



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL, UNIDAD DURANGO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES
ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS DE LOS COMPUESTOS
EXTRAÍDOS DE SEIS MORFOTIPOS DE *Agave durangensis***

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias presenta:

Lic. en Biol. Jonathan Hiram Rojas Elizalde

Directores:

DR. Rene Torres Ricario

DR. José Antonio Ávila Reyes



Victoria de Durango, Dgo., Junio de 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 11:50 horas del día 29 del mes de mayo del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Identificación y evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los compuestos extraídos de seis morfotipos de *Agave durangensis*

Presentada por el alumno:

ROJAS

ELIZALDE

JONATHAN HIRAM

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro: B 1 5 1 0 0 5

aspirante de:

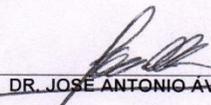
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

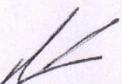
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

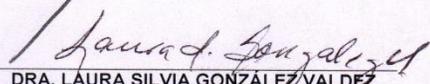
LA COMISIÓN REVISORA

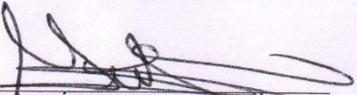
Directores de tesis


DR. RENE TORRES RICARIO


DR. JOSÉ ANTONIO ÁVILA REYES


DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA


DRA. LAURA SILVIA GONZÁLEZ VALDEZ


M. EN C. NÉSTOR NARANJO JIMÉNEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. JOSÉ ANTONIO ÁVILA REYES



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 29 de febrero del 2016

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión ordinaria No. 2 celebrada el día 03 del mes de febrero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>ROJAS</u> Apellido paterno	<u>ELIZALDE</u> Apellido materno	<u>JONATHAN HIRAM</u> Nombre (s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="padding: 2px;">B</td><td style="padding: 2px;">1</td><td style="padding: 2px;">5</td><td style="padding: 2px;">1</td><td style="padding: 2px;">0</td><td style="padding: 2px;">0</td><td style="padding: 2px;">5</td></tr></table>			B	1	5	1	0	0	5
B	1	5	1	0	0	5			

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Identificación y evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los compuestos extraídos de seis morfotipos de *Agave durangensis*

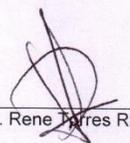
De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Rene Torres Ricario y Dr. José Antonio Ávila Reyes

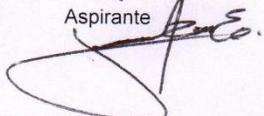
3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
El CIIDIR-IPN Unidad Durango
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

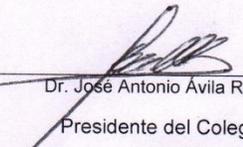


Dr. Rene Torres Ricario



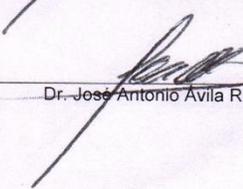
Aspirante

Lic. en Biol. Jonathan Hiram Rojas
Elizalde



Dr. José Antonio Ávila Reyes
Presidente del Colegio





Dr. José Antonio Ávila Reyes
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Durango, Dgo., el día **29** del mes de **mayo** del año **2017**, el que suscribe **Jonathan Hiram Rojas Elizalde** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental**, con número de registro **B151005**, adscrito al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Rene Torres Ricario** y del **Dr. José Antonio Ávila Reyes** y cede los derechos del trabajo titulado **“Identificación y evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los compuestos extraídos de seis morfotipos de *Agave durangensis*”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones jonathanrojaselizalde@hotmail.com, renetr21@gmail.com y jaavre@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

JONATHAN HIRAM ROJAS ELIZALDE

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Biotecnología y de la Central de Instrumentación-Microbiología, del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Durango, del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Rene Torres Ricario y el Dr. José Antonio Ávila Reyes.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	11
GLOSARIO.....	12
LISTA DE ACRONIMOS	14
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	2
1.1 La familia Agavaceae	2
1.2 Clasificación taxonómica	3
1.3 El género Agave	6
1.3.1 Características morfológicas	7
1.3.2 Las hojas.....	8
1.3.3 Variaciones ontológicas de las hojas	10
1.3.4.1 Variación individual de las hojas.....	10
1.4 Descripción de <i>Agave durangensis</i>	11
1.4.1 Morfología de <i>Agave durangensis</i>	11
1.4.2 Distribución de <i>Agave durangensis</i>	13
1.4.3 El agave como materia prima para la elaboración de mezcal.....	14
1.4.4 Denominación de origen del mezcal	15
1.5 Medicina tradicional.....	17
1.5.1 Importancia de las plantas tradicionales.....	18
1.5.2 Principios activos	19
1.6 Metabolitos secundarios	20
1.6.1 Clasificación de (MS)	23
1.6.2 Compuestos fenólicos.....	23
1.6.3 La química de los compuestos fenólicos	24
1.6.4.1 Las relaciones estructura-actividad.....	25
1.6.5.1 Los compuestos fenólicos de los subproductos agro –industriales	25
1.7 Estructura y clasificación de flavonoides.	25
1.8 Frúctanos	30

1.8.1 Alimentos nutracéuticos	30
II. Problema de investigación	31
III. Justificación.....	31
IV. Hipótesis	31
V. Objetivos	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos	32
VI. Material vegetal.....	32
VII. Metodología	33
7.1 Determinación del contenido Fenólico Total de extractos de Agave	33
7.1.2 Análisis de la capacidad antioxidante total.....	34
7.1.2.1 Preparación de la solución reactiva para medir la actividad antioxidante total mediante fosfomolibdeno.	34
7.1.3 Cuantificación de flavonoides totales	34
7.1.4 Análisis del poder reductor (Fe)	35
7.1.4.1 Preparación de los reactivos para el poder reductor.....	36
7.2 Cromatografía preparativa en papel	37
7.3.1 Pruebas de Capacidad Antioxidante Total por compuestos recuperados.	37
7.4.1 Pruebas DPPH para cada compuesto recuperado.....	38
7.5 Actividad antibacteriana.....	38
7.5.1 Microorganismos.	38
7.5.2 Evaluación de la actividad antibacteriana.	38
7.5.3 Preparación del medio de cultivo	38
7.5.4 Conteo en placa.....	39
7.5.5 Técnica de vertido en placa.....	39
7.5.6 Técnica de extensión superficial en placa.....	39
7.5.6 Conteo de UFC.....	40
7.5.7 Reguladora de fosfatos.	40
7.5.8 Perforación de la caja.....	40
7.5.9 Lectura de las placas	41
VIII. Resultados y discusión.....	41
8.2 Actividad antibacteriana.....	49
IX. Conclusiones.....	62

X. Recomendaciones.....	63
XI. Literatura citada	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hoja de <i>Agave durangensis</i>	11
Figura 2. Hojas acomodadas en forma de roseta.....	12
Figura 3. Punta acanalada, de gris a café.....	12
Figura 4. Flores y semillas.....	13
Figura 5. Distribución de <i>Agave durangensis</i> a lo largo del Estado de Durango, en los municipios de Durango, Nombre de Dios y el Mezquital.....	14
Figura 6. Zonas Geográficas para la Denominación de Origen 1) Durango, 2) Tamaulipas, 3) Zacatecas, 4) San Luis Potosí, 5) Guanajuato, 6) Guerrero y 7) Oaxaca.....	16
Figura 7. Rutas metabólicas donde se sintetizan los compuestos fenólicos.....	22
Figura 8. Estructuras químicas de fenoles simples.....	24
Figura 9. Estructura química del fenol (Huang <i>et al.</i> , 2009).....	24
Figura 10. Estructura básica de los flavonoides.....	26
Figura 11. Estructura básica de las flavonas (izquierda) y los flavonoles (derecha)..	27
Figura 12. Estructuras básicas de a: flavanonas, b: dihidroflavonoles, c: dihidrochalconas, d: flavanos y e: flavanoles.....	28
Figura 13. Estructura básica de las antocianinas.....	29
Figura 14. Estructura básica de los isoflavonoides.....	29
Figura 15. Curva de calibración del estándar Acido Gálico.....	33
Figura 16. Curva de calibración de Quercetina.....	35
Figura 17. Rendimiento de extracción de las seis líneas morfológicas de <i>Agave durangensis</i>	42
Figura 18. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>Salmonella tiphimurium</i>	49
Figura 19. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>Salmonella tiphimurium</i>	50

Figura 20. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i>	51
Figura 21. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i>	52
Figura 22. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>E. coli</i>	53
Figura 23. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>E. coli</i>	54
Figura 24. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3-R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	55
Figura 25. Actividad antibacteriana de extracto de <i>Agave durangensis</i> (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6-R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propuestas taxonómicas del género <i>Agave</i> en la Familia <i>Agavaceae</i>	4,5
Tabla 2. Flavonoides totales expresados como mg Equivalentes de Quercetina/ g de MS de las seis líneas morfológicas de <i>A. durangensis</i>	43
Tabla 3. Fenoles totales de extractos de <i>Agave durangensis</i> mg de EAG/ g. de extracto seco.....	44
Tabla 4. Fenoles totales. El resultado se expresa en Equivalentes de Ácido Gálico/ gr. Extracto seco. Desviación estándar y coeficiente de variación de las seis líneas morfológicas de <i>Agave durangensis</i>	44
Tabla 5. Análisis de Varianza (ANOVA).....	45
Tabla 6. Análisis del Poder Reductor (Fe) Resultados de la lectura que se realizó a 700 nm. Para obtener su absorbancia de cada extracto de <i>Agave durangensis</i>	46
Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson para extractos de <i>Agave durangensis</i> ..	47
Tabla 8. Capacidad antioxidante total de los compuestos aislados mediante cromatografía preparativa en papel y análisis del bloqueador del radical libre DPPH. Registros espectrofotométricos..	48
Tabla 9. Actividad antibacteriana de extractos de seis líneas morfológicas de <i>Agave durangensis</i>	57
Tabla 10. Medidas de Halos de Halos de inhibición en mm. Microorganismos de referencia (Cepas)	58
Tabla 11. Medidas de Halos de Halos de inhibición en mm. Microorganismos de referencia (Cepas)	59
Tabla 12. Conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	60

GLOSARIO

1. **Angiosperma:** Planta con flores que produce frutos con semillas.
2. **Antimicrobiano:** Sustancia química que, a bajas concentraciones, actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento.
3. **Bacterias Gram negativas:** Son aquellas bacterias que NO se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue.
4. **Bacterias Gram positivas:** Son aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram.
5. **Biomolécula:** Moléculas constituyentes de los seres vivos que contienen carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno, fosforo y azufre.
6. **Biosíntesis:** Formación de compuestos orgánicos realizado por organismos vivos a través de compuestos sencillos.
7. **Carbohidrato:** Molécula orgánica compuesta por carbono, hidrogeno y oxígeno, forma biológica primaria de almacenamiento y consumo de energía.
8. **Carola:** Cubierta o verticilo interior de las flores completas, que protege los órganos de la reproducción.
9. **Enzima:** Moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas.
10. **Enzimas:** Proteínas catalizadoras producidas por un organismo vivo que aceleran reacciones químicas específicas.
11. **Especie:** Se define a como un grupo de organismos capaces de entrecruzarse y de producir descendencia fértil.
12. **Estilo:** El estilo de una flor de angiosperma es la prolongación del ovario al final de la cual aparece el estigma.
13. **Evolución:** Es el conjunto de transformaciones o cambios a través del tiempo que ha originado la diversidad de formas de vida que existen sobre la Tierra a partir de un antepasado común.
14. **Fito hormona:** Sustancias producidas por celular vegetales en sitios estratégicos, son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas.
15. **Fitoquímica:** Disciplina que estudia la composición de metabolitos secundarios de las especies vegetales.

16. **Foliar:** De las hojas de las plantas o relativo a ellas.
17. **Gen:** Unidad funcional y física de la herencia que pasa de padres a sus descendientes. Secuencias de ADN que contienen la información necesaria para la formación de una cadena polipeptídica.
18. **Genoma:** Totalidad de información genética que posee un organismo en particular.
19. **Lípido:** Biomoléculas orgánicas formadas principalmente de carbono e hidrógeno, insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos.
20. **Metabolito:** Cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo.
21. **Microorganismo:** Seres vivos diminutos que únicamente pueden ser apreciados a través de un microscopio.
22. **Monocotiledónea:** Angiospermas que se caracterizan por presentar un solo cotiledón en su embrión.
23. **Nucleótido:** Molécula orgánica formada por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.
24. **Lanceolada:** Al final de la hoja, la base es más ancha.
25. **Patógeno:** Aquel elemento o medio capaz de producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea este humano, animal o vegetal.
26. **Perenifolio:** Siempre mantiene el follaje.
27. **Perennifolio:** Término para designar a los árboles arbustos que poseen hojas vivas a lo largo de todo el año, en contraposición al término caducifolio.
28. **Proteína:** Son moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos.
29. **Psicodélico:** Psicotrópico cuya principal acción consiste en alterar la cognición y la percepción de la mente.
30. **Ruta metabólica:** En bioquímica, una ruta metabólica o vía metabólica es una sucesión de reacciones químicas que conducen de un sustrato inicial a uno o varios productos finales, a través de una serie de metabolitos intermedios.
31. **Transcripción:** Primer proceso de la expresión génica, mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia de ADN hacia la secuencia de proteína utilizando diversos ARN intermedios.

LISTA DE ACRONIMOS

- 1.-°C: grados centígrados.
- 2.- 4CL: 4-cumarato: CoA ligasa.
- 3.- AABTS: absorbancia del ABTS en solución (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio).
- 4.- ACL: cinamato-a-hidroxilasa.
- 5.- ADPPH: absorbancia del DPPH* en solución (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).
- 6.- AF: ácido fenólico.
- 7.- ANOVA: análisis de la varianza.
- 8.-ATCC: American Type Culture Collection (Colección de cultivos de Tipo Americano).
- 10.- CIM: concentración mínima inhibitoria.
- 11.- DMAPP: dimetilalil pirofosfato.
- 12.- DXP: 5-Fosfono-1-Desoxi-D-Xilulosa.
- 13.-E.C.V.: enfermedades cardiovasculares.
- 14.- E4P: eritrosa-4-P.
- 15.- EAA: Equivalentes de Ácido Ascorbico.
- 16.- EC50: concentración media efectiva.
- 17.- EGA: Equivalentes de Ácido Gálico.
- 18.- EQ: Equivalentes de Quercetina.
- 19.- HCA-CoA: hidroxicinamoil CoA.
- 20.- HCAs: ácidos hidróxicinamicos.
- 21.-HM: Muller Hinton.

22.- MS: metabolito secundario.

23.- msnm: metros sobre el nivel del mar.

24.-NCCLS: National Committee for clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico).

25.-nm: nanómetros.

26.-OMS: Organización Mundial de la Salud.

27.-PAL: fenilalanina amonio liasa.

28.-PEP: ácido fosfoenolpiruvico.

29.- pH: potencial de hidrógeno.

30.-RPM: revoluciones por minuto.

31.-UFC: unidades formadoras de colonias.

41.- UV: ultravioleta.

RESUMEN

El género *Agave* es uno de los recursos vegetales con mayor riqueza y diversidad de México. Este género es nativo del continente americano, su distribución abarca desde la región meridional de Estados Unidos de Norteamérica llegando hasta Centroamérica, incluido todo México. El mayor número de especies del género son originarias de nuestro país, de un total de 131 especies de 120 (91.6 %). Debido a esto la industria regional en el Estado de Durango para la elaboración de mezcal es una fuente importante que tiene un potencial de desarrollo económico al utilizar *Agave durangensis* para su elaboración.

Agave durangensis es altamente variable en tamaño, color de hojas y tamaño y la forma de los dientes, existe una controversia importante alrededor de la delimitación taxonómica de esta especie, a consecuencia de la alta variabilidad morfológica y genética, y al poco estudio de este grupo.

En este estudio, se utilizaron técnicas espectrofotométricas, para evaluar las propiedades antioxidantes de los extractos, así como la evaluación de las propiedades antibacterianas de los extractos probados contra bacterias patógenas de interés humano.

Pudieron ser corroboradas las propiedades antioxidantes y la detección de la actividad biológica de los extractos de *Agave durangensis* frente a dos de las bacterias utilizadas en este estudio presentando un halo de inhibición promedio de 12 mm contra *S. aureus* y 15 mm. de halo de inhibición para *E. coli* respectivamente, presentando el mismo comportamiento cada uno de los extractos de las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis* evaluadas.

ABSTRACT

The genus *Agave* is one of the most rich and diverse plant resources in Mexico. This genus is native of the American continent, the distribution ranges from the southern region of the United States of North America to Central America, including all of Mexico. The largest number of species of the genus originate from our country, out of a total of 131 species of 120 (91.6%). Due to this the regional industry in the State of Durango for the elaboration of mezcal is an important source that has a potential of economic development when using *Agave durangensis* for its elaboration.

Agave durangensis is highly variable in size, leaf color and size and shape of teeth, there is a major controversy surrounding the taxonomic delimitation of this species, as a result of the high morphological and genetic variability, and a little study of this group.

In this study, spectrophotometric techniques were used to evaluate the antioxidant properties of the extracts, as well as the evaluation of the antibacterial properties of the extracts tested against pathogenic bacteria of human interest.

The antioxidant properties and detection of the biological activity of *Agave durangensis* extracts against two of the bacteria used in this study could be corroborated with an average inhibition halo of 12 mm against *S. aureus* and 15 mm. Of inhibition halo for *E. coli* respectively, each of the extracts of the six morphological lines of *Agave durangensis* having the same behavior.

INTRODUCCIÓN

El Agave es una planta con una importante relevancia; también supone una cultura y tradición e implica una forma de vida y en tiempos prehispánicos, una forma de supervivencia. Mesoamérica, ha sido escenario del origen y evolución del Agave. Esta planta ha sido utilizada, desde los primeros pobladores hasta la actualidad, para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas como alimento, forraje, medicamentos y construcción, entre otros (Gentry, 1982).

El mayor número de especies del género son originarias de nuestro país, de un total de 131 especies de Agaves 120 (91.6 %) son de distribución nacional y el 8.4 % restante son de regiones comprendidas en territorio de EUA, Guatemala, Belice, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá y unos cuantos países más al sur. En nuestro País se les ha descrito en casi todos los Estados (Gentry, 1982).

