPROG zg
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 2
 SWH 6410.256 Hz
 FIDRES 0.195625 Hz
 AQ 2.5595910 sec
 RG 32
 DM 76.600 usec
 DE 8.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 P1 12.50 usec
 DE 8.00 usec
 SF 400.1328024 MHz
 NUC1 1H
 PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 400.1299987 MHz
 EQ
 MDW 0
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 0.10

10 Mel plot parameters
 CX 20.00 cm
 FJP 9.000 ppm
 F1 3481.17 Hz
 F2P 0.000 ppm
 F2 0.00 Hz
 PRNOM 0.45000 ppm/cm
 HZCM 100.05950 Hz/cm



Anexo d) - Espectro en ^1H RMN del compuesto activo de *A. lecheguilla*.

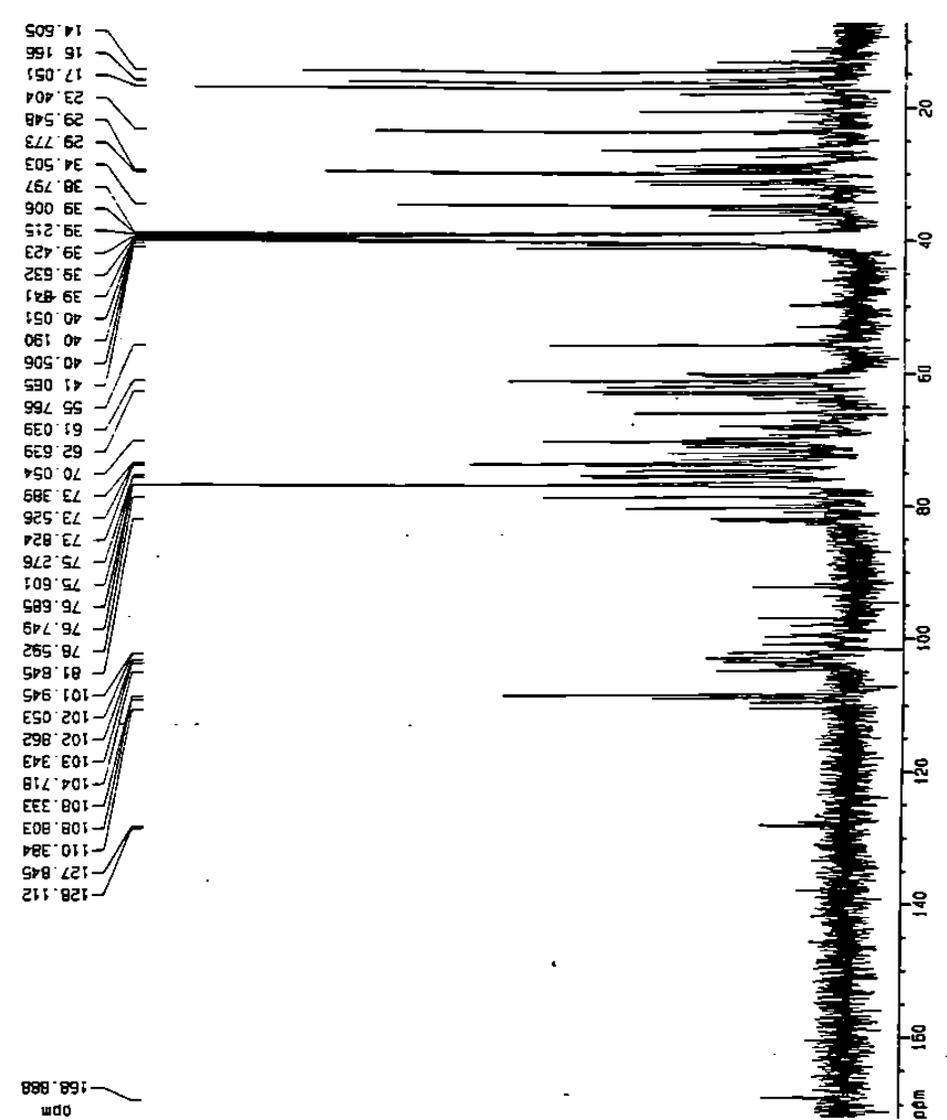
Agave lecheguilla

Current Data Parameters
 NAME ENL-A
 C1PR0 2
 PROC00 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 9/12/14
 Time 17:03
 INSTRUM spect
 PROG00 5 ms Multisig
 PULPROG zgpg
 ID 63536
 SOLVENT DMSO
 NS 1536
 DS 8
 SH1 21951.725 Hz
 FIDRES 0.328663 Hz
 AQ 1.520482 sec
 RG 8192
 DN 23.200 usBC
 DE 8.00 usBC
 TE 300.0 K
 d11 0.0300000 sec
 d12 0.0000200 sec
 PL13 18.00 dB
 DI 2.0000000 sec
 CPROG02 waltz16
 PCP02 105.00 usBC
 SF02 400.1316003 MHz
 NUC2 1H
 PL2 -3.00 dB
 PL12 18.00 dB
 P1 10.25 usBC
 DE 6.00 usBC
 SF01 100.6230418 MHz
 NUC1 13C
 PL1 -1.00 dB

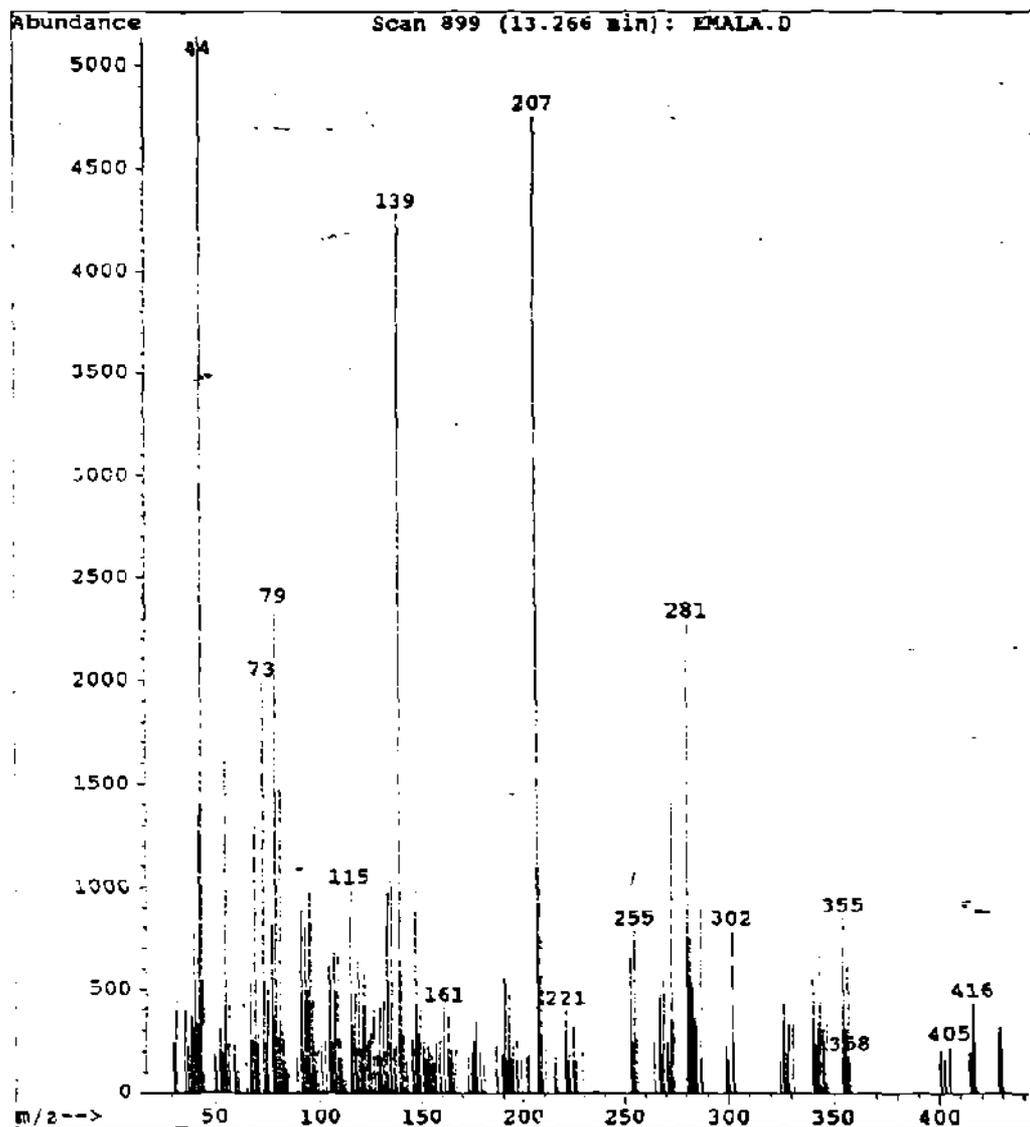
F2 - Processing parameters
 SI 32786
 SF 100.6128184 MHz
 MDW EN
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