Durango tiene una importante diversidad de especies de Agave cuenta con 29 especies (González-Elizondo *et al.*, 2009), entre ellas *Agave durangensis*.

Agave durangensis es un recurso importante para Durango porque sustenta una industria regional para la elaboración de mezcal. Esta industria tiene el potencial de desarrollo para convertirse en generadora de empleos y desarrollo estatal, siempre y cuando la materia prima, las plantas de Agave, se conserven de manera silvestre y se establezcan plantaciones con genotipos sobresalientes y lleve un control de calidad en el proceso de su elaboración (Valenzuela., 2003)

Durante el proceso de elaboración del mezcal se desechan las hojas de las pencas, lo que es una fuente potencial para la obtención de antioxidantes naturales, se hizo una revisión bibliográfica encontrando estudios sobre perfil fenólico de este complejo, sus propiedades antioxidantes, pero no se encontró reporte alguno sobre su actividad antibacteriana. El objetivo de este trabajo, fue evaluar las propiedades antioxidantes y antibacterianas de extractos de seis líneas morfológicas de *Agave durangensis* identificados en el CIIDIR-IPN, Unidad Durango. Para comprobar la actividad biológica contenida en los extractos al probarlos con cepas de referencia procedentes del laboratorio de Microbiología del IPN.

I. ANTECEDENTES

Según los códices mexicas, los Aztecas durante su migración al Valle de México, extrajeron el aguamiel y elaboraron el pulque entre 1172 y 1291 D.C., aunque evidencias arqueológicas muestran que las personas que habitaban este lugar antes de la llegada de los Aztecas habían usado el maguey previamente por miles de años (Gentry, 1982)

Esta planta ha sido utilizada, desde los primeros pobladores hasta la actualidad, para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas como alimento, forraje, medicamentos y construcción, entre otros (Granados, 1993).

1.1 La familia Agavaceae

La familia Agavaceae es nativa del Continente Americano, se encuentra distribuida principalmente en los ambientes áridos y semiáridos. Los Agaves son endémicos de América, su distribución abarca desde la región meridional de Estados Unidos de Norteamérica llegando hasta Centroamérica, incluido todo México. El mayor número de especies del género son originarias de nuestro país, de un total de 131 especies de Agaves 120 (91.6 %) son de distribución nacional y el 8.4 % restante son de regiones comprendidas en territorio de EUA, Guatemala, Belice, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá y unos cuantos países más al sur. En nuestro País se les ha descrito en casi todos los Estados (Gentry, 1982).

México es considerado el centro de origen de esta familia debido a que en su territorio se encuentra la mayor riqueza y diversidad de géneros de la misma (García-Mendoza, 2007). Dentro de esta familia se reconocen nueve géneros y entre 293 y 300 especies (Good-Ávila *et al.* 2006) Para México, García-Mendoza y Galván (1995) reportan 217 especies.

Durango tiene una importante diversidad de especies de Agave cuenta con 29 especies (González-Elizondo *et al.*, 2009), entre ellas Agave durangensis.

Las características distintivas de los elementos de la familia Agavaceae son el arreglo de roseta de las estructuras foliares; un número cromosómico básico de 30, cinco cromosomas grandes y 25 pequeños, semillas con fitomelano, que les da la

pigmentación negra; flores grandes bisexuales; y frutos triloculares (García-Mendoza y Galván, 1995).

1.2 Clasificación taxonómica

Gentry 1982 logró hacer concurrir en su libro *Agaves of Continental North América*, la mayor cantidad de elementos biológicos, correlacionando caracteres anatómicos muy detallados logrando relacionar aspectos de su desarrollo y distribución geográfica, actualmente considerados la mejor forma para identificar especies de este Género. El considera negativo que la aplicación de solo algunos criterios taxonómicos, como la constancia entre generaciones y entre clones hortícolas, se hicieron comunes en series de referencia, tendiendo a acentuar las diferencias clónales ya sea interclonales o interespecíficas (y no como debería de ser entre especies). Pero que acordes a los preceptos de la sistemática moderna, estas “especies” o taxa deberían ser estudiados y revisados acordes con técnicas clásicas y también con procedimientos “modernos”; Las primeras basadas en la morfología comparativa y las ultimas en la observación y análisis de poblaciones, ecología, citología y otras ramas de la ciencia que estén a la mano para estudios de especiación, lo que también dejaría lugar para estudios de tipo molecular. A estos razonamientos habría que agregar que este grupo de plantas es joven desde el punto de vista evolutivo y que por el poco tiempo que tienen las especies de haberse iniciado su formación, pueden presentar muchas características en común, lo que hace necesario reunir el mayor número de evidencias o mayor cantidad de datos biológicos para esta manera tener menor margen de error.

A continuación se en listan una series de caracteres propios del género y que usualmente son tomados en cuenta al intentar clasificar especímenes pertenecientes a los Agaves. Tan variados como la forma de la planta, su forma de crecimiento, reproducción, anatomía de sus tejidos, compuestos químicos, etc.

La delimitación genérica de la familia Agavaceae y su reconocimiento han variado a través del tiempo. En la actualidad la circunscripción familiar más aceptada es la propuesta por Dahlgreen *et al.* (1985), quienes delimitan la familia con 8 géneros. Actualmente se considera un noveno género (Hesperoyucca), segregado de Yucca.

Tabla 1. Propuestas taxonómicas del género Agave en la Familia Agavaceae.

	Hutchinson (1959)	Dahlgreen et. al. (1985)	Cronquist (1981 y 1998)	Conabio (2006)
Reino	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Subreino				Tracheobionta
División	<i>Angiospermae</i>	Magnoliophyta		Magnoliophyta
Clase	<i>Monocotiledoneae</i>	Liliopsida	Liliopsida	Liliopsida
Subclase			Liliidae	Liliidae
Orden	Agavales	Asparagales	Liliales	Liliales
Familia	Agavaceae	Agavaceae	Agavaceae	Agavaceae
Subfamilia	Agaveae	Agavoideae A		
(tribus)	Dracaenae Nolineae Phormieae Polyantheae Yuceae	Yuccoideae B		
Género	<u>Agave</u> Beschorneria Furcraea Doryanthes Cordyline Cohnia Dracaena Sansevieria	<u>Agave A</u> <u>Beschomeria A</u>	<u>Agave</u>	<u>Agave</u> <u>Furcraea</u>

Nolina			
Calibanus		<u>Cordyline</u>	
Dasyilirion		<u>Dracaena</u>	
<u>Phormium</u>		Sansevieria	
<u>Polyanthes</u>		<u>Nolina</u>	
<u>Prochnyanthes</u>			
Pseudobravoa		<u>Dasyilirion</u>	
<u>Hesperaloe</u>		<u>Phormium</u>	<u>Phormium</u>
Clistoyucca	<u>Polianthes A</u>		<u>Polyanthes</u>
<u>Yucca</u>	<u>Prochnyanthes</u>		
	<u>A</u>		
Samuela			
	<u>Hesperaloë B</u>		<u>Hesperaloë B</u>
	<u>Yucca B</u>	<u>Yucca</u>	Yucca
	Manfreda A		
			<u>Manfreda</u>
Subgénero	Littaea		
	Agave		

El género *Agave* según el tipo de inflorescencia que presenta, se divide en dos subgéneros; el subgénero *Agave* que tiene una inflorescencia en panícula, en el cual se encuentran las especies de importancia económica tales como *A. tequilana*, *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*, y el subgénero *Littaea* que presenta una inflorescencia en forma de espiga (Irish, 2000).

1.3 El género *Agave*

El cuerpo de estas plantas usualmente toma la forma de una roseta por la disposición sus hojas, en donde acumulan sustancias, que requieren para crecer y florecer. Si hacemos a un lado los años requeridos para madurar, estas plantas parecen como hierbas gigantes, que crecen y florecen una sola vez como si fueran anuales y también son parecidas a los árboles en que requieren de largo tiempo para madurar en tamaño y también para florecer. El crecimiento y la acumulación de reservas se dan simultáneamente en períodos de 8 a 20 años, necesarios para desarrollar las inflorescencias solo cuando alcanzan un nivel de reservas desarrollando una estructura floral en su meristemo apical. Las flores utilizan las reservas de las hojas dejándolas literalmente secas conforme las semillas maduran. (Gentry, 1982).

Si algo funciona mal en la transición de flores a semillas, la planta recurre a la formación de los bulbilos o brotes que forman pequeñas plantas con una función aproximadamente igual a la de las semillas (Gentry, 1982).

La mayoría de los *Agaves* cultivados son clones, genéticamente iguales, puesto que por lo general se reproducen por brotes rizomatosos (hijuelos que surgen alrededor de la base de la planta) y por bulbilos de las inflorescencias que se pueden considerar ramificaciones de la planta madre. Algunos de cultivares son poliploides estériles que raramente o nunca producen semillas viables. Como son los de casos de *A. fourcroydes* Lem y *A. tequilana* Weber, Los bulbilos y brotes rizomatosos son formados por arriba del nivel de las raíces en la base de las hojas y en muchas especies son llamados “semillas” por los agricultores, pero en realidad son propágulos. Otras especies del género raramente o nunca proliferan por brotes (García-Mendoza y Galván, 1995).

Algunas desarrollan brotes solo cuando las rosetas son jóvenes, mientras que otras pueden producirlos a lo largo de toda su vida y algunas otras, solo producen los brotes al final de la maduración de la inflorescencia, o hay los que nunca los producen.

Sin embargo, la mayoría de las poblaciones de agaves silvestres producen semillas, en ocasiones simultáneamente con bulbilos o brotes inferiores, por lo que disponen de reproducción sexual y asexual (Gentry, 1982).

1.3.1 Características morfológicas

El tallo de los agaves es un brote corto muy breve y visible con dificultad. Muchos agaves son rosetas sésiles (sin tallo visible, acaulescentes). En otros ésta característica puede depender de las condiciones ambientales, pues cultivados en jardines en países ajenos a su lugar de origen, la maduración floral toma más tiempo de lo común, en las que sus hojas y tallo pueden continuar creciendo en forma inusual por muchos años, resultando en una planta elongada. En el tallo que ha almacenado nutrientes, se origina el escapo (vástago de la inflorescencia) desarrollándose a partir del meristemo central, como una larga porción terminal más o menos recta, con un tipo diferente de hojas o brácteas (Gentry, 1982)

El tallo junto con la base de todas las hojas espiralmente intercaladas, forma una masa de tejido fibroso meristemático blanco, rico en carbohidratos que son fácilmente convertidos en azúcares cuando se les procesa con calor. Al ser retiradas las partes verdes de las hojas, el tallo redondeado tiene el aspecto de una piña, también conocida como cabeza, ampliamente empleadas por los americanos nativos para alimentarse o para preparar bebidas fermentadas. Los españoles a su llegada al continente las utilizaron cocidas y fermentadas para preparar con sus destilados mezcal y tequila. La roseta o cuerpo del agave también es su forma de defensa, puesto que las espinas terminales rectas y las espinas laterales o “dientes” protegen al cuerpo y resguardan particularmente a las flores y sus vástagos que comúnmente son comidos por animales mayores (Gentry, 1982).

Los campesinos emplean las especies de mayor talla para delimitar propiedades como cercas vivientes. Algunos animales como las cabras pueden comer hojas de agave presionados por el hambre, como es el caso de *A. lechuguilla*, una especie menor de Agave que en algunos lugares produce sustancias tóxicas (Gentry, 1982)

1.3.2 Las hojas

Las hojas de agave se originan en forma espiral, generalmente son gruesas y suculentas, aunque algunas especies son de consistencia dura como *A. striata*. Después de germinar la semilla la plántula requiere de varios años para formar el cono central o cogollo. Proceso que se caracteriza por el empalme de las hojas, que requiere de tiempo para su maduración y desenvolvimiento sucesivo, dejando en las más externas una marca o impresión sobre el envés de la hoja con la que tiene contacto directo, dándole un aspecto particular a la roseta, marca perdura por varios años hasta que la planta muere. Una de las funciones de los nutrientes almacenados y eventualmente consumidos para desarrollar la inflorescencia, se origina de las hojas principalmente y del parénquima inmediato con el que están conectadas. En la hoja de la mayoría de las especies, se entrelazan hileras de numerosos haces vasculares gruesas, desde la base de la hoja hasta la espina terminal, haciendo contacto con las espinas en los márgenes de las pencas (Gentry, 1982)

En algunas especies estas fibras representan importantes recursos económicos como es el caso de las especies *A. sisalana*, *A. fourcroydes*. Mientras las hojas estén túrgidas se mantendrán con la edad, rectas y ascendentes o en forma horizontal, pero en períodos prolongados de sequía, cambiarán la forma de la penca, de leve a acentuadamente acanalada, y en caso de sequía extrema las pencas se colapsan inclinándose el extremo al suelo, con su cono central desorganizado, sin embargo la mayoría de las hojas recuperan su turgencia y forma tradicional al proporcionar agua a las plantas. La floración ocasiona en la mayoría de las especies el final de las pencas, durante la maduración de los frutos y de las semillas, proceso que generalmente toma varios meses (Gentry, 1982)

En conjunto la forma, abundancia y acomodo de las hojas, su color, longitud, grosor de su epidermis, y capacidad de almacenaje de nutrientes son elementos útiles en taxonomía, aunado a la abundancia, forma y distribución de sus espinas (Granados, 1993).

Esta protección no solo está en la parte terminal de la mayoría de las especies, también se extiende a los lados, por un borde cuticular o coriáceo que puede ser continuo o discontinuo y en ocasiones ausente. Estos márgenes, presentan frecuentemente salientes alternas en forma de sierra llamadas dientes, ya sea su patrón morfológico, presencia o ausencia, también pueden ser de valor taxonómico. Su ausencia, es característica en el subgénero *Littaea* como por ejemplo en: *A. pendunculifera* Trel., *A. deserti* Engelm., *A. cerulata* Trel., en cambio son presentes en el subgénero *Agave*, en donde esporádicamente producen individuos con un arreglo irregular de sus dientes (Granados, 1993).

El número forma y distribución de las espinas laterales son muy diversos, así como el color cambiante según la fisiología, la época del año o de la edad de las pencas, son características que, en ocasiones, pueden ayudar a definir algunas especies. La espina terminal también ha sido utilizada como carácter diagnóstico de especie, tomando en cuenta el color, forma, grosor y la forma acanalada de la región dorsal. Cuando la estructura cuticular de la espina se continúa para abajo, por el borde de la hoja se le denomina decurrente.

Muchas de las variaciones en los dientes y tipo de color fueron utilizados por los antiguos taxónomos aficionados para delimitar especies, pero en estudios detallados de las poblaciones han revelado a menudo que en realidad son variaciones de la misma especie (Granados, 1993).

Los agaves son monocárpicos, semélparos, esto es que sólo tienen una floración al final de la cual la planta muere. Son plantas adaptadas a condiciones de aridez; las raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, succulencia, estomas hundidos y metabolismo fotosintético del tipo CAM, son algunos de los atributos que le permiten establecerse en zonas carentes de agua (Granados, 1993).

1.3.3 Variaciones ontológicas de las hojas

El color tamaño y forma de las hojas, así como la presencia y características de las espinas pueden variar mucho con la edad de la planta. Partiendo de las pequeñas hojas de la plántula, estas experimentan muchos cambios conforme la planta evoluciona con la maduración, especialmente durante el período de floración, en que cada nueva hoja disminuye su tamaño y forma, hasta transformarse en las brácteas (hojas originadas sobre el tallo floral), que disminuyen gradualmente sus proporciones conforme se forman hacia la parte apical del pedúnculo floral. En su estado final al extremo de la estructura floral (escapo) las brácteas casi no conservan ninguna similitud con las hojas de la roseta. (Gentry, 1982)

1.3.4.1 Variación individual de las hojas

Esta variación se refiere a las diferencias entre las hojas originadas entre plantas de una misma población. Estando conscientes de las variaciones ontológicas, podríamos suponer que la variación individual debería ser simple, aunque no siempre es así. En ocasiones lo que aparenta ser una población de agaves, resulta una clona, un conjunto de individuos dispersos en espacios relativamente grandes generados por crecimiento vegetativo en donde las diferencias que se puedan observar, pudieran ser generados fisiológicamente por el sitio en que crecen, por ataques de insectos, o a efectos de suelo. Si la población es parcialmente asexual y parcialmente producto de cruzamiento sexual y formada por semilla, tendremos una mezcla de variaciones genéticas y fisiológicas (Granados, 1993).

Tales mezclas de piezas de rompecabezas de fidelidad clonal y de clara variación genética individual son ampliamente ilustradas en la población masiva de *Agave cerrulata* Trel., del desierto de Baja California en donde la propagación es por dos métodos, por hijuelos y por semilla. En donde Gentry registró más de veinte formas, solamente de caracteres de hojas. Un caso más claro es el de *A. deserti* (Granados, 1993).

1.4 Descripción de *Agave durangensis*

Agave durangensis es una de las especies más importantes en el Estado de Durango debido a su importancia económica como materia prima de una industria regional de elaboración de mezcal. Esta especie pertenece a la sección Ditepalae, la cual se caracteriza por incluir, de acuerdo a Gentry (1982), plantas de pequeñas a grandes, con rosetas glaucas brillantes, productoras de semillas (existen especies de *Agave* que no se reproducen por semillas y su reproducción es básicamente vegetativa García-Mendoza 2007), con hojas firmes a rígidas, con panículas generalmente abiertas; yemas florales generalmente rojizas, flores maduras amarillas; tépalos dimórficos, los externos más grandes y sobreponiendo los internos, generalmente rojos en la punta.

1.4.1 Morfología de *Agave durangensis*

La descripción morfológica de *Agave durangensis* que se presenta a continuación está basada en el trabajo de Gentry (1982). El tallo de esta especie es corto, cenizo. Presenta hojas lanceoladas, derechas o curvas, planas o cóncavas especialmente hacia el ápice, gruesas y convexas en la base; ásperas, espinosas, con márgenes crenados o con espinas de uno a dos cm de largo, aplanadas, ampliamente separadas (Fig. 1).

Las hojas varían de 40 a 90 cm de largo por 14 a 22 cm de ancho, acomodadas en roseta, ésta última de 80-120 cm de alto por 120-180 cm de ancho (Fig. 2), las hojas presentan una punta de 4 a 6 cm de largo, acanalada en su alrededor, con coloraciones de gris a café (Fig. 3)



Figura 2. Hoja de *Agave durangensis*

El tallo floral varía de 7 a 8 m de altura, con 18 a 30 ramificaciones hacia la parte superior, brácteas pedunculares de 15 a 25 cm de longitud. Flores en pequeños grupos; de 60 a 80 mm de longitud; casi erectas; de color amarillo; con ovario ínfero de 30-45 mm (Fig. 4). Las semillas son pequeñas, con forma alunada u ovada; bordes pequeños que están levantados semejando alas.



Figura 2. Hojas acomodadas en forma de roseta.



Figura 3. Punta acanalada, de gris a café.



Figura 4. Flores y semillas

Agave durangensis es morfológicamente muy variable (Gentry 1982). Variaciones en tamaño, longitud y color de las hojas, y tamaño y forma de los dientes son fácilmente apreciables en campo. Esa alta variabilidad crea dificultad para establecer su delimitación específica, lo que justifica la búsqueda de caracteres diferentes a los morfológicos pero que complementen a estos, como los perfiles fenólicos, para abordar la problemática taxonómica de este grupo de plantas.

1.4.2 Distribución de *Agave durangensis*

Agave durangensis se distribuye de manera natural al sur del Estado de Durango y norte de Zacatecas. Dentro del Estado de Durango se encuentra en los municipios de Durango, Nombre de Dios y Mezquital (Gentry 1982; González-Elizondo *et al.* 2009)

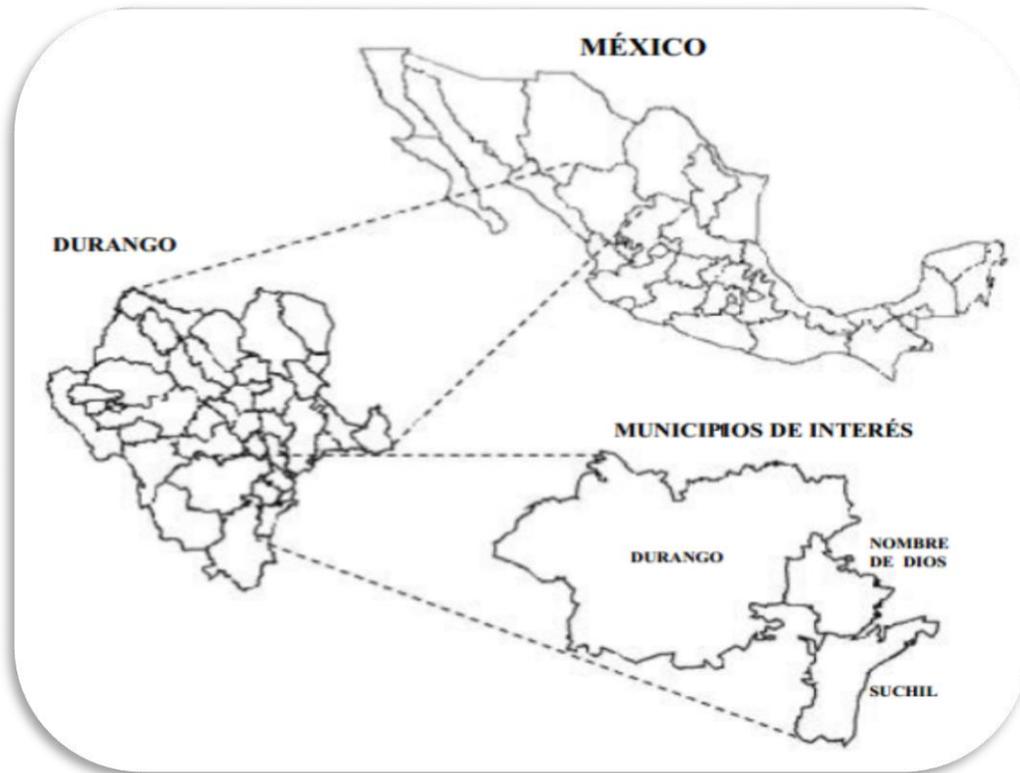


Figura 5. Distribución de *Agave durangensis* a lo largo del Estado de Durango, en los municipios de Durango, Nombre de Dios y el Mezquital.

1.4.3 El agave como materia prima para la elaboración de mezcal.

Ésta y otras especies del género se han aprovechado de manera empírica desde tiempo atrás en el estado para producir mezcal, bebida alcohólica con denominación de origen que se pretende alcance los niveles de calidad y producción similares a los del tequila (Valenzuela *et al.*,2003). Su aprovechamiento representa una fuente de recursos económicos importante para los habitantes de las comunidades rurales que, en general, viven en condiciones sociales marginales.

En Durango se ha registrado el uso empírico (comestible, medicinal, artesanal, ornamental) de diversas especies de *Agave*, entre ellas *A. durangensis*, por los Tepehúanes del Sur y por la población campesina en general (González y Galván, 1992, González-Elizondo *et al.* 2009).

La elaboración de mezcal en México es una actividad realizada principalmente en los estados de Oaxaca, Durango, Zacatecas, Guerrero, San Luís Potosí, Tamaulipas y Guanajuato, con plantas de Agave de tierras de agricultura de temporal. De acuerdo a (Illsley, 2007) más de una decena de especies de Agave, distribuidos en casi una tercera parte del territorio nacional, sobre todo durante la época de estiaje, cultivados y recolectados, se convierten en mezcal.

Esta es una actividad económica que es un eje potencial de desarrollo de las regiones productoras de agave. El agave está disponible para su uso en la elaboración de mezcal cuando adquiere una edad entre los 7 y los 12 años, está en su punto de madurez fisiológica, lo cual depende de la especie y de las condiciones agroecológicas y ambientales a las que hayan sido expuestos.

En este periodo el agave llega a su madurez para iniciar su reproducción sexual que se caracteriza por la emisión del escapo floral o “quiote”. Esta etapa se caracteriza y se distingue físicamente porque las pencas son más delgadas y erguidas alrededor del cogollo, con espinas terminales de color negro brillante, pequeñas y delgadas, el maguey en esta fase es conocido como maguey quiotillo a acarrillado.

Lo óptimo es tener un maguey maduro capado que se deja sazonar por varios meses (hasta 6), lapso en que concentra los azúcares, lo cual redundara en tener el mejor rendimiento y los mezcales de mejor calidad y sabor. (Aguirre *et al.*, 2001).

1.4.4 Denominación de origen del mezcal

Se entiende por Denominación de Origen al nombre de una región geográfica del país que sirve para designar un producto originario de la misma y cuya calidad o característica se deban exclusivamente al medio geográfico comprendiendo en este los factores naturales y humanos. El Mezcal, al igual que el Coñac, el Champagne, entre otras, sólo es posible obtenerlo en una región, la cual fue registrada el 9 de marzo de 1995 por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) con sede en Ginebra Suiza. En la declaración de protección (Denominación de Origen Mezcal), se establece como región geográfica las comprendidas por los estados de: Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango.



Figura 6. Zonas Geográficas para la Denominación de Origen 1) Durango, 2) Tamaulipas, 3) Zacatecas, 4) San Luis Potosí, 5) Guanajuato, 6) Guerrero y 7) Oaxaca

El mezcal presenta ciertas ventajas no solo en su elaboración sino también legales como: el hecho de que cuenta con la denominación de origen mencionada, y reconocida internacionalmente. Así mismo en el interior de México el mezcal está sujeto a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-070-SCFI-1994. BEBIDAS ALCOHÓLICAS-MEZCAL. Esta NOM establece las características y especificaciones que deben cumplir los usuarios autorizados para producir y/o comercializar la bebida alcohólica destilada denominada mezcal, con ello se garantiza la originalidad del producto ya que solo existirá mezcal hecho y envasado en México.

1.5 Medicina tradicional

El interés actual en la medicina tradicional y la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas tiene sus raíces en una creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en la cura de algunas enfermedades como por los efectos colaterales que ciertos medicamentos acarrearán. También influyen el aspecto económico y la tendencia, cada vez más evidente en ciertos sectores de la población, de reencontrar valores y de adoptar modos de vida más “naturales”.

La elaboración y difusión de un inventario de plantas silvestres, usadas como medicinales, es una manera de detectar nuevas fuentes potenciales de principios activos y materias primas para la elaboración de medicamentos y, al mismo tiempo, de rescatar y revalorar los conocimientos botánicos populares. La aculturación, aunada a la destrucción de ecosistemas y a la acelerada pérdida de diversidad biológica incrementan el sentido de urgencia para inventariar los recursos terapéuticos que ofrece la naturaleza (Lozoya., 1994).

Las plantas podrían ser parte de la solución a la futura carencia de energéticos, mediante la utilización de residuos vegetales para la producción de alcohol, con ello pasaríamos de la era petroquímica a la era de la fitoquímica (Duke, 1985). Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo.

Estas sustancias se conocen como principios activos y, generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta. Los principios activos tienen propiedades medicinales o preventivas, o funcionan incrementando el bienestar. El estudio de las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia, y el efecto que ocasionan esas sustancias en el organismo se estudia en farmacología. La fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas (Domínguez, 1976).

En México alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (Aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales. (Ocegueda, S., E Moreno y P. Kolleff. 2005)

1.5.1 Importancia de las plantas tradicionales

En los últimos años el interés por las plantas medicinales se ha incrementado en los recolectores, productores, industrias transformadoras, instituciones públicas y/o privadas y consumidores (Azizi *et al.*, 2007). Lo anterior obedece a las características aromáticas, terapéuticas y de conservación que tienen estas plantas (Sangwan *et al.*, 2001), así como a su uso en productos nutracéuticos, fitoterapia, aromaterapia, entre otras aplicaciones.

Es importante destacar que los principales sectores industriales que utilizan hierbas aromáticas y medicinales son en orden de importancia: medicinal y herbolario, alimentario y perfumero-cosmético (Heywood, 1999).

En el sector medicinal se encuentran la industria farmacéutica y la fitoterapia, que utilizan las plantas secas y/o sus extractos o los principios activos aislados para la fabricación de medicamentos. Alemania y Francia destacan como los principales consumidores de materia prima para la elaboración de fitofármacos (Bancomext, 2006).

La aromaterapia es otra rama industrial importante que demanda aceites esenciales de alta calidad. La herbolaria por su parte constituye un amplio campo de conocimientos y prácticas en las que el conjunto heterogéneo de personas recurre a las hierbas para tratar padecimientos de diversa índole (Cases, 2007), entre ellos malestares físicos y síndromes psicosomáticos (Martínez-Moreno *et al.*, 2006).

En el sector alimentario existen productos frescos y secos destinados directamente al consumidor y productos destinados a la industria. En la industria agroalimentaria se utilizan con más frecuencia condimentos de origen natural como saborizantes, colorantes y conservadores debido a su actividad antioxidante (Tomaino *et al.*, 2004), antibacterial (Burt, 2004) y anti fúngica, las cuales son atribuidas a los fenoles y ácidos fenólicos, entre otros.

Actualmente, también se tienen nuevas aplicaciones en otros sectores como la ganadería, el control de plagas agrícolas y la fitorremediación de suelos. Por ejemplo, el aceite esencial de *Origanum majorana*, *Salvia officinalis*, *Lavandula officinalis*, *Mentha spp.* y *Rosmarinus officinalis* han sido usados a diferentes concentraciones en insecticidas eficientes para controlar plagas agrícolas como Thrips tabaco (Koschier *et al.*, 2003).

En tanto que *Tanacetum vulgare*, *Arthemisia absinthium* y *Ocimum basilicum*, son la materia prima de los repelentes de insectos de origen vegetal que utilizan aceites esenciales (Başer, 2005). Por otra parte, las HAM's han sido usadas en las tecnologías de fitorremediación para remover sustancias peligrosas en ambientes contaminados (Masarovičová y Králová., 2007)

1.5.2 Principios activos

Junto a la gran variedad de condiciones ambientales que existen en nuestro territorio, en las plantas se encuentra también una amplia gama de sustancias químicas. Los principios activos se deben precisamente a los compuestos químicos de algunas plantas que las hacen útiles como medicamento, y pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras. (Ocegueda, S., E Moreno y P. Kolléff. 2005)

Su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad, entre otros. Se sabe, por ejemplo, que las plantas muy jóvenes o muy viejas tienen menor concentración de principios activos; que los suelos ácidos favorecen a las plantas productoras de alcaloides y que la humedad del suelo tiene un efecto directo sobre la concentración de estos compuestos.

Una sola planta medicinal puede contener de ocho a 10 principios activos, lo que indica la complejidad y riqueza bioquímica que existe en la naturaleza. (Ocegueda, S., E Moreno y P. Kolleff. 2005)

Los compuestos químicos se extraen por diferentes procedimientos. Para que una planta conserve sus propiedades medicinales se deben respetar ciertas reglas cuando se hace su recolección, desecación, almacenamiento y finalmente de presentación como infusiones, extractos o cápsulas, entre otras. (Ocegueda, S., E Moreno y P. Kolleff. 2005)

Trata de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas utilizados en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, contribuir al mejoramiento de la calidad de los productos y a su uso adecuado, así como difundir y promover el potencial terapéutico de la flora de México. (Ocegueda, S., E Moreno y P. Kolleff. 2005)

1.6 Metabolitos secundarios

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales)

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. (Alasalvar, Grigor, Zhang, Quantick, Y Shahidi, 2001).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono. Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Almaraz, 1984) También tuvo un uso medicinal por su acción cicatrizante y diurética (Pardo, 2007).

Rutas metabólicas de compuestos fenólicos

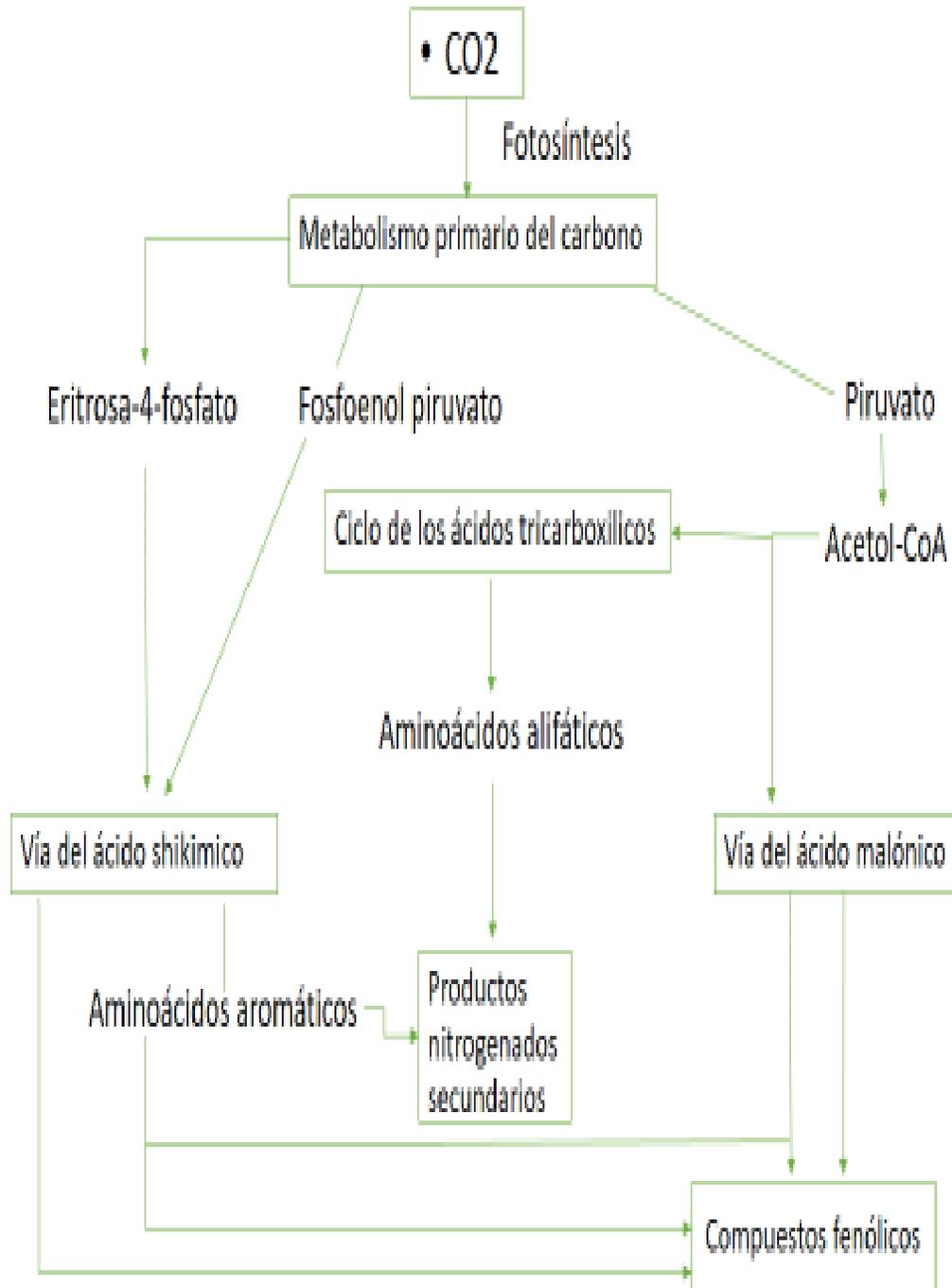


Figura 7. Rutas metabólicas donde se sintetizan los compuestos fenólicos.

1.6.1 Clasificación de (MS)

Se agrupan en cuatro clases principales:

- Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos. Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

1.6.2 Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gama muy amplia de compuestos que por no haberseles encontrado una participación directa en los procesos fundamentales de fotosíntesis, respiración, desarrollo y crecimiento se les llamó metabolitos secundarios (Kutchan, 2001). Aunque en la actualidad su apreciación ha cambiado y se les reconocen participaciones muy diversas en los procesos fisiológicos de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006) y en las relaciones ecológicas para asegurar la sobrevivencia como especie (Almaraz et al., 1998; Hadacek, 2002), a esos compuestos se les denomina secundarios.