10 NMR plot parameters
 CK 20.00 sec
 FIP 174.978 ppm
 F1 17503.15 Hz
 F2 7.205 ppm
 F2 724.80 Hz
 PPMCN 6.23664 ppm/Hz
 HZCN 628.91248 Hz/Hz

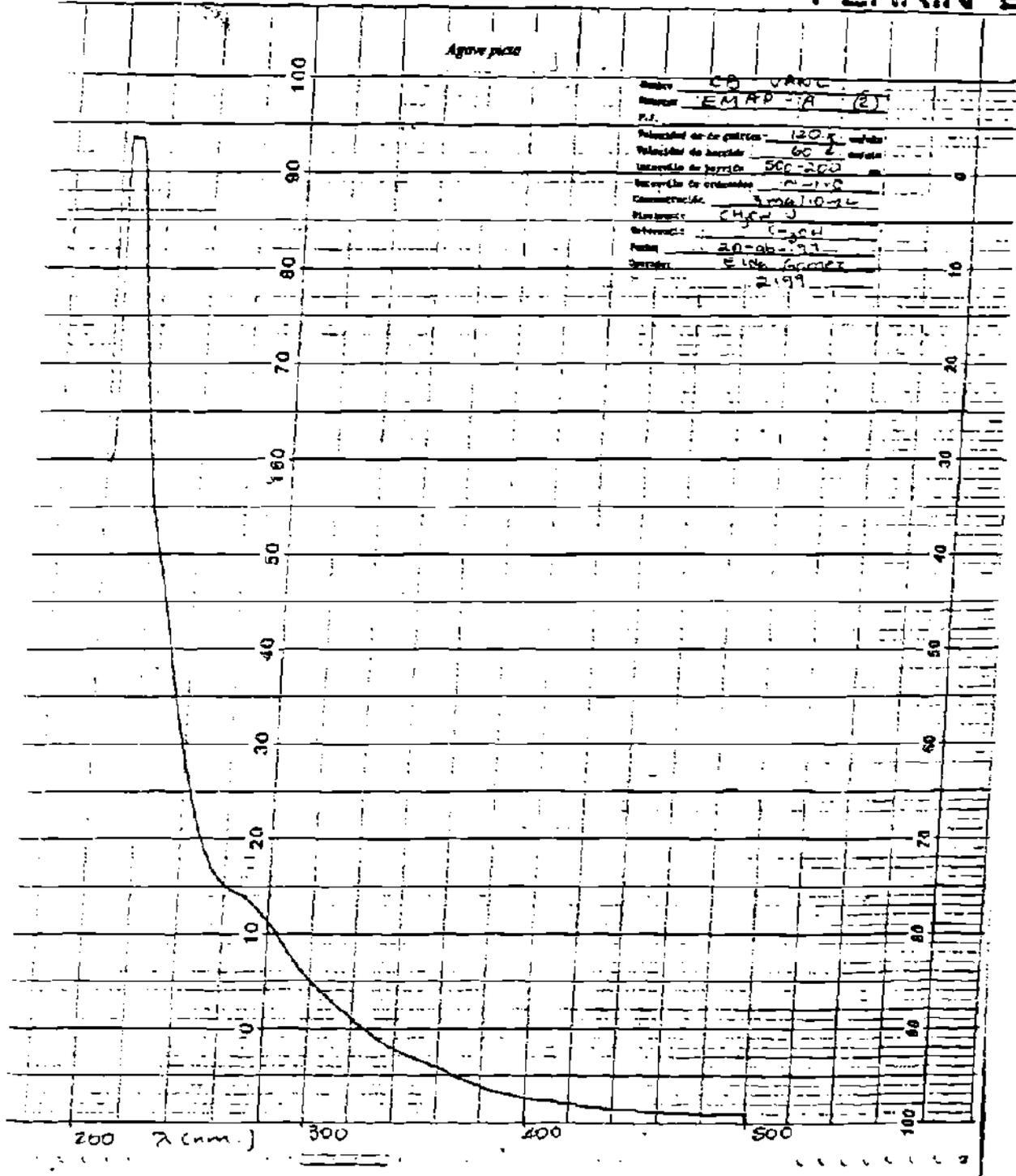


Anexo e) - Espectro en ¹³CRMN del compuesto activo de *A. lecheguilla*.

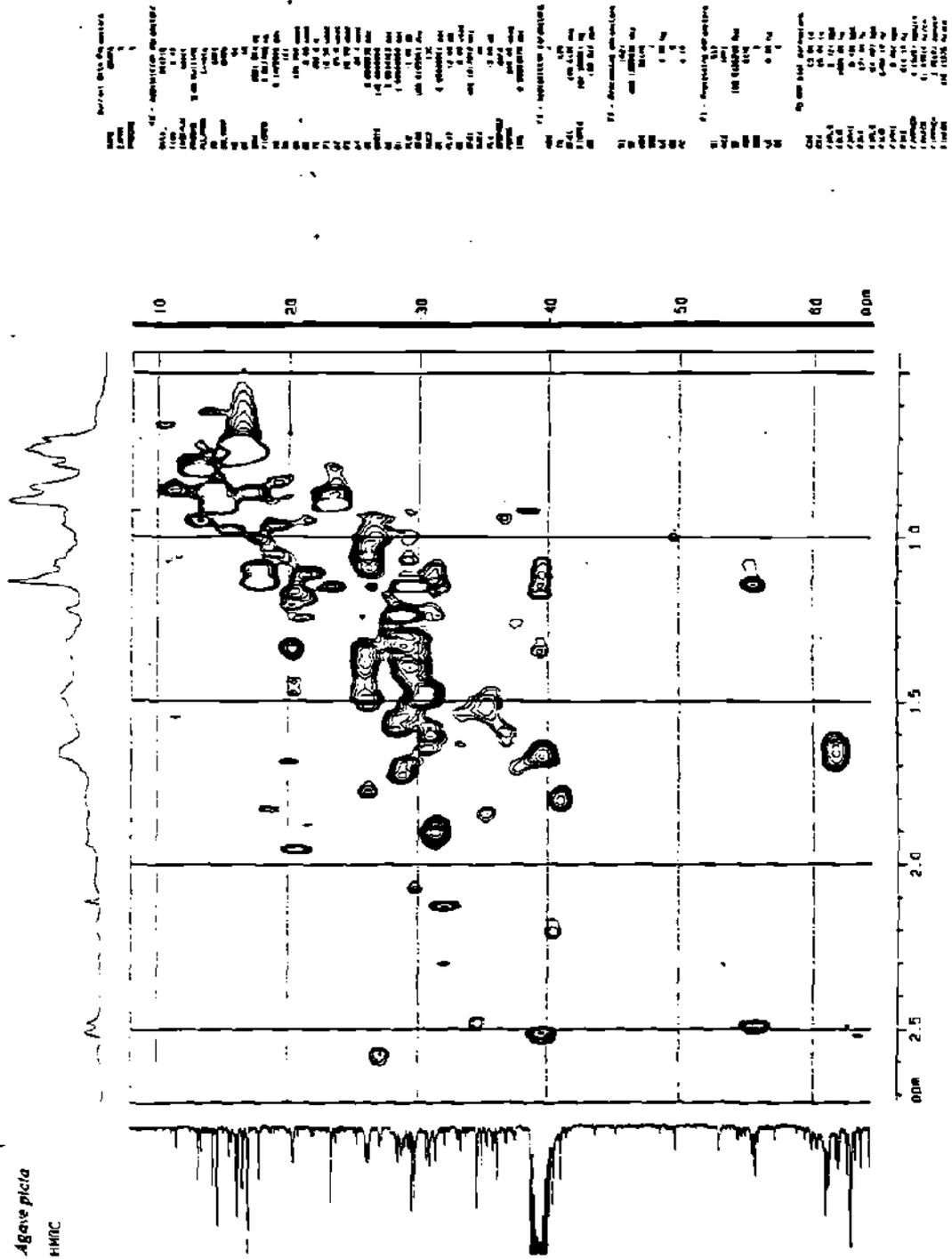
File : C:\NPKCHEM\1\DATA\ Agave lecheguilla
Operator : LUIS ERNESTO ELIZALDE
Acquired : 20 Jan 99 3:44 pm using AcqMethod ELSUCCIN
Instrument : Elizalde
Sample Name: UANL-FCB Dra. Julia Verde - Frac. soluble
Misc Info : 100 -100 p-off f-30
Vial Number: 1