Harborne (1989) divide a los fenoles en 11 grupos de acuerdo al número de carbonos que se encuentran en su estructura molecular: fenoles simples y benzoquinonas, de 6 átomos de carbono (C₆); ácidos fenólicos, de 7 (C₆-C); acetofenonas y ácidos fenilacéticos, de 8 (C₆-C₂); ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas, y cromonas, de 9 (C₆-C₃); naftoquinonas, de 10 (C₆-C₄); xantonas, de 13 (C₆-C₁-C₆); estilbenos y antraquinonas, de 14 (C₆C₂-C₆); flavonoides, de 15 (C₆-C₃-C₆); lignanos y neolignanos, de 18 ((C₆-C₃)₂); biflavonoides, de 30 ((C₆-C₃-C₆)₂); y polímeros de alto peso molecular como las ligninas y los taninos, de n átomos de carbono (C₆-C₃)_n y (C₆-C₃-C₆)_n, respectivamente).

1.6.3 La química de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides, tienen una gama muy amplia de funciones dentro de las plantas. Pueden participar en el establecimiento.

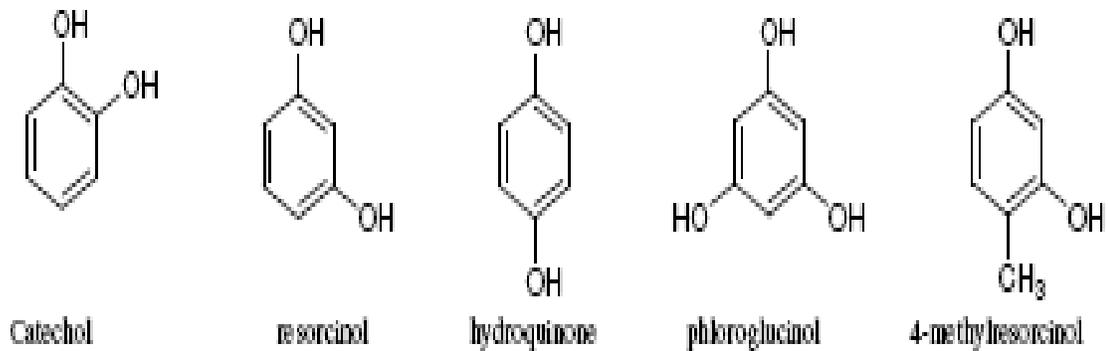


Figura 8. Estructuras químicas de fenoles simples.

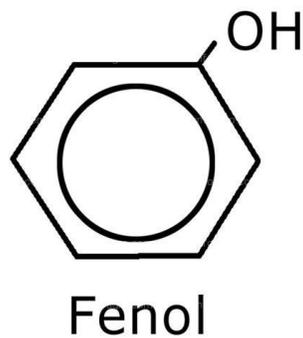


Figura 9. Estructura química del fenol (Huang *et al.*, 2009)

1.6.4.1 Las relaciones estructura-actividad

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debido a su capacidad de eliminar los radicales libres, donar átomos de hidrógeno o de electrones, o cationes de metales de quelato (Afanasev, Dorozhko, Brodskii, Kostyuk, y Potapovitch, 1989) La estructura de los compuestos fenólicos es un determinante clave de su captación de radicales y la actividad de metales, y esto se conoce como relaciones de estructura-actividad (SAR). En el caso de ácidos fenólicos, por ejemplo, la actividad antioxidante depende del número y las posiciones de grupos hidroxilo en relación con el grupo funcional carboxilo (Rice-Evans, Miller, y Paganga, 1996; Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang, y Glover, 1999).

1.6.5.1 Los compuestos fenólicos de los subproductos agro –industriales

El procesamiento de alimentos de origen vegetal resulta en la producción de subproductos que son fuentes ricas de compuestos bioactivos, incluyendo compuestos fenólicos (Schieber, Stintzing, y Carle, 2001). La disponibilidad de los compuestos fenólicos a partir de residuos agrícolas e industriales, su extracción y la actividad antioxidante han sido el objeto de una revisión por (Moure *et al.*2001).

1.7 Estructura y clasificación de flavonoides.

Dentro de los fenoles, los flavonoides (C6-C3-C6) son los que se encuentran más ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal y son los más abundantes, los más diversos (Markham, 1982), y los preferidos para estudios quimiotaxonómicos (Harborne y Turner, 1984; Campos et al. 1997; Almaraz-Abarca et al. 2006, Almaraz-Abarca et al. 2008).

Dentro de las células vegetales los flavonoides se pueden encontrar como glicósidos o como agliconas. En su forma de agliconas, los flavonoides poseen un anillo de benceno (llamado anillo A) unido a un anillo heterocíclico de seis miembros (anillo C), el cual está a su vez unido a un anillo fenil (o anillo B) como sustituyente en la posición 2 (Figura 2).

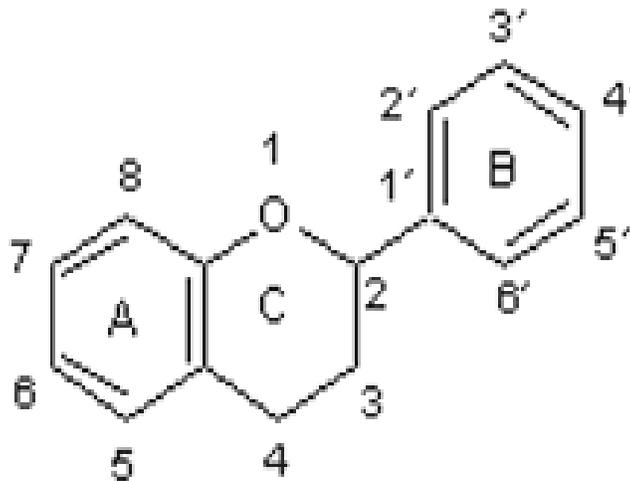


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides

Los diferentes grados de oxidación en el anillo C son la base de la clasificación de los flavonoides y fuente primaria de la gran diversidad química de estos compuestos. Un segundo nivel de diversidad está dado por los diferentes patrones de sustituciones que pueden encontrarse, como hidroxilación, glicosilación, metilación, metoxilación, y acilación en los anillos A y B. Esos patrones dan la estructura particular de cada compuesto dentro de cada grupo de flavonoides.

Los flavonoides más abundantes en las plantas son las flavonas y los flavonoles, ambos se caracterizan por presentar un doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo heterocíclico C. Los flavonoles se diferencian de las flavonas porque poseen un grupo hidroxilo en la posición 3, el cual está ausente en las flavonas (Figura 12).

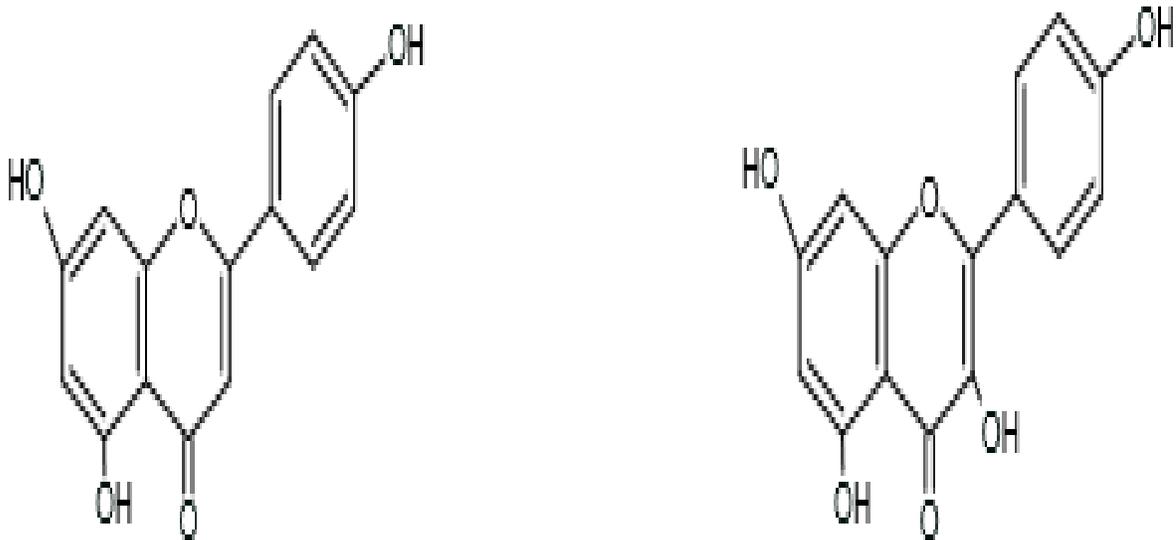


Figura 11. Estructura básica de las flavonas (izquierda) y los flavonoles (derecha).

Otros tipos de flavonoides son a) los flavonoides o dihidroflavonoides (Figura 13), que no poseen un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, se incluyen en este grupo las flavanonas (dihidroflavonas), los dihidroflavonoles (flavanonoles o 3hidroxiflavanonas), las dihidrochalconas, los flavanos, y los flavanoles; b) las antocianinas (Figura 14), estas son sustancias coloridas que carecen de un grupo carbonilo en la posición 4, presentan un grupo hidroxilo en la posición 3 y dos dobles enlaces en el anillo heterocíclico y; c) los isoflavonoides (Figura 15), que se caracterizan por presentar una desviación del anillo fenil (B) de la posición 2 a la 3.

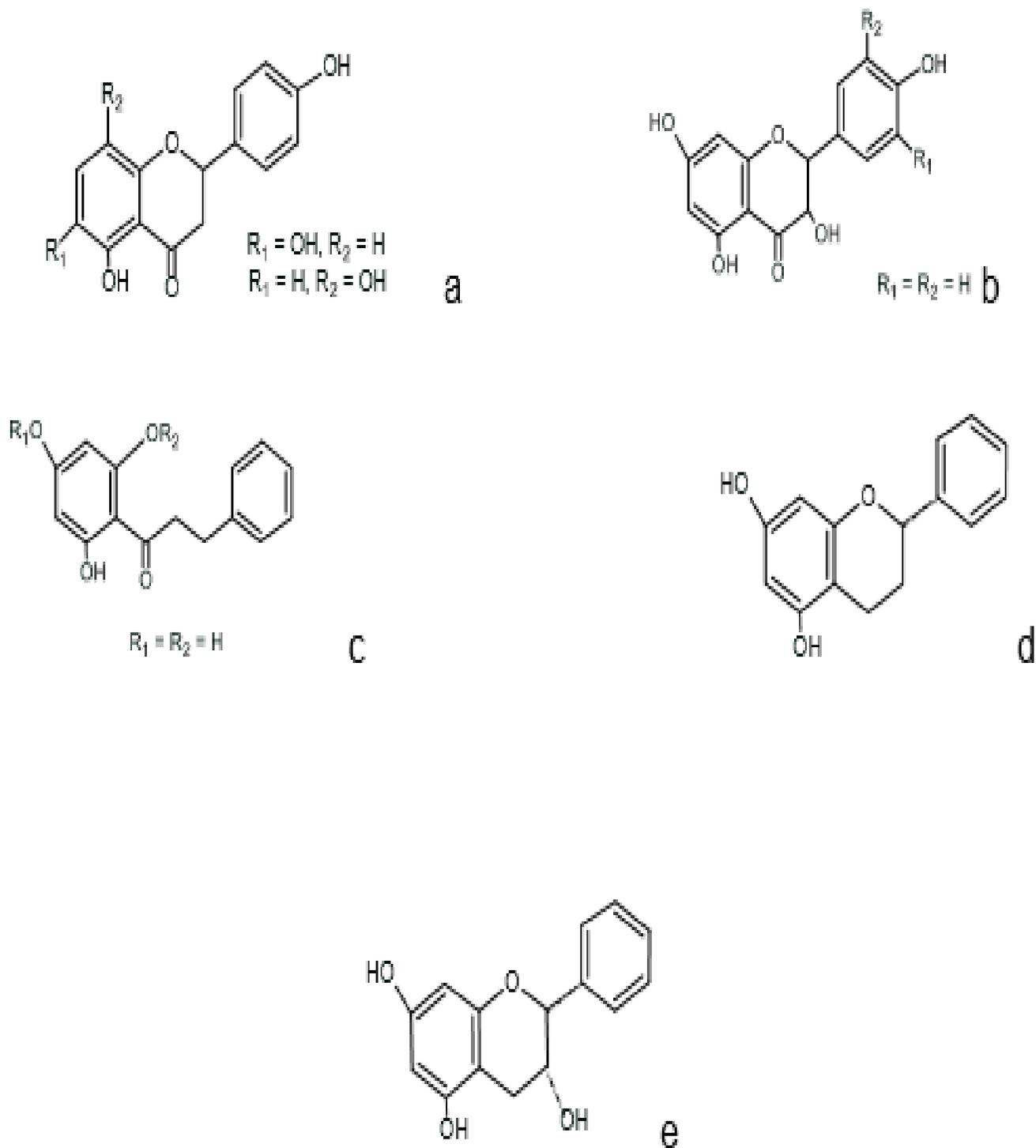


Figura 12. Estructuras básicas de a: flavanonas, b: dihidroflavonoles, c: dihidrochalconas, d: flavanos y e: flavanoles.

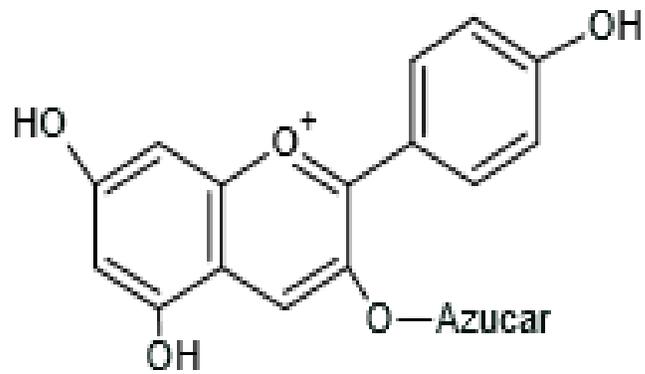


Figura 13. Estructura básica de las antocianinas.

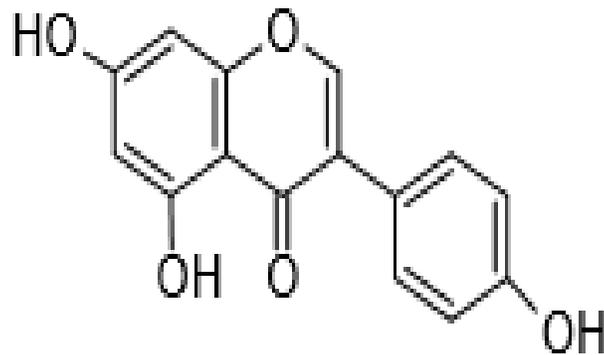


Figura 14. Estructura básica de los isoflavonoides.

1.8 Frúctanos

Diversas especies de plantas superiores, monocotiledóneas, dicotiledóneas y las estructuras actuales de algas verde perteneciente a oligo o polisacáridos de fructosa, frúctanos con nombre y otros conocidos como fructooligosacaridos (FOS).

Los frúctanos actúan como los carbohidratos de reserva en el metabolismo CAM y como protector de la ósmosis en condiciones secas. El lugar donde se encuentran y dónde se sintetizan en los tallos (Arrizon *et al.*, 2010). Varían en estructura molecular y de peso. En plantas maduras estos materiales pueden estar presente en 13 al 17% (w / w) de peso fresco (Avila-Fernandez *et al.*, 2011). En la naturaleza, podemos encontrar diferentes tipos de frúctanos, son clasificados por la vinculación de unidades de fructosa y glucosa por ubicación en la disposición.

1.8.1 Alimentos nutraceuticos

El ser humano siempre ha buscado una mejor forma de vivir, de tener una excelente salud y condición de vida, así como de vivir por más tiempo. En los últimos años, y fuertemente impulsados por la necesidad de renovación, aparecieron en el mercado productos con nuevos ingredientes. Algunos ejemplos de compuestos incluidos en alimentos como en productos farmacéuticos son la glucosamina, la vitamina E y los omega 3. Dichos ingredientes se denominan Nutraceuticos y son la nueva tendencia a nivel mundial. (Pérez Leonard, Heidy; 2006).

Los nutraceuticos son productos basados en ingredientes procedentes de la propia naturaleza (animales, plantas o minerales) y se caracterizan por ser ricos en determinados nutrientes, lo cual determina su incidencia en la nutrición y en nuestra salud.

Son productos atractivos por su origen natural, puesto que se encuentran en la forma más biodisponible y generalmente pueden ser administrados a largo plazo, sin riesgos de efectos colaterales. Por otra parte, los nutraceuticos también llamados alimentos funcionales, están causando un fuerte debate porque su concepto redefine las líneas divisorias tradicionales entre los alimentos y los medicamentos. (Pérez Leonard, Heidy; 2006).

II. Problema de investigación

Hoy en día el uso de la medicina tradicional se ha ido incrementando evitando el uso de medicamentos con varios efectos secundarios, los extractos de *Agave durangensis* han demostrado tener actividad antioxidante, sin embargo, no se tiene reporte de su actividad antimicrobiana, ya que puede tener un uso potencial contra diversas cepas.

III. Justificación

Agave durangensis al ser propagado principalmente por semillas favorece la presencia de altos niveles de variabilidad genética a lo largo del Estado de Durango. Debido a la importancia de esta planta a nivel regional al utilizarla para la elaboración de mezcal los primeros desechos de este proceso es la parte foliar, lo que podría suponer una fuente potencial para la obtención de productos derivados del metabolismo secundario.

IV. Hipótesis

Se ha detectado que en *Agave durangensis* hay una gran cantidad de productos de metabolitos secundarios de los cuales se han caracterizado algunos y evaluados sus propiedades antioxidantes, pero no existe reporte alguno sobre sus propiedades antibacterianas.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de *Agave durangensis* presentes en extractos de seis líneas morfológicas, identificadas en el CIIDIR-IPN.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar los compuestos fenólicos de cada línea morfológica de *Agave durangensis*.
- Evaluar las propiedades antioxidantes de los seis morfotipos.
- Aislar compuestos químicos de los seis morfotipos mediante cromatografía preparativa en papel (PC)
- Evaluar las propiedades antimicrobianas de los seis morfotipos.

VI. Material vegetal

Extractos de seis líneas morfológicas de *Agave durangensis*. Muestras del tejido foliar de la planta.

Se tomaron las muestras de los seis morfotipos de *Agave durangensis*, de la parte central de la hoja de una medida aprox. de 10 x 2 cm. fueron cortadas de 10 individuos por cada línea morfológica.

Se dejó en un cuarto de secado durante dos semanas, después se cortaron en trozos pequeños para molerlo y preparar los extractos.

El solvente utilizado fue etanol, se aplicó al 80% (v/v) dejando macerar durante 24 hrs. Recuperando los sobrenadantes. Las pastillas se reextractaron con etanol al 20% (v/v) bajo las mismas condiciones. Se mezclaron los extractos recuperados y mezclados al 80% y 20% de etanol. Para obtener el extracto crudo.

Se resuspendieron a 100 mg/ml y se aplicó etanol al 80% para obtener un volumen final.

VII. Metodología

7.1 Determinación del contenido Fenólico Total de extractos de Agave

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método de Folin Ciocalteu (Nurmi *et al.*, 1996) la cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de Ac. Gálico (AG, cinco concentraciones entre 8 y 92 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A 250 μL de cada solución se agregaron 2.5 mL de agua destilada. Se agregaron 125 μL . Del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N y se agito durante 5 min. Finalmente, se añadieron 375 μL De una solución de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar en la obscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. La lectura se realizó en espectrofotómetro marca Optizen, a una longitud de onda de 760 nm. Para la determinación de los compuestos fenólicos en los extractos de *Agave durangensis* se tomaron 255 μL de muestra y se analizaron como se describió para el estándar. El contenido de fenoles totales se expresó en miligramos equivalente de AG por gramo de muestra seca (mg equivalentes AG/ g de MS). Se registran las absorbancias a 760 nm. El blanco contenía 250 μL De agua + 2.5 ml. de agua desionizada + 125 μL Folin + 375 μL Na_2CO_3 al 20% todas las muestras se realizan por triplicado.

A partir de esta curva se graficaron las concentraciones AG/mL (x) contra las absorbancias registradas a 760 nm. (Y).

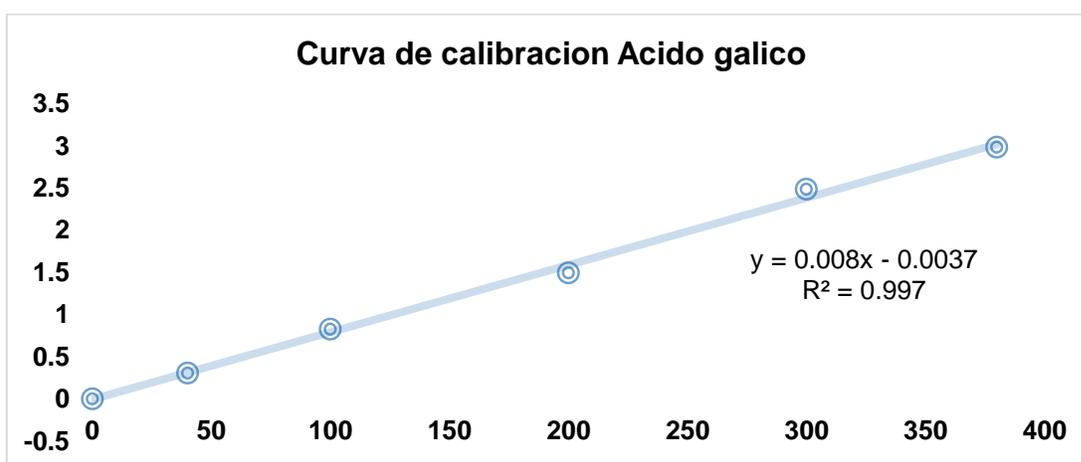


Figura 15. Curva de calibración del estándar Acido Gálico

7.1.2 Análisis de la capacidad antioxidante total.

La capacidad antioxidante total se realizó de acuerdo con el método reportado por (Prieto *et al.* 1999) se tomaron 100 μ L de extracto de *Agave durangensis* se combinaron con 1 mL de una solución preparada con ácido sulfúrico 0.6 M, fosfato de sodio 28 mM, y molibdato de amonio 4 mM. Las muestras se incubaron en un termoblock a 95° C durante 90 min. Después las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, la absorbancia de cada una se midió a 695 nm, contra un blanco formado por todos los componentes de la mezcla de reacción y se agregó etanol en lugar de extracto. Se analizaron como se describió previamente para las muestras. La capacidad antioxidante de las muestras se expresó como mg de equivalentes de ácido ascórbico por mL de extracto (mg EAA/ mL), calculados a partir de la siguiente curva de calibración $A_{695} = 4.2133 [AA] - 0.2365$, $r = 0.9987$, construida con seis concentraciones de ácido ascórbico entre 0.1 y 1 mg AA/ mL los estándares de quercetina y epicatequina también fueron evaluados.

7.1.2.1 Preparación de la solución reactiva para medir la actividad antioxidante total mediante fosfomolibdeno.

La solución contenía:

Ácido sulfúrico 0.6 M.

Fosfato de sodio 28 mM.

Molibdato de amonio 4 mM.

Diluir perfectamente el fosfato de sodio y el molibdeno antes de agregar el ácido sulfúrico. Se afora con agua destilada.

7.1.3 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación se realizó mediante la técnica propuesta por Heimler *et al.*, 2005 usando una curva estándar de quercetina. A 200 μ L de cada solución se agregaron 1.8 mL de metanol absoluto y 120 μ L de $AlCl_3$ al 5%, las muestras se mezclaron y se midió inmediatamente la absorbancia a 425 nm contra el blanco en el espectrofotómetro. Para la determinación de flavonoides en los extractos de *A. durangensis* se tomaron 200 μ L de la muestra y se repitió la metodología antes

mencionada. El contenido de flavonoides totales se expresó como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca (mg equivalentes EQ/g de MS)

La curva de calibración de quercetina se prepara a partir de una solución que contiene 0.01 mg de quercetina/mL de MeOH. A partir de esa solución se realiza la siguiente curva.

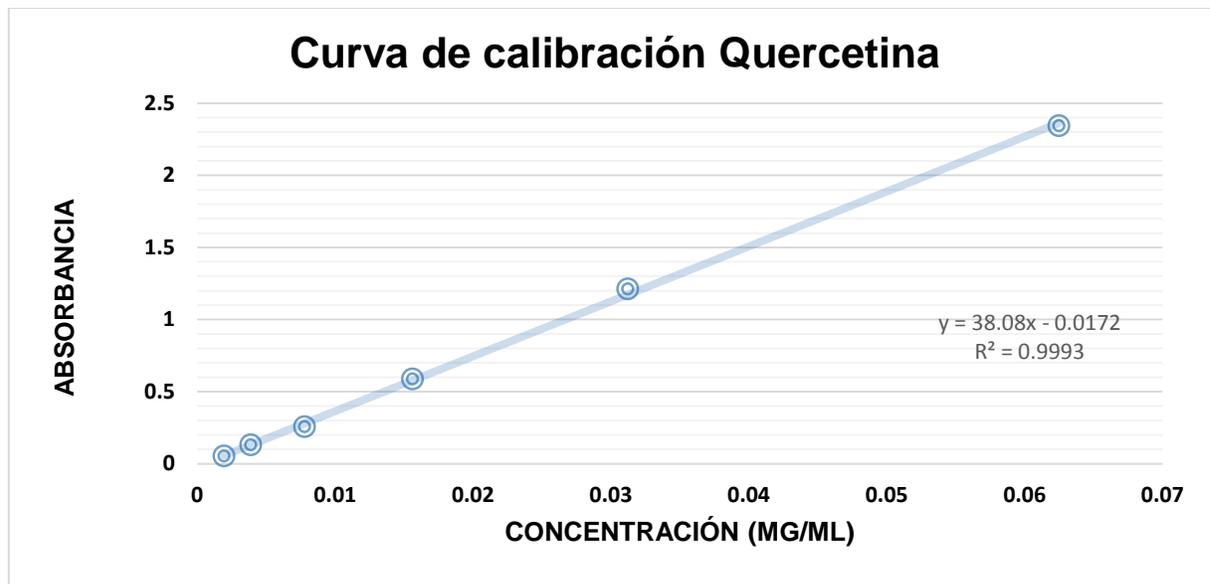


Figura 16. Curva de calibración de Quercetina

7.1.4 Análisis del poder reductor (Fe)

El poder reductor (Fe) se determinó de acuerdo a Siddhuraju y Becker (2003) con algunas modificaciones. Para esto se adicionaron 250 μ L de extracto, con una concentración de 100 mg/mL de cada muestra, se mezcló a diferentes volúmenes de (75, 150 y 250 μ L de extracto) y 250 μ L de Tampón de fosfato (Buffer 0.2 M, pH 6.6) Agregando de igual manera 250 μ L de ferrocianuro de potasio (0.1% w/v). La mezcla se incubó a 50°C durante 20 min., se añadieron 250 μ L De ácido tricloroacético (10 % w/v), se centrifugo a 2800 rpm durante 10 min a 25°C. Alícuotas del sobrenadante (500 μ L) se mezclaron con 500 μ L de agua desionizada y 100 μ L de cloruro férrico (0.1 % w/v); la absorbancia se registró a 700 nm. La concentración de extracto requerida para alcanzar un valor de absorbancia de 0.5 (EC50) se calculó por medio de una gráfica de la absorbancia a 700 nm contra la concentración

de extracto. Una mayor absorbancia de la mezcla de reacción indico un mayor poder reductor. Ácido ascórbico se usó como estándar. Los resultados se expresaron como la IC50 en μg equivalentes de ácido ascórbico por ml. de extracto (μg EAA/mL), calculados a partir de la siguiente curva de calibración $A_{700} = 25.372 [\text{AA}] - 0.0242$, $r = 0.9956$, construida con cinco concentraciones de ácido ascórbico entre 0.03 y 0.1 mg AA/mL.

7.1.4.1 Preparación de los reactivos para el poder reductor.

-Buffer de fosfato 0.2 M pH 6.5

**Solución A*

Pesar 6.9 g de Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4 0.2 M) y diluir en 250 ml. H_2O destilada.

**Solución B*

Pesar 13.41 g de Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 0.2 M) y diluir en 250 ml. H_2O destilada.

Mezclar: Solución A (156.25 ml) y B (93.75 ml.) a un volumen de 250 con un pH de 6.6

-Ferrocianuro de potasio 1% (w/v)

Pesar 0.1 g y diluir en 9.9 ml de H_2O destilada.

-Ácido tricloroacético 10% (w/v)

Pesar 1 g y diluir en 9 ml de H_2O destilada

-Cloruro férrico 0.1% (w/v)

Pesar 0.01 g y diluir en 9.99 ml. de H_2O

Nota: el cloruro férrico debe prepararse diario dado que se oxida rápidamente.

Se registran las absorbancias a 700 nm. El blanco contiene 0 μL De solución estándar 0.1 mg. De Ac. Asc. 0.1 mg + 250 μL De buffer + 250 μL De ferrocianuro

+ 250 μ L de ácido tricloroacético + 500 μ L De H₂O desionizada + 100 μ L De cloruro férrico. Todas las muestras se realizan por triplicado.

7.2 Cromatografía preparativa en papel

Cada extracto se realizó utilizando la técnica de cromatografía preparativa en papel.

- a) Retención.- efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido, anclado a un soporte sólido.
- b) Desplazamiento.- efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

Se obtienen resultados cualitativos. La técnica consiste en depositar una cantidad de muestra en el extremo del papel, que se deja evaporar. Luego se introduce la tira de papel en una cámara de vidrio que contiene el disolvente (Butanol, Ac. Acético y agua-BAW) de manera que este fluya por la tira por capilaridad. Cuando el disolvente a llegado al extremo se retira y se pone a secar el papel. Se verán las manchas de distinto color separadas. Cuando los componentes no tienen color propio el papel se somete a un revelado con luz UV a 254 nm.

Se aislaron los compuestos mediante la técnica de cromatografía preparativa en papel (PC) de acuerdo a lo establecido por Markham (1982).

7.3.1 Pruebas de Capacidad Antioxidante Total por compuestos recuperados.

La capacidad antioxidante total se realizó de acuerdo con el método reportado por (Prieto *et al.* 1999) 100 μ L de cada compuesto recuperado de *A. durangensis* se combinaron con 1 mL de una solución preparada con ácido sulfúrico 0.6 M, fosfato de sodio 28 mM, y molibdato de amonio 4 mM. Las muestras se incubaron en un termoblock a 95° C durante 90 min. Después, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, la absorbancia de cada una se midió a 695 nm.

7.4.1 Pruebas DPPH para cada compuesto recuperado.

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizó el método DPPH* modificado por Campos, 1997. Cuatro concentraciones (0 a 150 µL Concentraciones de flavonoides calculadas mediante curvas de calibración y una curva estándar de quercetina) de cada muestra fue individualmente adicionada a una solución de DPPH* (6.2 µg / mL en metanol absoluto) de tal manera que se mantuviera un volumen final de 1 mL.

El decremento en la absorbancia fue determinado a 523 nm. Después de 20 min. Las concentraciones de DPPH* en el medio de reacción contra las concentraciones de flavonoles de las muestras se graficaron para determinar, por regresión lineal la concentración eficiente al 50% definida como la cantidad antioxidante necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH* (EC50). La concentración (µg /mL) en el medio de reacción: $A_{523nm} = 0.0019 + 0.0309 [DPPH^*]$ con un coeficiente de correlación $r = 0.9996$. Los valores de EC50 se expresaron en µg/mL y mg/g MS.

7.5 Actividad antibacteriana

7.5.1 Microorganismos.

Las bacterias utilizadas para este estudio fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) microorganismos de referencia procedentes del laboratorio de microbiología del CIIDIR-IPN.

7.5.2 Evaluación de la actividad antibacteriana.

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis* se llevaron a cabo tres procesos: la activación de la cepa bacteriana, la preparación del inculo y las pruebas de efecto antibacteriano [Difusión en agar por pocillo (Wells diffusion method)]

7.5.3 Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller Hinton (MH), se preparó a partir de las recomendaciones del fabricante. Se esterilizo a 115 lbs por 15 minutos, se enfrió a temperatura ambiente.

Se vació el medio en las placas de Petri de 150 mm de diámetro hasta un nivel aproximado de 6 mm. Se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su utilización.

7.5.4 Conteo en placa

Se pesó la muestra y se prepararon las diluciones como lo establece la técnica de “Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico”.

7.5.5 Técnica de vertido en placa.

Se distribuyeron las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación y la adición de medio de cultivo se puedan realizar cómoda y libremente. Se marcaron las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de inocular.

Se inocularon por duplicado, 1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril. Se adicionaron de 18 a 20 mL del medio fundido y mantenido a 45 °C. Para homogenizar, se mezclaron mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; procurando que el medio no moje la cubierta de las cajas se dejó solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorporó al diluyente hasta que finalmente se adiciono el medio de cultivo a las cajas, sin dejar que exceda 20 minutos.

Se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad y se incubaron las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que adecuada para el microorganismo.

7.5.6 Técnica de extensión superficial en placa.

Se inocularon por duplicado, 0.1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril. Para distribuir de manera homogénea, extender el inóculo utilizando una varilla de vidrio estéril (en forma de escuadra o “L”) haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el inóculo se absorba antes de incubar (se recomienda un tiempo de espera aproximado de 10 minutos). El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorporó al diluyente

hasta que finalmente se inoculo en el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder más de 20 minutos.

Se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad y se incubaron las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que adecuada para el microorganismo.

Después de la incubación, se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas incluyendo las colonias puntiformes. Si hay desarrollo extendido o un número de colonias superior al del rango de sensibilidad del método. Realizar microscopía para resolver los casos en los que no se puedan distinguir las colonias de las partículas pequeñas de alimento. Utilizando el registrador para contar las colonias. Después de la incubación, se hizo el conteo de aquellas colonias que se desarrollaron.

7.5.6 Conteo de UFC.

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un mililitro de muestra. Se hacen diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo; la técnica para realizar este procedimiento se describe en “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

7.5.7 Reguladora de fosfatos.

Solución reguladora de fosfatos 0.6 ml. para 480 ml. de agua se mezclo y agito para después realizar las diluciones decimales.

Se utilizaron 10 tubos de ensayo de 16 x 150 con tapón de rosca, con 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos.

Con un Matraz con un volumen de 250 ml. de agar Mueller Hinton (agar para cuenta estándar), fundido y mantenido en baño de agua a 45 ± 1 °C (para técnica de vertido en placa)

7.5.8 Perforación de la caja.

Se hicieron cinco pocillos a cada placa con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Se inocularon las placas con una Asa Drigralski de cristal en forma de L para

distribuir de manera uniforme al microorganismo. Se colocó en cada pocillo los extractos resuspendidos en DMSO al 2% en los siguientes volúmenes de 150 μ l, 200 μ l. y 300 μ L. A una concentración de 100 mg. /mL se introdujo en la campana de flujo laminar por un lapso de media hora para que el solvente se evaporara. Teniendo como controles DMSO al 2% en un pocillo (control negativo) y amikacina inyectable 100 mg/2ml (control positivo).

7.5.9 Lectura de las placas

Después de 24 horas de incubación, se examinó cada placa y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición, ese valor se expresó en milímetros.

VIII. Resultados y discusión

El rendimiento de extracción obtenido con etanol (80% v/v) de *Agave durangensis* vario significativamente con respecto a cada línea una de las seis líneas morfológicas, el análisis estadístico mostro que no hubo diferencias significativas ($p \geq 0.05$) (Figura 2). Los resultados indican que con 0.82 g de tejido foliar se pudo obtener un rendimiento de extracción de: 20.61 (%) para la primer línea morfológica de *Agave durangensis* (L2: 20.54, L3: 19.30, L4: 16.13, L5: 15.39, L6: 11.94). La selección del solvente para la extracción fue adecuada, Hayouni *et al* (2007) menciona que es importante la selección del solvente para la extracción, ya que este se ve afectado de una manera significativa para el rendimiento, así como el contenido fenólico y las pruebas de antioxidación.