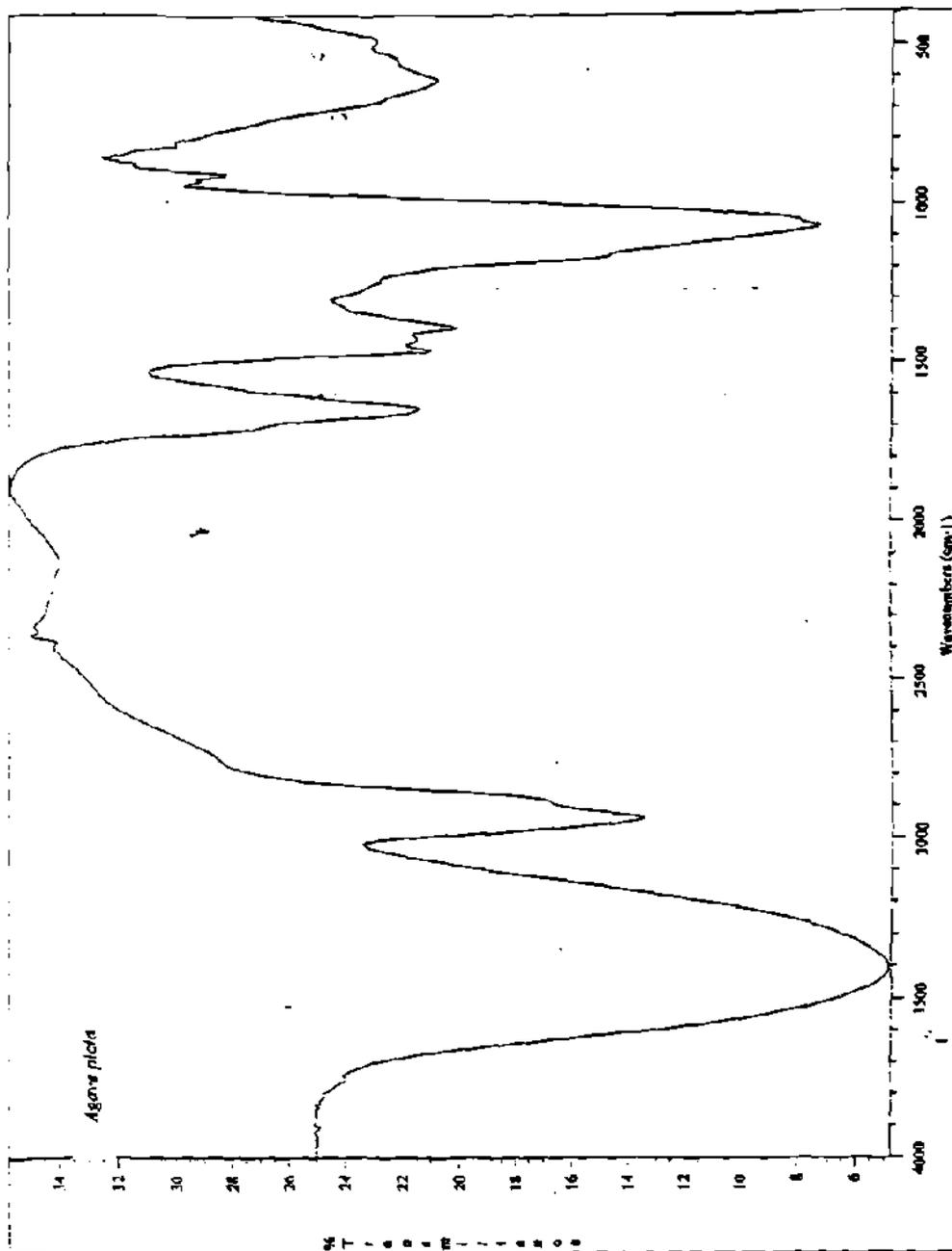
Anexo f) - Espectro en EM del compuesto activo de *A. lecheguilla*



Anexo g) - Espectro en UV del compuesto activo de *A. picta*.



Anexo h) - Espectro en IR del compuesto activo de *A. picta*



Anexo i) - Espectro en 2D-RMN del compuesto activo de *A. picta*.

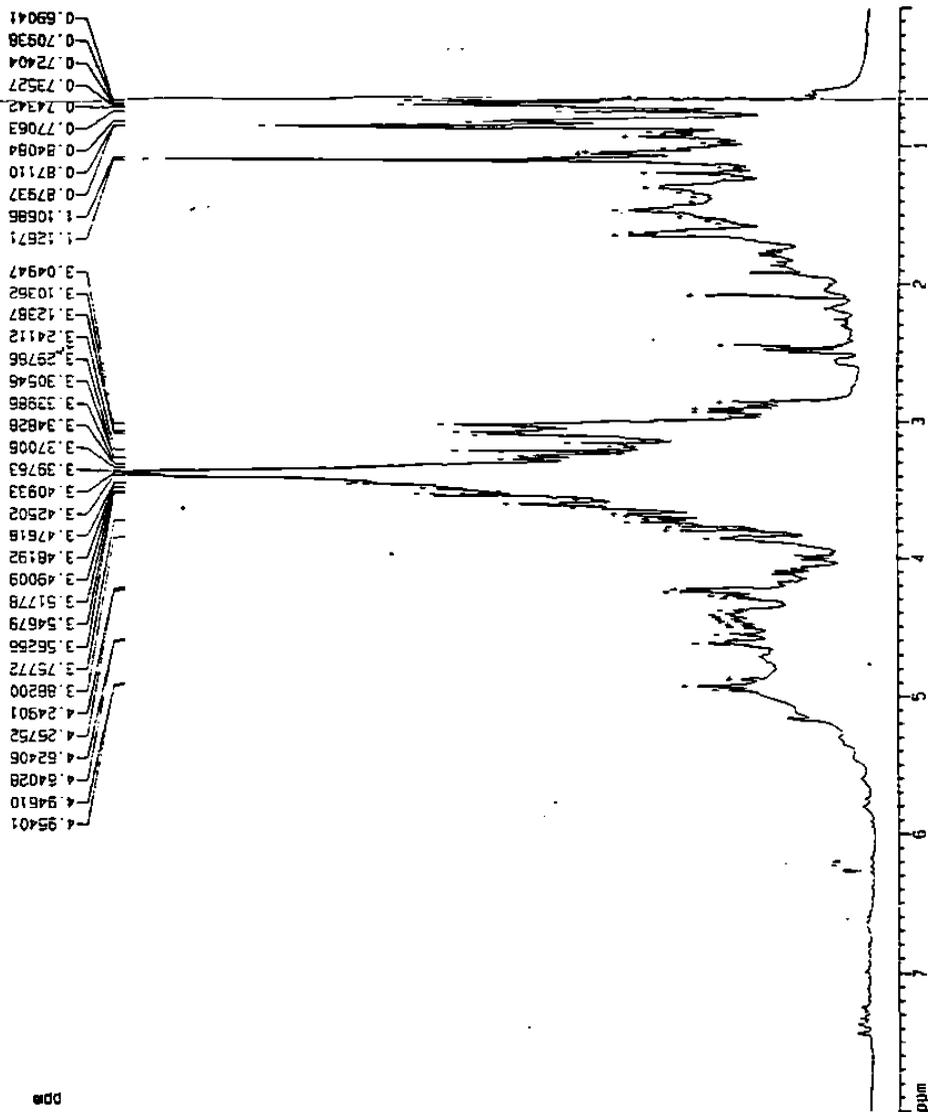
Agave picta

Current Data Parameters
 NAME EMP-A
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 9/11/05
 Time 16.45
 PULPROG zgpg30
 INSTNM spect
 PROBHD 5 mm Huj11nu
 PALPROG zgpg30
 TO 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 6
 DS 2
 SWH 6410.256 Hz
 FIDRES 0.159625 Hz
 AQ 2.5559510 sec
 RG 16
 DM 78 000 uSAC
 DE 8.00 uSAC
 TE 300.0 K
 P1 1.00000000 sec
 P2 12.50 uSAC
 DE 8.00 uSAC
 SFO1 400.1326024 MHz
 NUC1 1H
 PL1 -3.00 dB