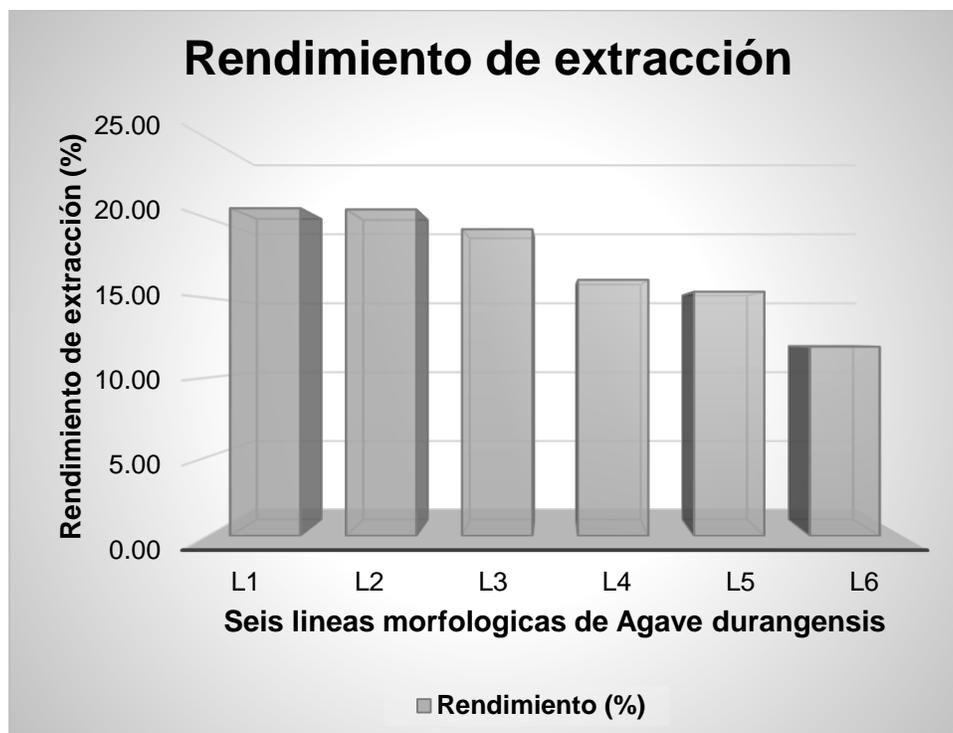


Figura 17. Rendimiento de extracción de las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis*.

8.1 Cromatografía preparativa en papel.

Es una fuerte herramienta que nos permite tener una idea más clara sobre los componentes de las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis*, los resultados de esta prueba para esta especie se pudieron identificar 3 compuestos, los colores encontrados fueron 3 manchas: Amarillo, Morado, Café claro, para cada una de las seis líneas morfológicas, lo que observamos es que no hubo variación entre cada una de ellas considerando que estos compuestos fueron los más representativos. En cuanto al viraje de color se observó que el cambio más común fue de morado a café claro, lo que indica que se trata de flavonas y flavononas que carecen del radical libre 5-OH esto reportado por Almaraz *et al* (2009) para *Agave durangensis* del tejido foliar de plantas adultas y plantas jóvenes.

Tabla 2. Flavonoides totales expresados como mg Equivalentes de Quercetina/ g de MS de las seis líneas morfológicas de *A. durangensis*.

<i>A. durangensis</i>	Flavonoides (mg E Quercetina/ g de MS)	<i>A. durangensis</i>	Flavonoides (mg E Quercetina/ g de MS)
L1-R1	0.1507	L4-R1	0.17127
L1-R1	0.1476	L4-R1	0.1253
L1-R1	0.1854	L4-R1	0.1331
L1-R2	0.1539	L4-R2	0.1694
L1-R2	0.1476	L4-R2	0.1331
L1-R2	0.1492	L4-R2	0.1310
L1-R3	0.1549	L4-R3	0.1654
L1-R3	0.1450	L4-R3	0.1310
L1-R3	0.1854	L4-R3	0.1681
L2-R1	0.1710	L5-R1	0.1712
L2-R1	0.2125	L5-R1	0.1681
L2-R1	0.1492	L5-R1	0.1762
L2-R2	0.1652	L5-R2	0.1704
L2-R2	0.1612	L5-R2	0.1780
L2-R2	0.1612	L5-R2	0.1542
L2-R3	0.1673	L5-R3	0.1780
L2-R3	0.2308	L5-R3	0.1815
L2-R3	0.1557	L5-R3	0.1683
L3-R1	0.2127	L6-R1	0.1542
L3-R1	0.1557	L6-R1	0.1683
L3-R1	0.2676	L6-R1	0.1702
L3-R2	0.2059	L6-R2	0.1602
L3-R2	0.1678	L6-R2	0.1702
L3-R2	0.2731	L6-R2	0.1738
L3-R3	0.2125	L6-R3	0.1597
L3-R3	0.1652	L6-R3	0.1738
L3-R3	0.2784	L6-R3	0.0045

Tabla 3. Fenoles totales de extractos de *Agave durangensis* mg de EAG/ g de extracto seco.

L1	14.77125
L2	14.88375
L3	14.00875
L4	25.13375
L5	15.64625
L6	20.37125

Tabla 4. Fenoles totales. El resultado se expresa en Equivalentes de Ácido Gálico/ gr. Extracto seco. Desviación estándar y coeficiente de variación de las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis*.

	mg de EAG/ g Extracto seco	Desv. Std	Coef. Var.
L1	14.81	0.20	1.35
L2	15.90	0.21	1.31
L3	14.91	0.14	0.95
L4	15.79	0.23	1.43
L5	14.40	0.35	2.43
L6	21.40	0.11	0.53

Los valores obtenidos de los ensayos del contenido fenólico no hubo variación significativa entre cada una de las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis*. El resultado de fenoles totales en cada una de las evaluaciones fue menor a la reportada para *Bryothamnion triquetrum* $51,21 \pm 2,25$ EAG/ mg de extracto acuoso y mayor que la reportada para *Halimeda opuntia* que fue de $19,99 \pm 1,12$ μ g EAG/ mg de extracto acuosos.

Tabla 5. Análisis de Varianza (ANOVA) de las seis líneas morfológicas de *A. durangensis*.**ANÁLISIS DE
VARIANZA**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Probabilidad F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
	1612.16900			98	4.9646027
Entre grupos	8	1	1612.169008	.3 E-06	44
Dentro de los grupos	164.082616	7	16.40826167		
	1776.25162				
Total	5	11			

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	6	97.21	16.20166667	6.826856667
Columna 2	6	236.3	39.38333333	25.98966667

Lo reportado por Monreal en 2015 para *Physalis angulata* fue de 34.82 ± 1.49 mg EAG/g ES mayor que lo obtenido para *Agave durangensis*.

Los extractos metanolicos de *Inula aucherana*, *Fumaria officinalis* y *Polygonatum multiflorum* (6.57, 10.50 y 4.07 mg EAG/g Extracto seco, respectivamente), especies utilizadas en la medicina tradicional de Turquía reportados por Sengul *et al* (2009) fue mayor en los resultados obtenidos para las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis* lo que nos indica que debido a la utilizaron de este recurso vegetal para la elaboración de mezcal en el Estado de Durango representa una fuente importante de antioxidantes naturales ya que la parte foliar es el primer desecho.

Tabla 6. Análisis del Poder Reductor (Fe) Resultados de la lectura que se realizó a 700 nm. Para obtener su absorbancia de cada extracto de *Agave durangensis*.

<i>Agave durangensis</i>	(75µl. Muestra- 175 Alcohol)	(150µl. Muestra-100 µl. Alcohol)	(250µl. Muestra)	Desv. Est
Línea 1	0.85	1.839	1.987	0.6181685
Línea 2	0.798	1.439	2.187	0.6951866
Línea 3	0.679	1.296	1.91	0.6155006
Línea 4	0.763	1.438	2.038	0.6378675
Línea 5	0.697	1.544	2.049	0.6831713
Línea 6	0.784	1.503	2.208	0.7120115

Monreal en 2015 reporta para *F. splendens* (A700 1.349 ± 0.15) lo reportado en este trabajo para *Agave durangensis* fue el de la línea morfológica seis de (A700 2.208 ± 0.71) La actividad antioxidante determinada en los extractos de este complejo se debe a que los compuestos fenólicos cuentan con un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilo, estos propician la captura de radicales libre por la facilidad con la que el átomo de hidrogeno puede ser donado a una especie radical, esto dependerá de número y posición de los grupos hidroxilo (Bravo, 1998).

Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson para extractos de *Agave durangensis*.

Cap. Antioxidante total vs DPPH	
Coef. De Pearson	0.098821396
Determinación (r^2)	0.009765668
Fenoles totales (Extractos) vs DPPH Compuestos	
Coef. De Pearson	0.617762366
Determinación (r^2)	0.38163034
Fenoles totales (Extractos) vs Cap. Antiox. Total Compuestos	
Coef. De Pearson	0.34057592
Determinación (r^2)	0.11599195

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre los fenoles totales y las diferentes pruebas realizadas para medir la actividad antioxidante. Los coeficientes de correlación de Pearson de muestran en la tabla 5. Los valores calculados sugieren una correlación alta directa y positiva para (DPPH*) con una valor de ($p \leq 0.01$), lo que podría indicar que los fenoles extractados tienen la capacidad de bloquear los radicales libres, el solvente de extracción fue el adecuado para esta especie.

Tabla 8. Capacidad antioxidante total de los compuestos aislados mediante cromatografía preparativa en papel y análisis del bloqueador del radical libre DPPH. Registros espectrofotométricos.

Manchas (Compuestos) recuperados de cromatografía preparativa en papel.

Cap. Antioxidante total	Absorbancia	Análisis de la act. Del bloqueador del radical libre DPPH	Absorbancia	Media
Mancha 1 R1	0.0483	Mancha 1 R1	1.662	
Mancha 1R2	0.0846	Mancha 1R2	1.77	1.77
Mancha 1R3	0.049	Mancha 1R3	1.808	
Mancha 2R1	0.0513	Mancha 2R1	1.648	
Mancha 2R2	0.0603	Mancha 2R2	1.76	1.76
Mancha 2R3	0.0576	Mancha 2R3	1.851	
Mancha 3R1	0.0243	Mancha 3R1	1.646	
Mancha 3R2	0.254	Mancha 3R2	1.757	1.757
Mancha 3R3	0.0323	Mancha 3R3	1.836	

8.2 Actividad antibacteriana

Salmonella tiphymurium (ATCC 14028)

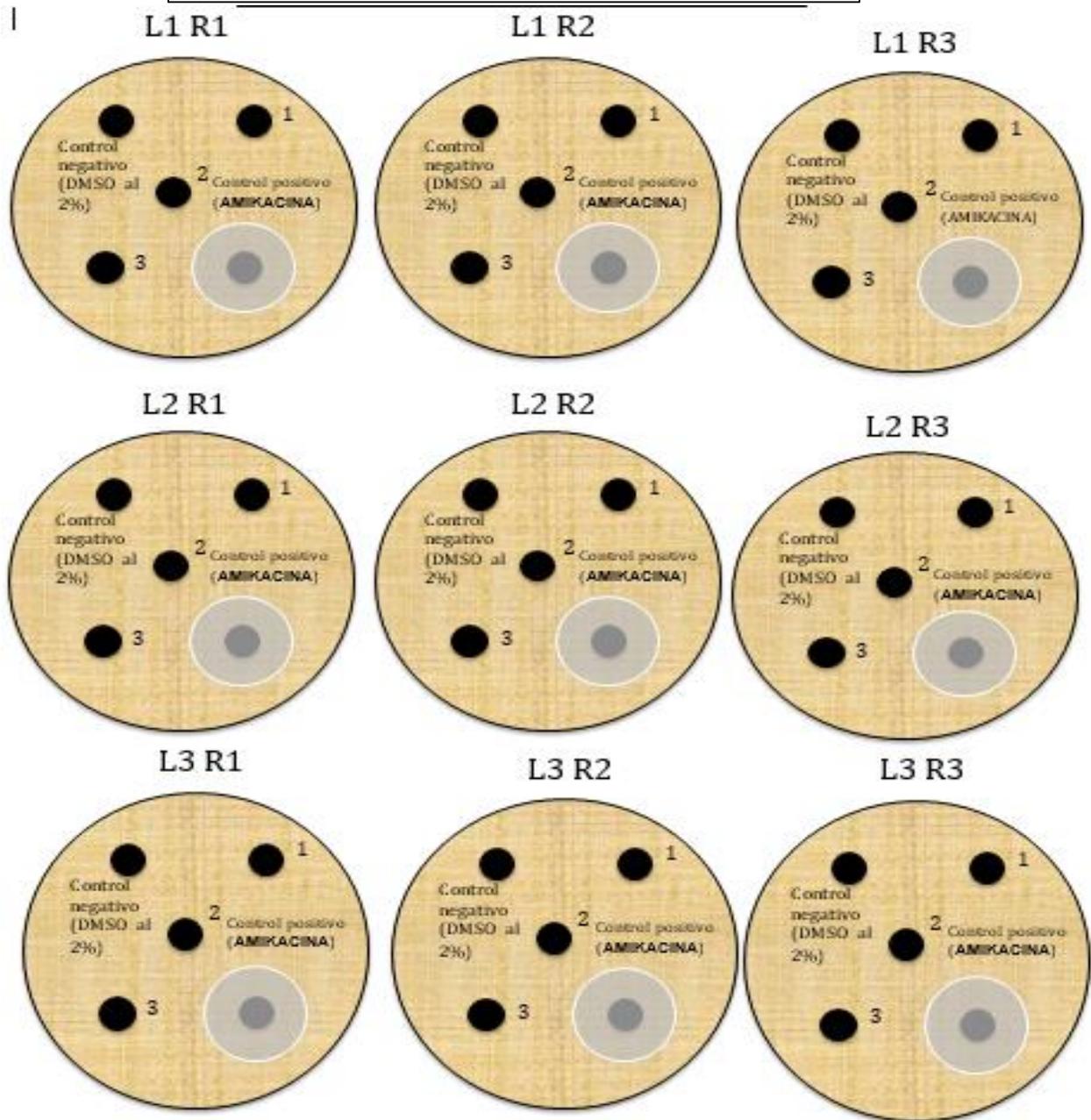


Figura 18. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *Salmonella tiphymurium*.

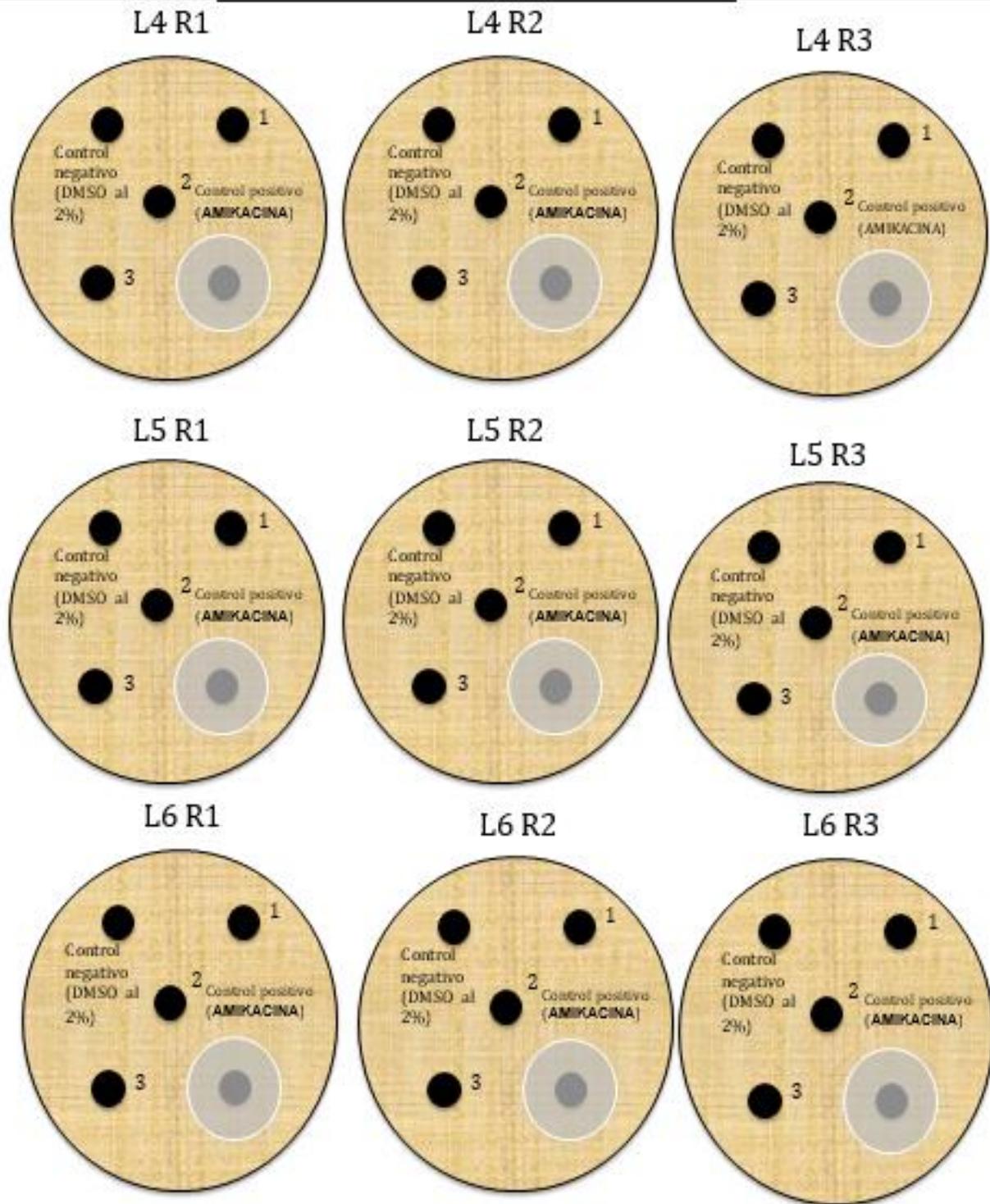


Figura 19. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6, R1-R2-R3) a 100 mg/mL resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *Salmonella tiphimurium*.

Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)

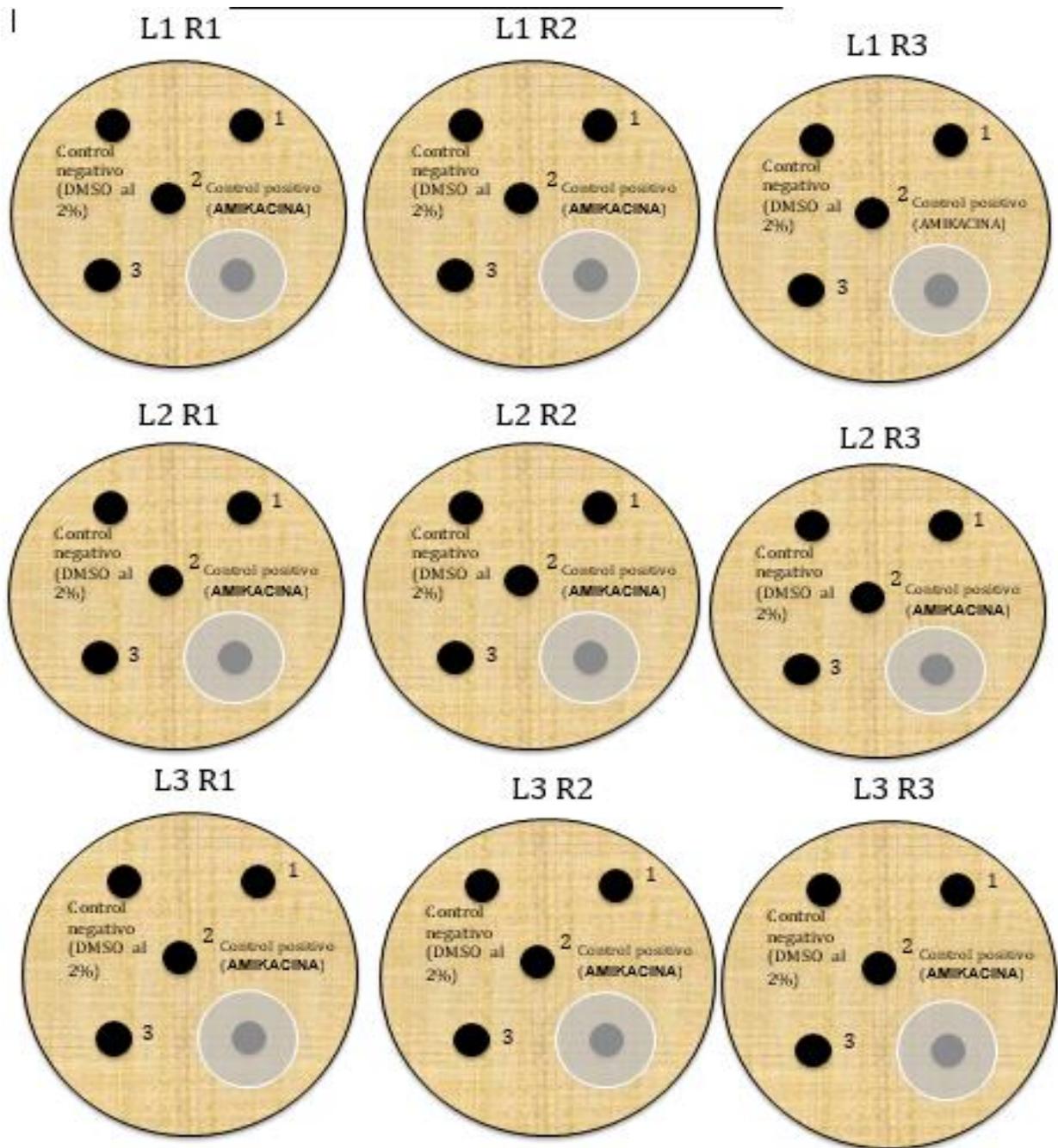


Figura 20. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3, R1-R2-R3) a 100 mg/mL resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *Staphylococcus epidermidis*.

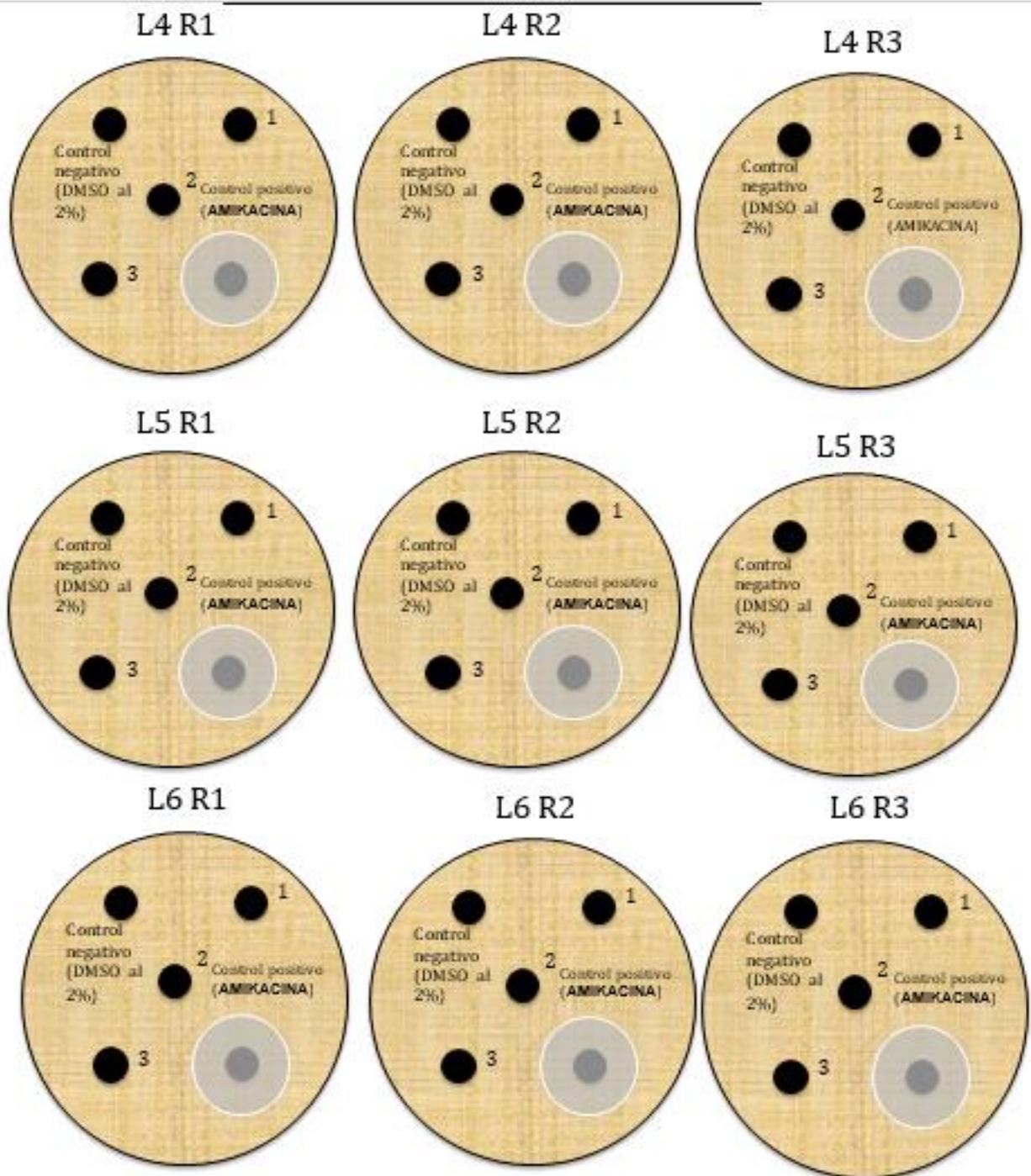


Figura 21. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6, R1-R2-R3) a 100 mg/mL resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *Staphylococcus epidermidis*.

Escherichia coli

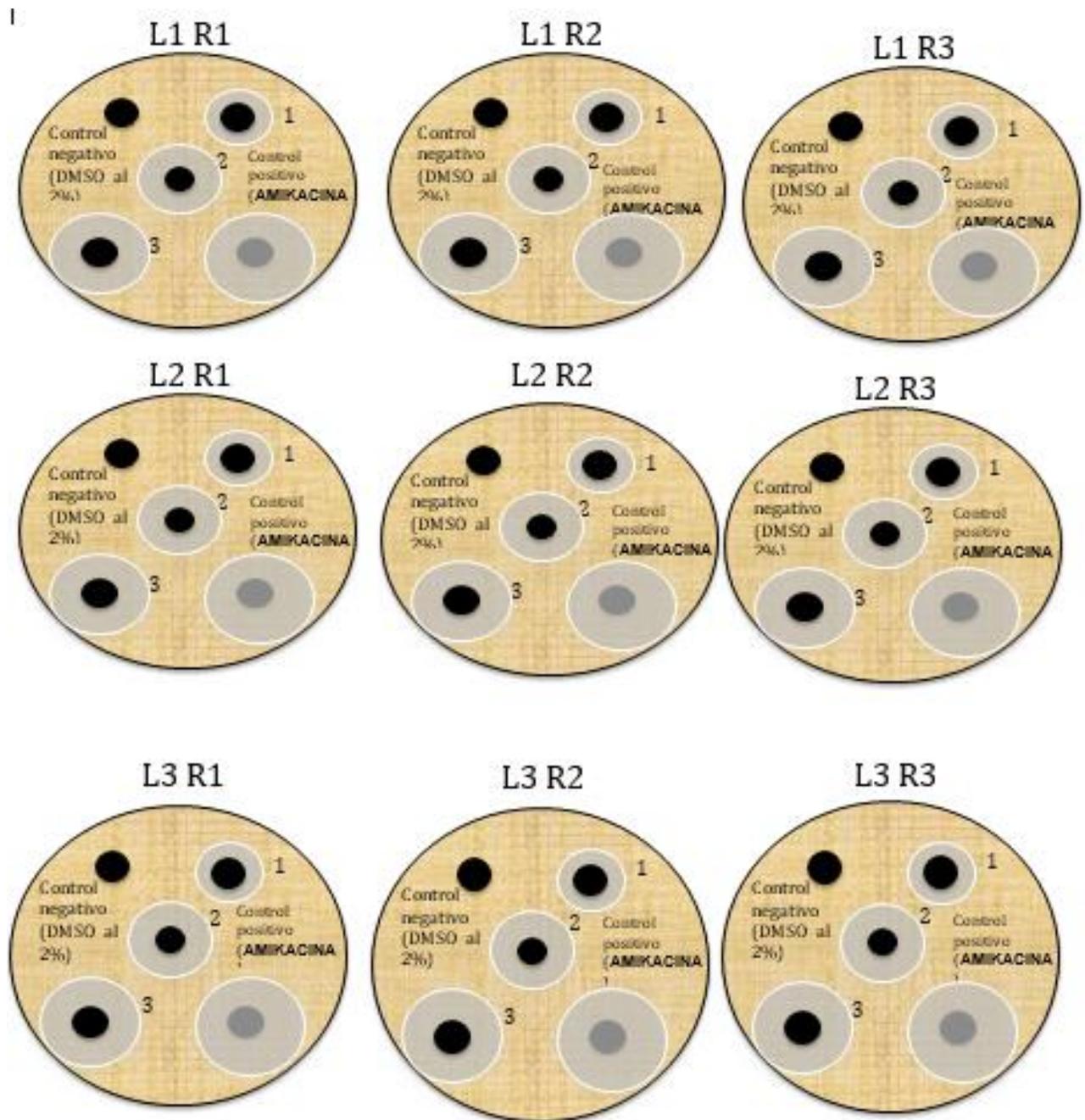


Figura 22. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *E. coli*.

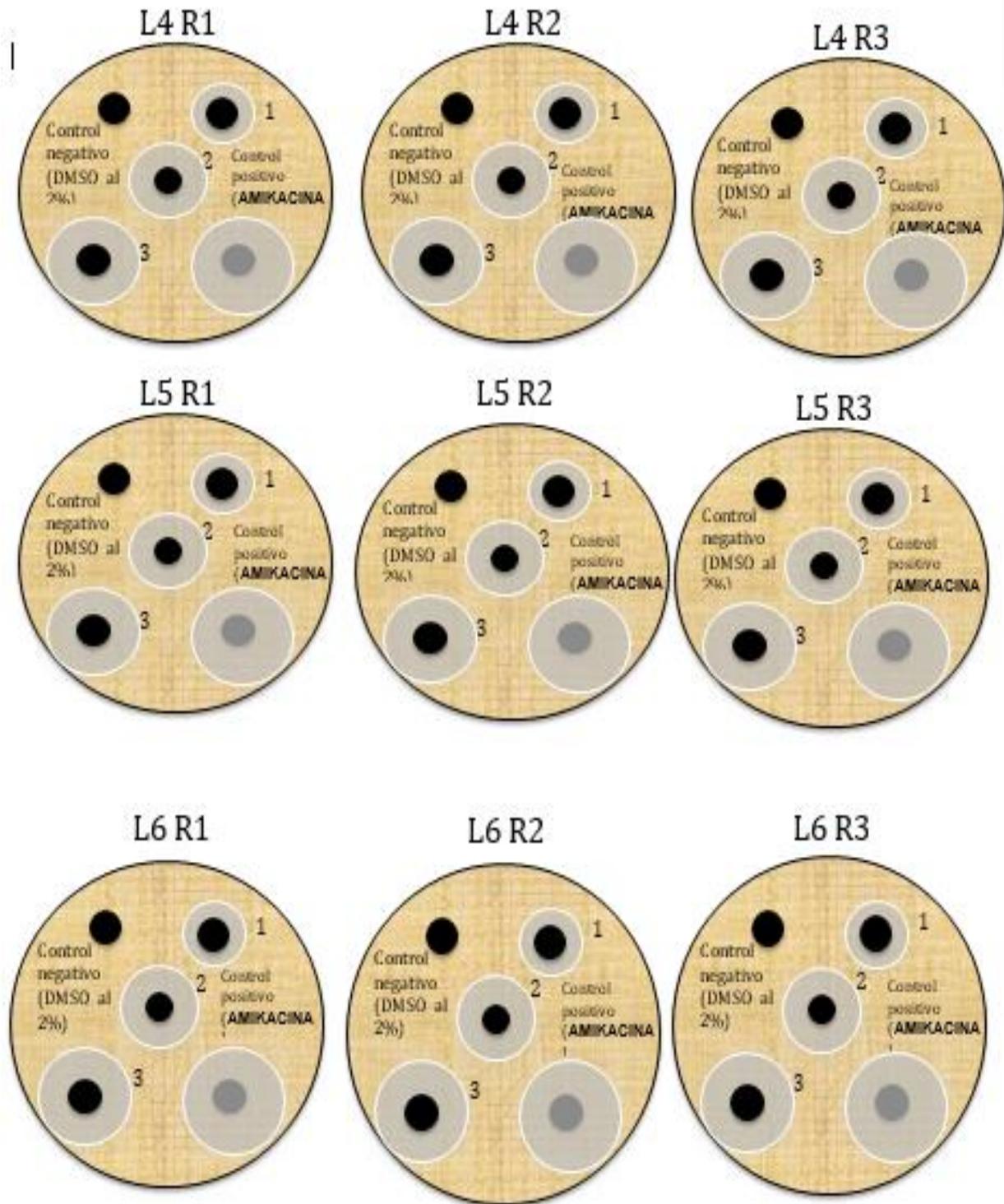


Figura 23. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6, R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *E. coli*.



Figura 24. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L1, R1-R2-R3, L2,-R1-R2-R3, L3-R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *Staphylococcus aureus*.

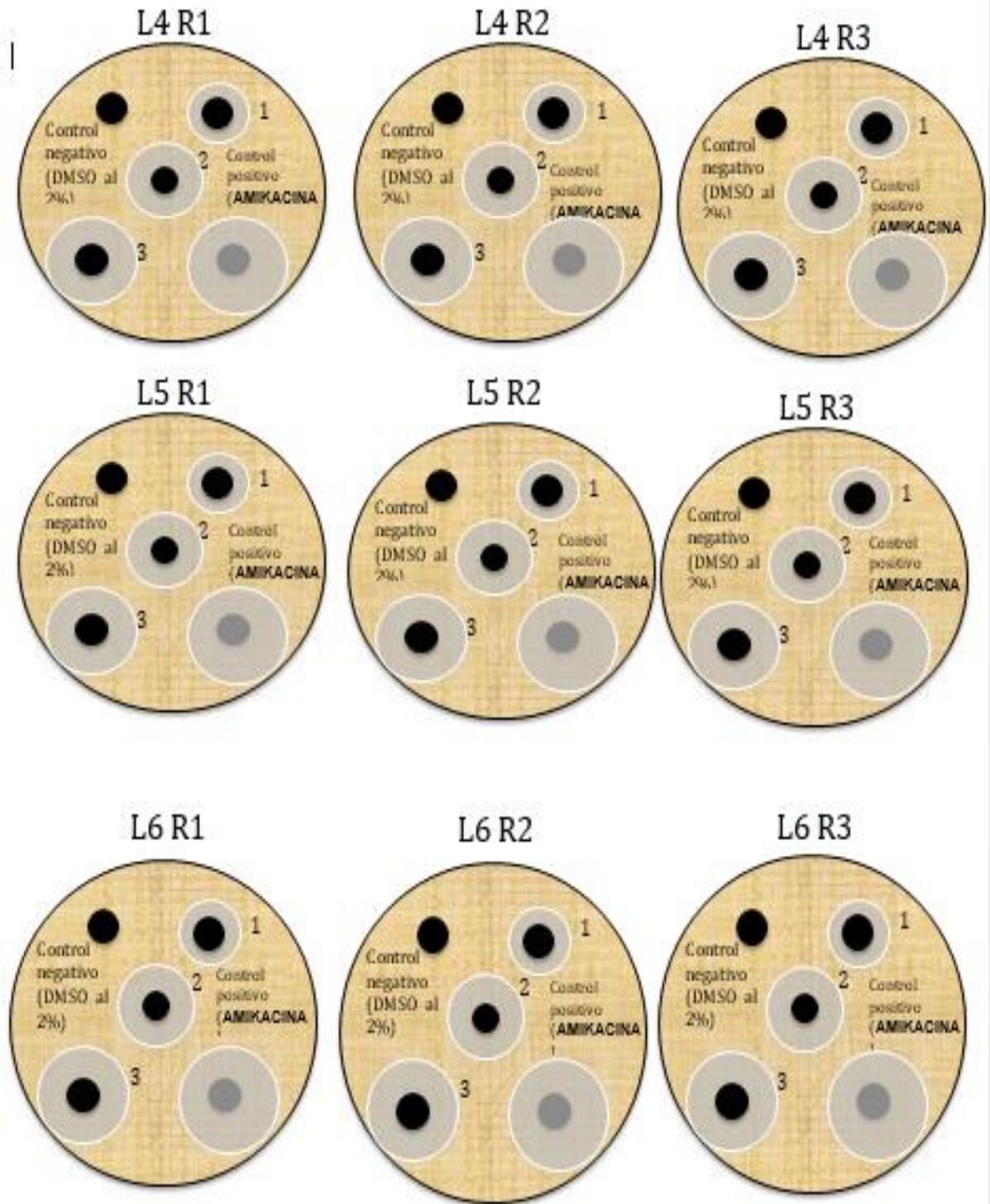


Figura 25. Actividad antibacteriana de extracto de *Agave durangensis* (L4, R1-R2-R3, L5,-R1-R2-R3, L6-R1-R2-R3) a 100 mg/ml resuspendidos en DMSO al 2%, frente a *Staphylococcus aureus*.