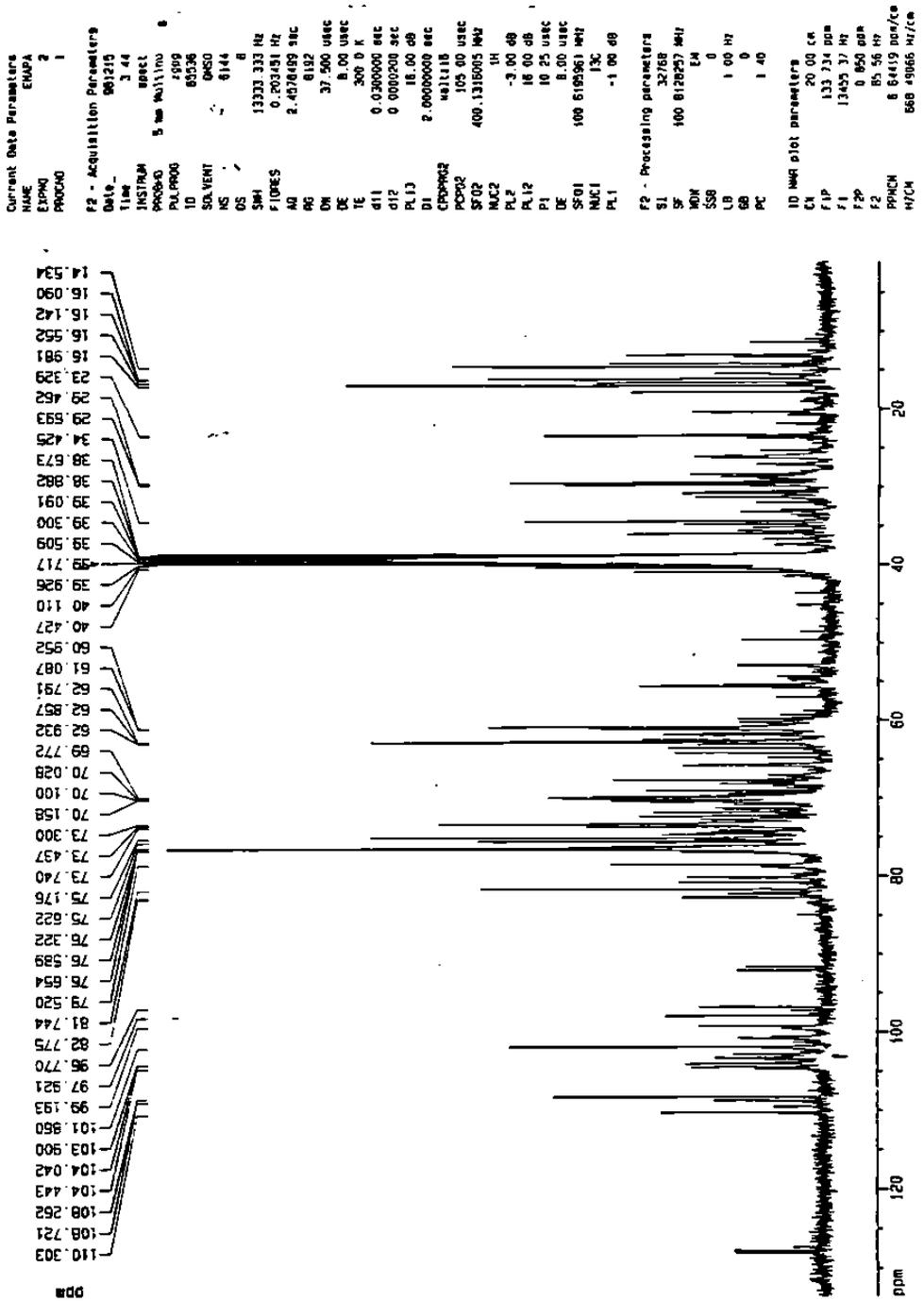
F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 400.1300051 MHz
 WCN EN
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ID MHz plot parameters
 CR 20.00 cm
 FIP 8.000 mm
 F1 3201.04 Hz
 F2P 0.000 ppm
 F2 0.00 Hz
 PPMCM 0.40000 ppm/cm
 WCN 160.05200 Hz/cm