Tabla 9. Actividad antibacteriana de extractos de seis líneas morfológicas de *Agave durangensis*.

Microorganismos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Control DMSO	(-) AL 2%	Control Amikacina	(+)
<i>E. coli</i> (ATCC 10536)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	++++	
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	++++	

Los símbolos: ++ inhibición de 8 a 10 mm, +++ inhibición de 10 a 20 mm, ++++ inhibición de > a 20 mm.

En la tabla 10 se muestra la actividad antibacteriana de las seis líneas morfológicas probadas frente a *Escherichia coli*, se observa que todas las líneas tuvieron efecto ante esta bacteria, los resultados obtenidos contra esta cepa son de importante relevancia, ya que esta bacteria produce diferentes enfermedades como brotes de diarrea, colitis hemorrágica en seres humanos, *Escherichia coli* presenta resistencia a los antibióticos betalactámicos. A finales de los años 70 su característica era un patrón uniforme de sensibilidad; sin embargo, la utilización excesiva de diversos antibióticos ha provocado el aumento en su resistencia a nivel mundial (Turner *et al.*, 2006).

Tabla 10. Medidas de Halos de Halos de inhibición en mm. Microorganismos de referencia (Cepas)

Volumen y concentración	Agave durangensis	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	<i>Salmonella tiphymurium</i> (ATCC 14028)
150 µL De Extracto a 100 mg/mL (DMSO AL 2%)	Línea 1	10	-
200 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 1	13	-
300 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 1	17	-
150 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 2	9	-
200 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 2	13	-
300 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 2	16	-
150 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 3	8	-
200 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 3	14	-
300 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 3	17	-
150 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 4	10	-
200 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 4	13	-
300 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 4	18	-
150 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 5	11	-
200 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 5	13	-
300 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 5	15	-
150 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 6	11	-
200 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 6	13	-
300 µL De Extracto a 100 mg/ mL (DMSO AL 2%)	Línea 6	17	-
			No presento inhibición

Tabla 11. Medidas de Halos de Halos de inhibición en mm. Microorganismos de referencia (Cepas)

Volumen y concentración	<i>Agave durangensis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538),
150 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 1	-	11 mm
200 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 1	-	12mm
300 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 1	-	15 mm
150 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 2	-	10 mm
200 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 2	-	13mm
300 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 2	-	15 mm
150 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 3	-	10 mm
200 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 3	-	14mm
300 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 3	-	15 mm
150 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 4	-	9 mm
200 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 4	-	10mm
300 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 4	-	13 mm
150 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 5	-	11 mm
200 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 5	-	13mm
300 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 5	-	15 mm
150 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 6	-	10 mm
200 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 6	-	12mm
300 µL De Extracto a 100 mg/ml (DMSO AL 2%)	Línea 6	-	16 mm
(-) No presento inhibición			

El extracto en DMSO al 2% de *A. durangensis* con un volumen de 300 μ L a una concentración de 100 mg/mL presento halos de inhibición como se muestran en la tabla 10 y 11, contra algunas de las cepas evaluadas *S. aureus* y *E. coli* obteniendo un IC50 de 63.33 mg/mL respectivamente, quizá se deba a la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos contenidos en el extracto, afectando las rutas metabólicas de las bacterias donde si presentaron halos de inhibición de 15 mm de diámetro promedio para cada una de las seis líneas morfológicas de Agave probadas con esta concentración. Pudimos constatar con el control negativo DMSO al 2% la estabilidad de los extractos al no presentar actividad biológica contra las cepas.

Sin embargo, la aparición de cepas resistentes en México se presenta ya como un problema emergente, debido a esto la naturaleza es fuente de una amplia variedad de moléculas o compuestos bioactivos que podrían ser utilizados como base para el diseño de nuevas alternativas para solucionar diversos problemas de salud.

Tabla 12. Conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), duplicado de cada cepa, lectura realizada con un cuenta colonias.

Unidades Formadoras de Colonias UFC (Conteo en placa)								
Microorganismo	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. tiphimurium</i>		<i>S. epirdemidis</i>	
10-6	120	121	440	400	420	450	200	154
10-7	50	70	45	50	64	48	52	16
10-8	24	50	4	6	4	6	5	6
10-9	20	18	2	3	2	0	6	4
10-10	7	3	2	2	0	0	0	0

Primero se sembró de la cepa de referencia (cepa madre) en placa de Petri cada una de las cepas evaluadas, después del tiempo transcurrido de incubación 24 horas, se aisló una colonia, que fue reactivada en caldo Mueller Hinton, de esta se tomó 1 ml. del inóculo depositándolo en los tubos seriados que contenían una solución reguladora de fosfatos que se utilizó para hacer las diluciones dobles

seriadas, que iban de (10-1 hasta llegar a 10-10) todas fueron sembradas por duplicado y después del tiempo de incubación pudimos realizar la lectura con la ayuda de un cuenta colonias, de esta manera pudimos verificar las UFC y utilizar una carga adecuada de microorganismos para probar los extractos.

Para esto se comparó con el control positivo y el control negativo. Los resultados obtenidos al evaluar los extractos contra estas cepas de referencia fueron relevantes ya que inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* respectivamente como se muestra en la tabla 10 y 11. El control positivo utilizado fue la amikacina que mostro mayores diámetros en los halos de inhibición debido a que este antibiótico es de amplio espectro y tiene una concentración de 100 mg/ 2 mL del compuesto activo de este fármaco como era de esperarse.

Finalmente considerando que los compuestos ya caracterizados para *A. durangensis* por Almaraz, nos indica que la actividad podría ser debido principalmente por los Ac. Fenólicos, flavonoides y glicocidos.

IX. Conclusiones

- Los resultados de este trabajo brindaron información importante sobre el complejo *Agave durangensis*, se corroboraron sus propiedades antioxidantes y se comprobó la actividad antibacterianas de los extractos.
- Los extractos etanolicos de *Agave durangensis* tienen relevante capacidad antioxidante, ya que los compuestos en los extractos sirvieron como bloqueadores de radicales libres y como reductores de metales de transición, esa actividad puede estar asociada a la composición fenólica de la especie.
- Los resultados encontrados en fenoles totales sugieren que esta especie podría ser una fuente importante de compuestos antioxidantes.
- Los extractos de las plantas mostraron un gran potencial como antibacterianos, mostrando halos de inhibición con un promedio medio en comparación con otras especies.
- El conocimiento generado podría contribuir a combatir bacterias patógenas que afectan al ser humano.
- Aprovechar la síntesis de compuestos del metabolismo secundario de las plantas, conocer y comprender la sinergia de estos compuestos para contrarrestar la resistencia bacteriana y los efectos de los antibióticos sintéticos.
- El antibiótico comercial mostro mayor actividad antibacteriana que los extractos de *Agave durangensis*, estos extractos representan una alternativa para comunidades en las que el acceso a antibióticos es complicado.

X. Recomendaciones

Se recomienda probar los compuestos purificados y aislados en difusión en agar por pocillos para comprobar si la actividad biológica antibacteriana es por la sinergia de los compuestos o si se debe a un compuesto en específico.

Los resultados obtenidos en las pruebas antibacterianas para los extractos de *Agave durangensis* demostraron tener actividad antibacteriana contra dos cepas evaluadas. Se sugiere que se realicen las mismas pruebas con otras cepas de interés para ver su efecto antibacteriano.

Los extractos etanolicos de las seis líneas morfológicas de *Agave durangensis* presentaron el mismo comportamiento bactericida, así mismo se recomienda realizar pruebas de un carácter más complejo como antiinflamatorio, antiviral, anticancerígeno, etc. Que son enfermedades que afectan al ser humano hoy en día.

Se recomienda utilizar diferentes métodos de extracción con otros solventes, que nos permitan separar otros productos de metabolitos secundarios.

XI. Literatura citada

Afanasev I., A. I. Dorozhko, A. V. Brodski, V. A. Kostyuk & A. I. Potapovitch, (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38, 1763–1769.

Aguirre, R.J.R., S.H. Charcas, F.J.L. Flores (2001). El maguey Mezcalero Potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de San Luis Potosi, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosi.

Alasalvar, C., J. M. Grigor, D. Zhang, P. C. Quantick, & F. Shahidi, (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1410–1416.

Almaraz, A. N. (1984) Estudio Etnobotánico de los Agaves del Altiplano Potosino, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala UNAM Tesis.

Almaraz-Abarca, N., J. A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez, L. S. González-Valdez y R. González-Laredo (1998) The feeding deterrent affect of a flavonol and a flavanone on the Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis* Mulsant). *Ubamari* 44: 33-42.

Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral & L. S. González-Valdez (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 119-124.

Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, E. A. Delgado-Alvarado, J. A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, L. S. González-Valdez, N. Naranjo-Jiménez, C. Frigerio, A. F. Tomatas, A. J. Almeida, A. Vieira, J. N. Uribe-Soto (2008) Pollen flavonoid/phenolic acid composition of four species of Cactaceae and its taxonomic significance. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 534-543.

Almaraz-Abarca, N. E. A. Delgado-Alvarado, M. I. Torres-Morán, J. Herrera-Corral, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, and J. N. Uribe-Soto. (2013) "Genetic Variability in Natural Populations of Agave Durangensis (Agavaceae) Revealed by Morphological and Molecular Traits." *The Southwestern Naturalist* 58 (3): 314–24. doi:10.1894/0038-4909-58.3.314.

Andree, Karl. (2008) "Biología Molecular Aplicada a La Introducción." *Irta*.

Arrizon, J, S. Morel, A. Gschaedler, P. Monsan (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan; structures of Agave tequilana plants of different ages. *Food Chem*, 122, 123–30.

Aspinall, By G, and Agave Vera. (1957) "Aspinall and Das." *Structure*, no. 718: 718–22.

Avila-Fernandez A., N. Galicia-Lagunas, M.E.Rodriguez-Alegria, *et al.* (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of Agave fructans. *Food Chem*, 129, 380–6.

Azizi M, Bos R, Woerdenbag HJ, Kayser O. (2007) A comparative study of four chamomile cultivars cultivated in Iran. *Acta Horticulturae*; 749: 93-96.

Bancomext, CEMUE/PAIPYME. Productos vegetales naturales de uso en cosméticos e higiene personal (nutracéuticos) Disponible en: <http://cemue.com.mx>. (2017)

Başer H. K. C. (2005) New trends in the utilization of medicinal and aromatic plants. *Acta Horticulturae*; 676: 11-23

Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology*; 94: 223-253.

Campos, M.G. (1997) Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Dissertação de candidatura au grau de Doutor. Portugal: Universidade de Coimbra.

Cases CMA. (2007) Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las especies fundamentales. Principios activos. En: Jornadas técnicas dedicadas a las plantas aromáticas y medicinales. Brihuega, España.; pag.99.

Cedeño, Miguel C. (1995) "Tequila Production." *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (1): 1–11. doi:10.3109/07388559509150529.

Dahlgren R. M., CLIFFORD H. T., y YEO P. F. (1985) The families of monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Duke, J. A. (1985) Handbook of medicinal herbs. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. USA. Einhellig, F. A. 1985 Allelopathy- A natural protection, allelochemicals. Pp. 161-200 en N.

Dominguez, A. (1976) Metodos de investigación fitoquímica. Capítulo XI Hannant, D. J. 1978 Fibre cements and fibres concretes. John Wiley and Sons. New York.

Galván V. R., E. M. González (1991) Notas sobre el Género Agave en el estado de Durango. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 36: 3-7.

García-Mendoza, A., V. R. Galván (1995) Riqueza de las familias Agaveceas y Nolinaceas en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 7-24.

García-Mendoza, A. (2007) Los agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.

Gentry H. S. (1982) Agaves of Continental North America, The University Arizona Press, Tucson Arizona.

González-Elizondo, M. y R. Galván-Villanueva (1992) El Maguey (Agave spp.) y los Tepehuanes de Durango. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 37: 3-11.

González-Elizondo, M., R. Galván-Villanueva, I. L. López-Enríquez, L. Reséndiz Rojas y M.S. González-Elizondo (2009) Agaves -magueyes, lechuguillas y noas- del Estado de Durango y sus alrededores. CIIDIR Unidad Durango Instituto Politécnico Nacional-CONABIO. Durango, Dgo. 163 pp.

Good-Avila, S. V., V. Sousa, B. S. Gaut, E. L. Eguiarte (2006) Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae) Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 9124-9129.

Good-Avila, F. Molina-Freaner, H. T. Arita, A. Castillo, A. García Mendoza, A. Silva-Montellano, B. S. Gaut, V. Souza y L. E. Eguiarte (2006) Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus Agave. Aliso 22: 327-342.

Granados Sánchez D. (1993) Cultura y utilización del Maguey. In: César Rodríguez Zárata (eds.), Los Agaves de México. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco. México.

Hadacek, F. (2002) Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. Critical Reviews in Plant Science 21: 273-322.

Harborne, J. B., B. L. Turner (1984) Plant Chemosystematics. London Orlando Academic Press

Harborne, J. B. (1989) General procedures and measurement of total phenolics. In: Methods in Plant Biochemistry (Eds. Deay, P.M., Harborne J.B.). Vol 1. Academic Press. London, pp. 1-27.

Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouis, M., Hamdi, M. (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phonicea L. fruit extracts. Food Chemistry, 105: 1126-1134.

Heywood V. (2010) Medicinal and aromatic plants as global resources. Acta Horticulturae 1999; 500: 21-29. Juárez-Rosete CR. Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo (Tesis de doctorado) Estado de México: Colegio de Postgraduados.

Illsley, G.C. (2007) Biodiversidad, campesinos y la tradición mezcalera, Grupo de estudios Ambientales Asociación Civil.
<http://www.coinbio.com/docs/Articulos/Mezcal.pdf> Rocha, M., S. V.

Irish M. y Irish G. (2000) *Agaves, Yuccas and Related Plants. A Gardener's Guide*. Timber Press, Portland, Oregon.

Koschier EH, Nadjafi F, Bannayan M. (2003) Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of Thrips tabaci Lindeman. *Crop Protection*; 22: 929-934.

Kutchan, T.M. (2001) Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* 125: 58-60.

Lozoya Legorreta, X. (1994) *Plantas, medicina y poder: breve historia de la herbolaria mexicana* Editorial Pax México.

Markham, K. R. (1982). *Technique! offlavonoid identification*. Londres.

Martínez-Moreno D, Alvarado-Flores R, Mendoza-Cruz M, Basurto-Peña B. (2006) Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*; 79: 79-87.

Masarovičová E; Král'ová K. (2007) Medicinal plants: Past, Nowadays, Future. *Acta Horticulturae*; 49: 19-27.

Moure, A., J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, *et al.* (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.

Nurmi, K., V. Ossipov, E. Haukioja, K. Pihlaja. (1996) Variation of total phenolic content and low-molecular-weight phenolics in foliage of the mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *Tortuosa*). *Journal of Chemical Ecology* 22: 2033-50.

Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Biodiversitas* 62:12-15.

Pardo, O. (2007) El Agave (*Agave americana* L.) en las culturas prehispánicas: una revisión bibliográfica. *Chloris Chilensis, Revista Chilena de Flora y vegetación* Año 10, Num. 1. <http://www.chlorischile.cl/pardoagave2/Agaveamericana2007.htm>

Pérez y Anesini (1994), Tepe *et al.* (2004) y *Clinical and Laboratory Standards Institute 2012 (CLSI)*

Prieto, P., M. Pineda, M. Aguilar. (1999) Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269: 337-341.

Sangwan N. S., Farooqi A. H. A., Shabih F., Sangwan R. S. (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*; 34: 3-21.

Siddguraju. P., Becker, K. (2003) Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2144-2155.

Swatsitang, P. & W. Glover (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401–436.

Schieber, A., F. C. Stintzing & R. Carle (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401–413.

Taiz, L., Zeiger, E., (2006) *Plant Physiology*. 4th Edition. Sunderland, Mass. Sinauer Associates Inc., Publishers. Benjamin Cummings. California

Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Syllaro V, De Pascale A, (2004). Influence of heating and antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*; 89: 549-554.

Turner R., Solberg O., Lee B., Raphael E., DebRoy C., Riley L. (2006) Global Spread of Mobile Antimicrobial Drug Resistance Determinants in Human and Animal *Escherichia coli* and *Salmonella* Strains Causing Community-Acquired Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 49 (7): 365–71.

Valenzuela-Ruiz, R. F. J., G. O. H. Velasco, L. M. A. Márquez (2003) Desarrollo Sustentable del Agave mezcalero en Durango. SEP, CIIDIR-IPN-Dgo., SAGDR. México.