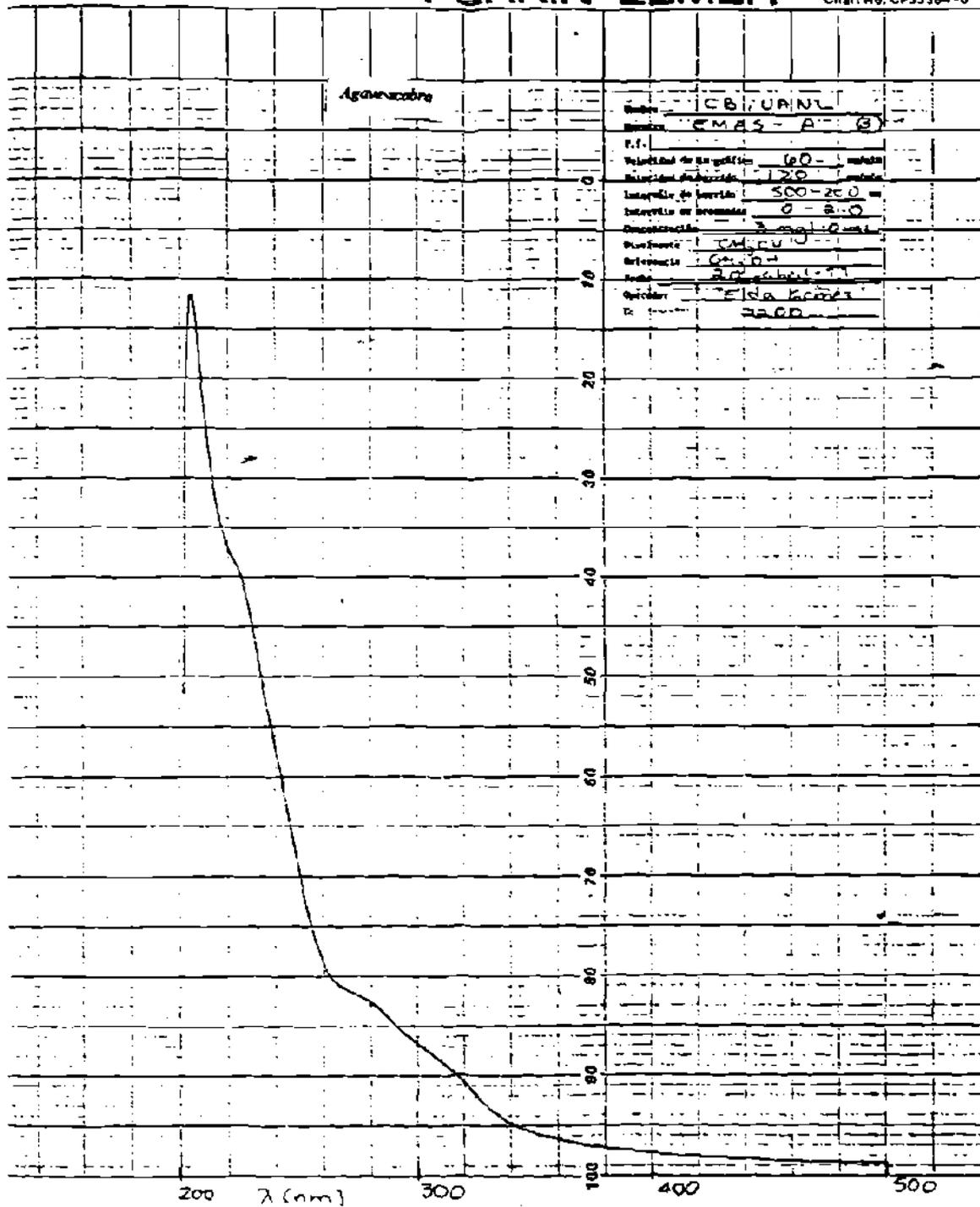


Anexo j) – Espectro en ¹H RMN del compuesto activo de *A. picta*

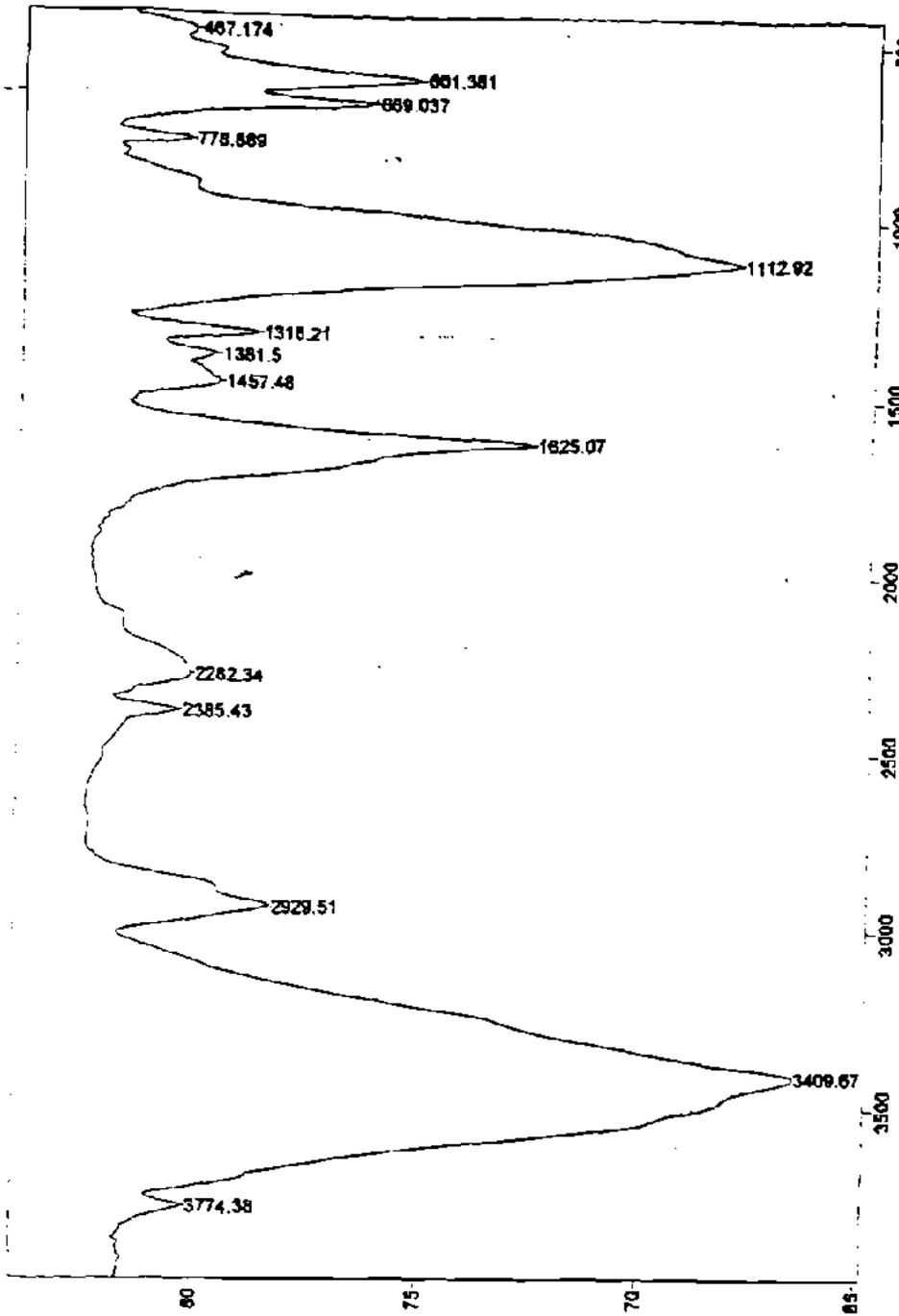
Agave picta



Anexo k) – Espectro en ¹³CRMN del compuesto activo de *A. picta*.

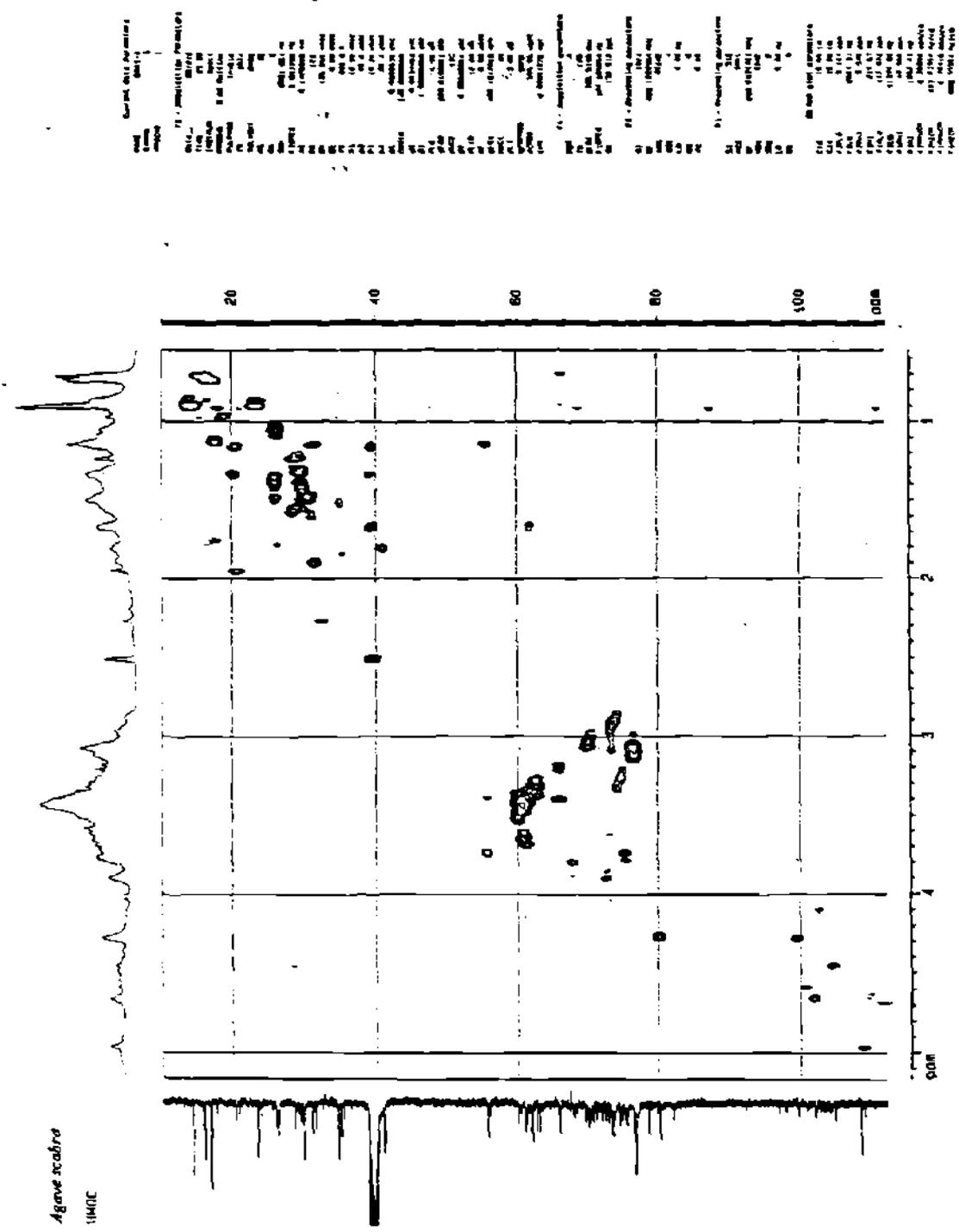


Anexo I) - Espectro en UV del compuesto activo de *A. scabra*.



Number of Scans= 10 Apodization
 3/04/98 3:05 PM Res=4 cm-1
 Transmittance / Wavenumber (cm-1)
 File # 2 : RCCRA05 Agave scabra

Anexo m) - Espectro en IR del compuesto activo de *A. scabra*.



Anexo n) – Espectro en 2D-RMN del compuesto activo de *A. scabra*.

Agave scabra

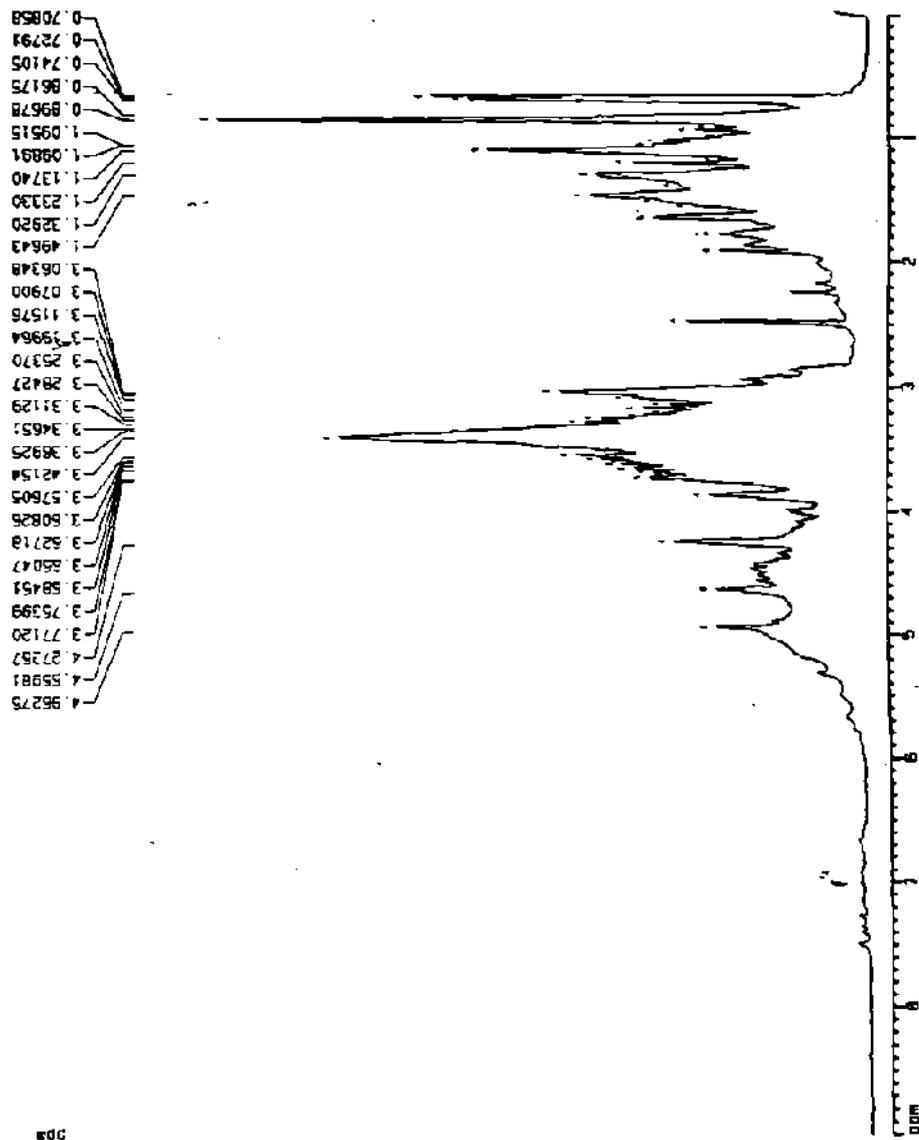
```

Current Data Parameters
NAME          6645-A
EXPNO         1
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         04/15
Time          14.15
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm HLLHNU
PULPROG       zgpg30
SOLVENT       DMSO
NS             16
DS             2
SWH            6410.246 kHz
FIDRES         0.19026 Hz
AQ             2.558916 sec
RG             32
ORF            74.000 usec
GB             0.00 usec
BE             300.0 K
TE            12.34 usec
SFO           12.34 MHz
PC            0.00 usec
SFO           400.1520024 MHz
AQ            1.19
RG            1.00
PC            13.000 sec

F2 - Processing parameters
SI            16384
SF            400.1520000 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            0.10

10 Main plot parameters
CX            20.00 cm
FID          6.000 gain
F1           3001.47 Hz
F2           0.000 ppm
F3            0.00 Hz
PUNCH        6.000000000
ROTCH        180.000000000
  
```



Anexo o) - Espectro en ¹HRMN del compuesto activo de *A. scabra*.

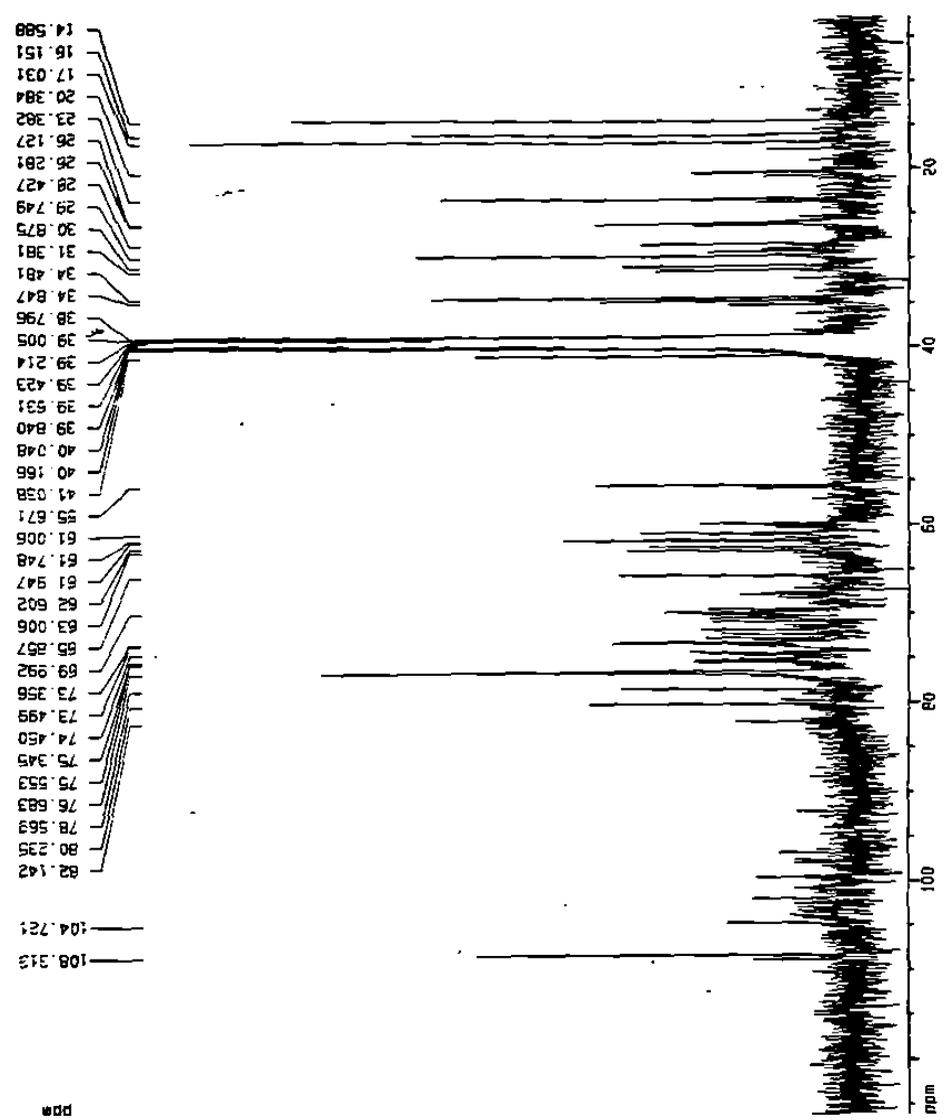
Agave scabra

Current Date Parameters
 NAME EM3-A
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 DATE_ 061210
 TIME 15 25
 INSTRM spect
 PROBR0 9 mm Multinu
 PULPROG zgpg
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 1024
 DS 8
 SWH 13331.333 Hz
 FIDRES 0.263451 Hz
 AQ 2.457669 sec
 RG 8192
 DM 37.500 usec
 DE 8.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.0300000 sec
 D12 0.0002000 sec
 D13 15.00 sec
 D1 2.0000000 sec
 CPMPRG2 nutsh18
 PDP002 105.00 usec
 SF002 400.1315003 MHz
 NUC02 1H
 PL2 -3.00 dB
 PL12 10.00 dB
 PL1 10.25 usec
 DE 8.00 usec
 SF01 100.6195961 MHz
 NUC1 13C
 PL1 -1.00 dB

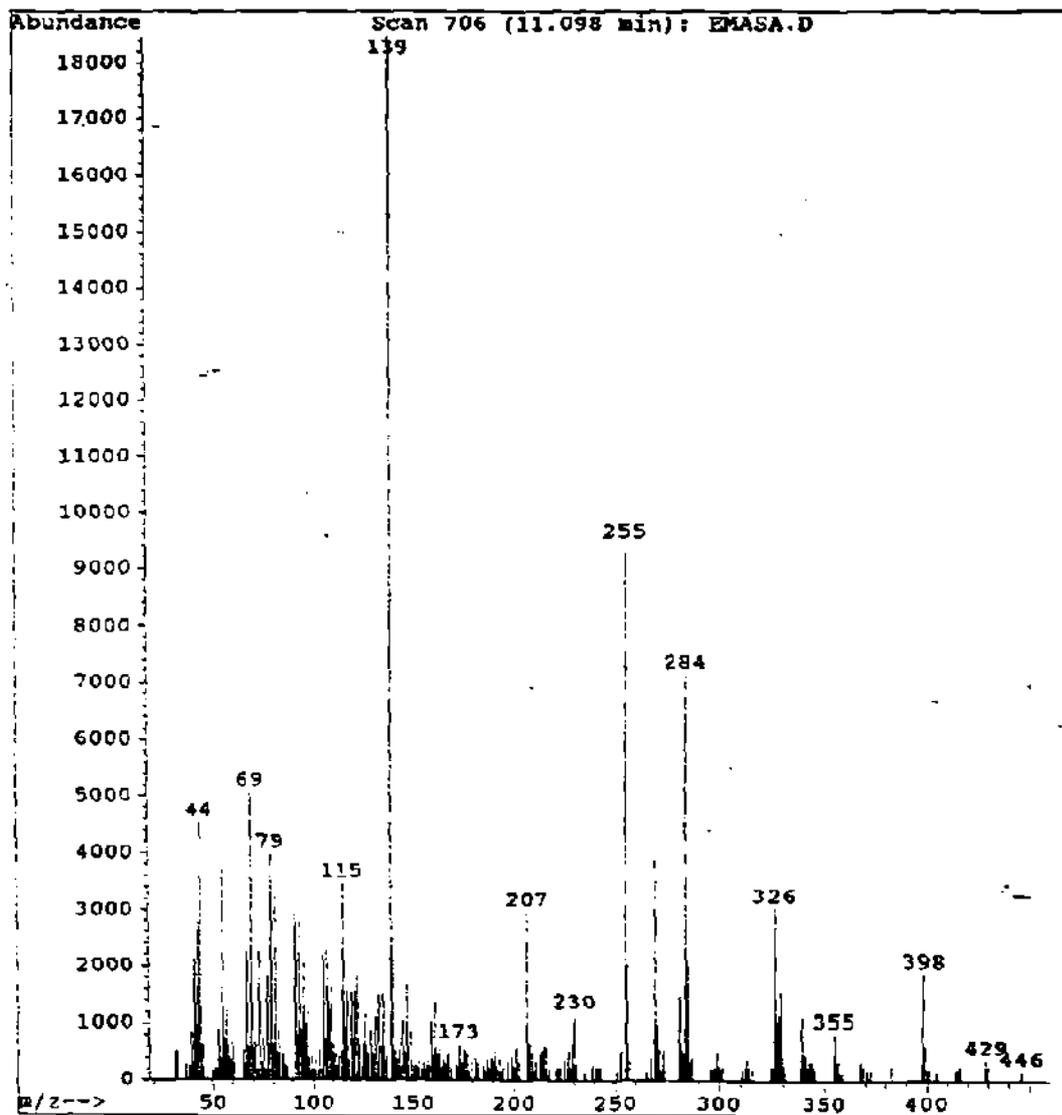
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6196210 MHz
 EQ
 NS0 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

1D NMR list parameters
 CX 20.00 cm
 FIP 130.076 deg
 T1 1.6895144 Hz
 T2 2.874100 sec
 F2 276.57 Hz
 PPM0 0.00000000
 H1CN 6.00000000
 H1CM 650.42817 Hz/cm

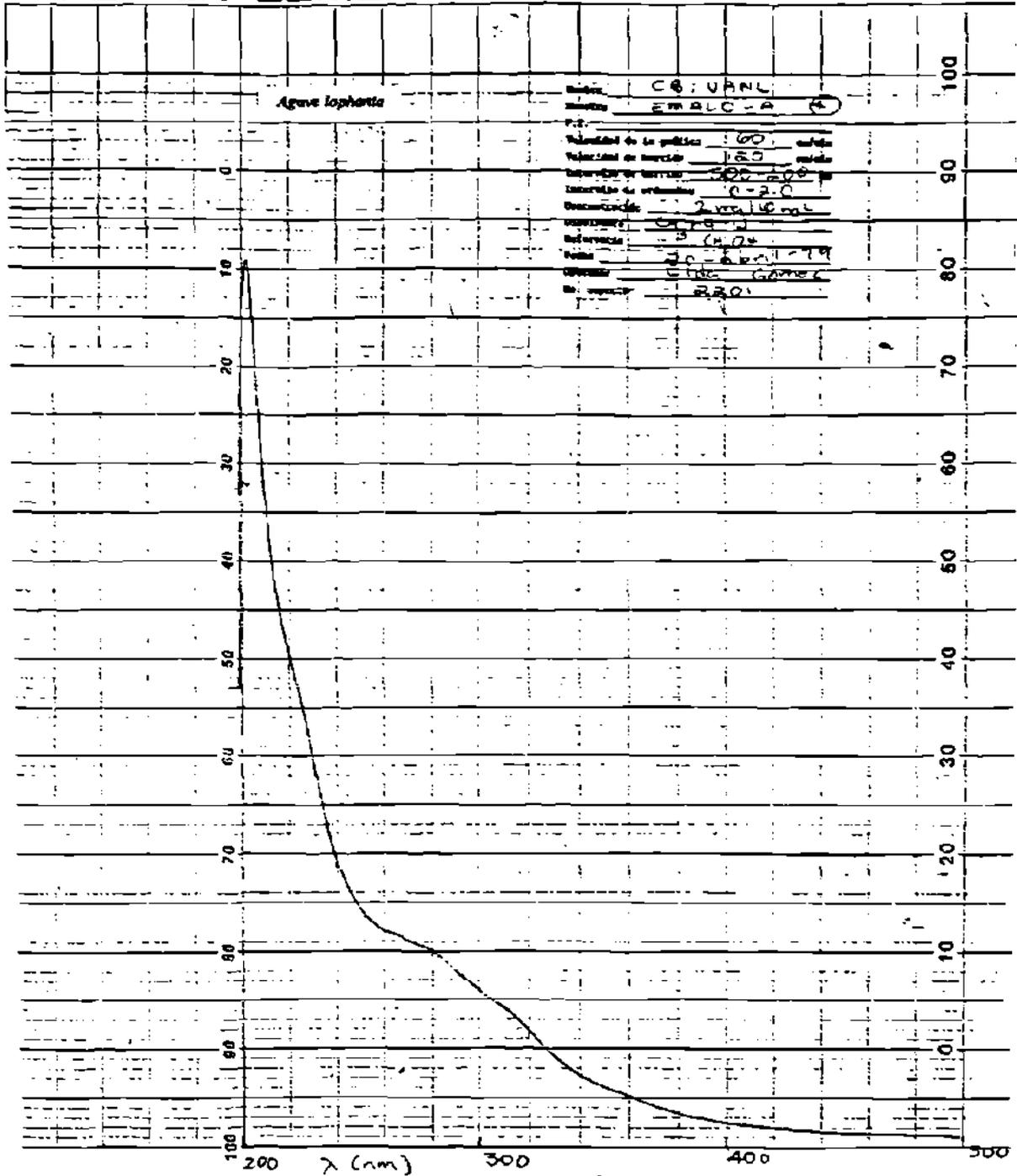


Anexo p) - Espectro en ¹³CRMN del compuesto activo de *A. scabra*.

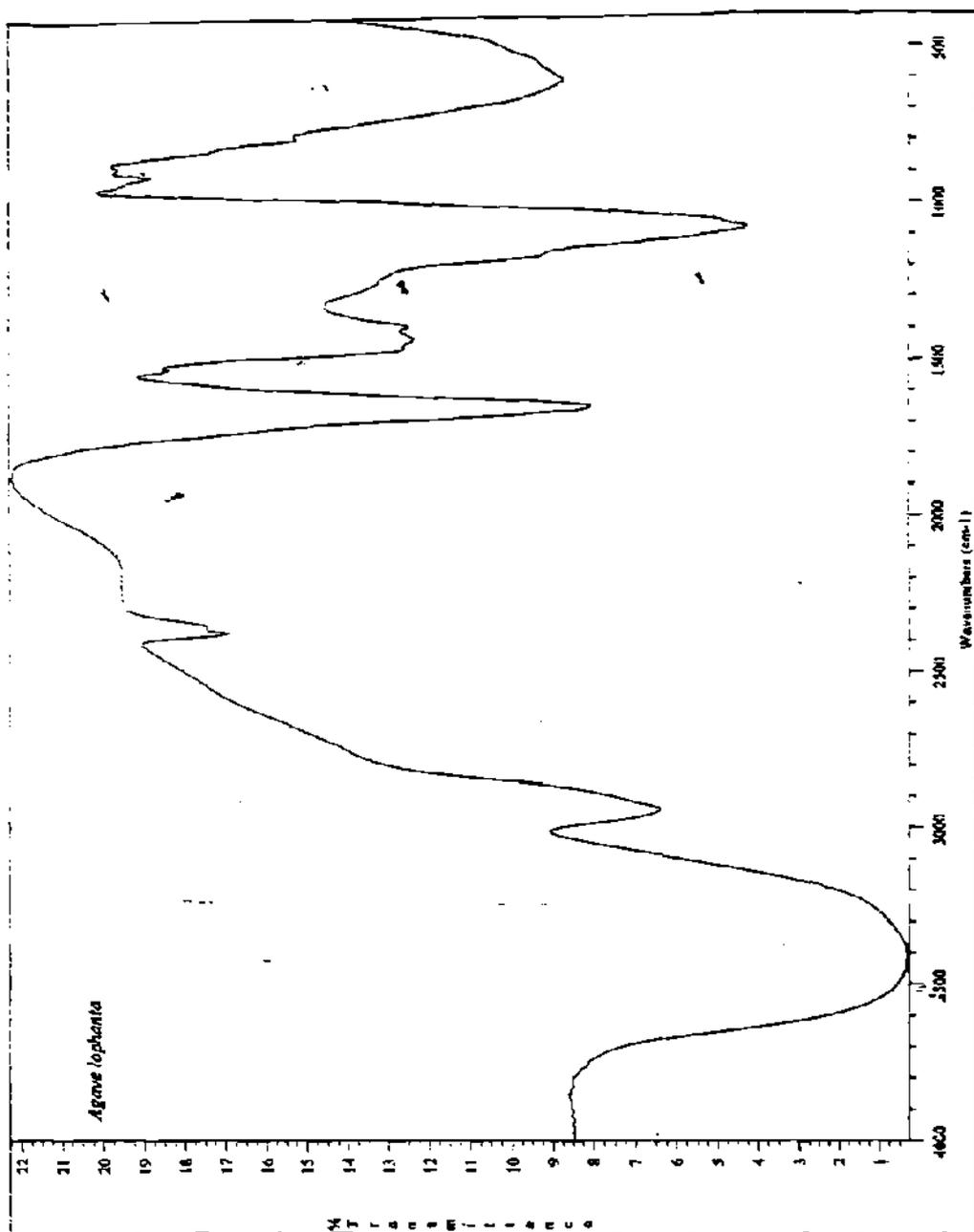
File : C:\HPCHEM\1\DATA\ *Agave scabra*
Operator : LUIS ERNESTO ELIZALDE
Acquired : 20 Jan 99 3:17 pm using AcqMethod ELSUCCIN
Instrument : Elizalde
Sample Name: UANL-PCB Dra. Julia Verde - Frac. soluble
Misc Info : 100 -100 p-off f-30
Vial Number: 1



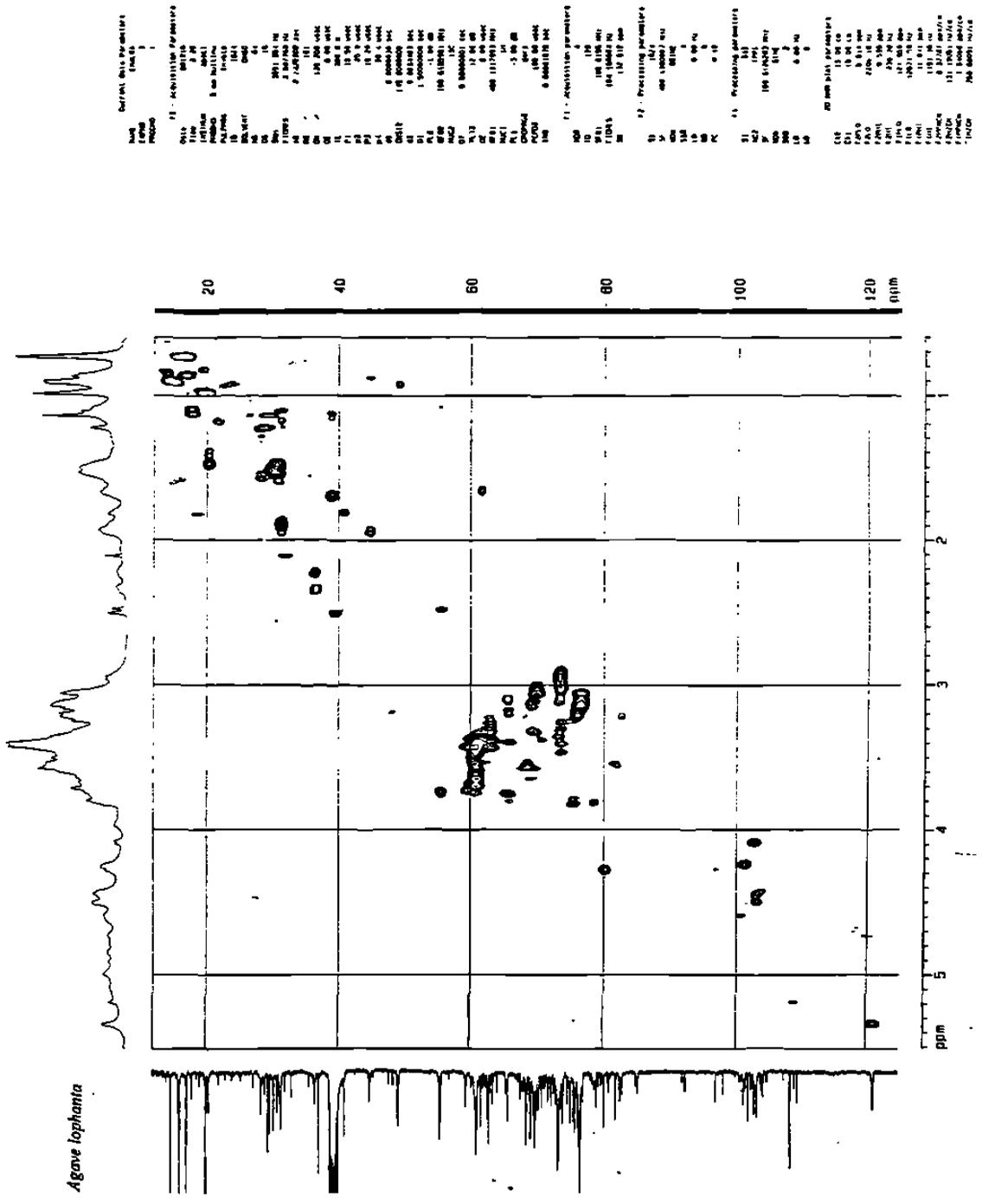
Anexo q) - Espectro en EM del compuesto activo de *A. scabra*.



Anexo r) - Espectro en UV del compuesto activo de *A. lophanta*.



Anexo s) – Espectro en IR del compuesto activo de *A. lophanta*.



Anexo t) – Espectro en 2D – RMN del compuesto activo de *A. lophanta*.

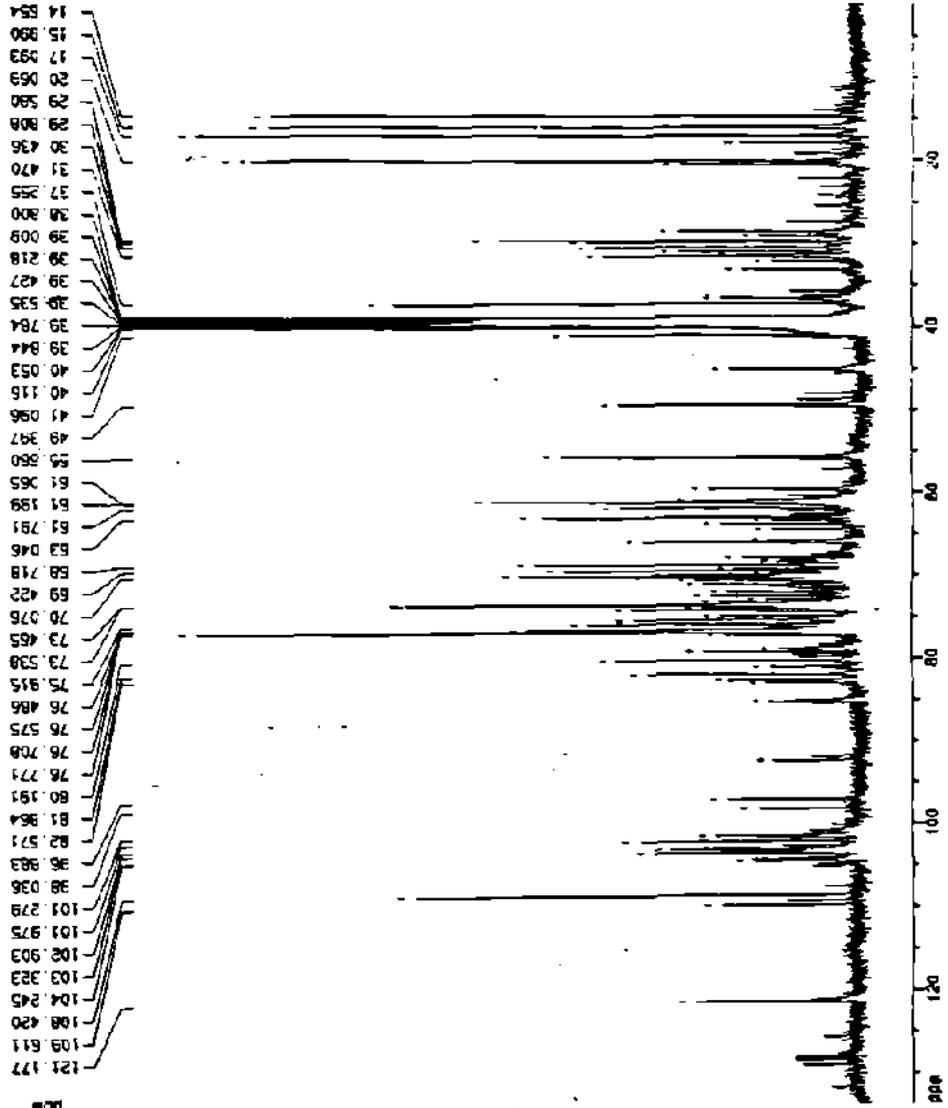
Agave lophanta

Current Data Parameters
 NAME: CHALGA
 EXPNO: 2
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ : 04/21/86
 Time : 2 25
 INSTRUM : spect
 PRGNAME : f2
 P1A PROC : f2
 P1B PROC : f2
 P1C PROC : f2
 P1D PROC : f2
 P1E PROC : f2
 P1F PROC : f2
 P1G PROC : f2
 P1H PROC : f2
 P1I PROC : f2
 P1J PROC : f2
 P1K PROC : f2
 P1L PROC : f2
 P1M PROC : f2
 P1N PROC : f2
 P1O PROC : f2
 P1P PROC : f2
 P1Q PROC : f2
 P1R PROC : f2
 P1S PROC : f2
 P1T PROC : f2
 P1U PROC : f2
 P1V PROC : f2
 P1W PROC : f2
 P1X PROC : f2
 P1Y PROC : f2
 P1Z PROC : f2

F2 - Processing parameters
 SI : 30768
 SF : 100.6180145 MHz
 SWH : 14
 FWHM : 14
 LB : 1.00 Hz
 GB : 0
 PC : 1.48

10 MHz data parameters
 CH : 20.00 MHz
 F1 : 133.724 MHz
 F2 : 133.737 MHz
 F3 : 0.000 MHz
 F4 : 0.000 MHz
 F5 : 0.000 MHz
 F6 : 0.000 MHz
 F7 : 0.000 MHz
 F8 : 0.000 MHz
 F9 : 0.000 MHz
 F10 : 0.000 MHz



Anexo v) - Espectro en ¹³CRMN del compuesto activo de *A. lophanta*.

