



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA Y ANTIMICÓTICA DEL  
EXTRACTO HIDROSOLUBLE DE *Agave mapisaga***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**YOLOTZIN ELISA MELQUIADES ORTIZ**

ASESORES:

**DRA. LAURA COBOS MARÍN**

**M. EN C. PABLO HERNÁNDEZ PERALTA**

**MVZ. MARÍA ANTONIETA MOJICA SÁNCHEZ**



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A mis abuelos paternos y mi tío que ya no nos acompañarán más, pero en su momento me abrieron las puertas de su casa y por los aprendizajes posteriores al tiempo convivido con ellos.

A mi madre, inspiración para realizar este trabajo de investigación como modalidad de titulación.

A él que es y que era y que ha de venir...

por acompañarme todo este tiempo y no dejarme pese a las muchas circunstancias tanto buenas como malas.

*“Un abismo llama a otro a la voz de tus cascadas; Todas tus ondas y tus olas han pasado sobre mí.” Salmos 42:7*

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Dra. Laura, Dra. Maritona y Pablo que se tomaron el tiempo para acogerme, enseñarme o canalizarme con otras personas cuando se necesitó para lograr la realización de este trabajo. A la Dra. Laura y Pablo por apoyarme en una situación familiar complicada, siempre les estaré agradecida por ese gesto.

A los técnicos del laboratorio Jorge y Gerardo que muchas veces me salvaron la vida ayudándome con mi material, además de recordarme donde colocar cada cosa o deshecho porque esta memoria de Dori olvidaba todo.

A los de preparación de medios que también en varias ocasiones me salvaron la vida con el material que necesitaba como los medios. También al Doc. Raúl por enseñarme varias cosas de bacter y hacerme reír con su pregunta: oiga ¿y usted en qué momento trabaja? Yo siempre la veo comiendo y echando el chisme, por proporcionarme algunos sensidiscos y ayudarme hacer el Dx de Gimi.

A los del laboratorio de viro y los que estuvieron (Dani, Marion, Ajitzi, Isa, Lau, Hugo, Erik y Manuel) porque de alguna u otra forma me ayudaron o me enseñaron algunas cosas del laboratorio, también por su compañía cuando estaba arriba. Especialmente a Manuel por hacerme reír tanto y acompañarme en varias ocasiones mientras comía.

A Karen por acompañarme la mayor parte del tiempo, tanto que Pablo nos decía las hermanitas, por ayudarme en varias ocasiones no sólo con la tesis también en otras situaciones fuera de la facultad y por aguantarme por dos años, seguro que fue difícil.

A Omar Alcaraz que desafortunadamente falleció, pero nos ayudó bastante con las TLC y un poco con el HPLC-MS.

A Azucena Carballo Villalobos de UNIPREC que nos ayudó con el análisis del HPLC-MS y otras muchas dudas más relacionadas con el extracto y la cromatografía.

A los Godínez band del CENAPA que sin saberlo me prepararon y me dieron ciertas bases para el desarrollo de mi tesis y poder trabajar en un laboratorio eficientemente además de que en la distancia me apoyaron, me animaron y me facilitaron cierto solvente.

A mi amigo Julio por todas las enseñanzas, los consejos, los regaños y llevarme al límite con todas sus preguntas que si bien no siempre fue grato debo admitir que aprendí bastante y me ayudó a mejorar, por darme perspectiva cuando en varias ocasiones la perdí, por ayudarme a ver diferentes escenarios y no quedarme sólo con uno, por animarme a su manera cuando las cosas eran un desastre, por ayudarme con el hongo cuando sentí que no tenía sentido nada de lo que hacía con este. También por acompañarme como amigo, hacerme reír y distraerme un poco para dejar el estrés, por la convivencia e incluirme en el círculo social del laboratorio de molecular. Por todas esas pláticas sobre bacterias y hongos que muchas veces terminaban desviándose a otros temas totalmente diferente pero igual de interesantes.

A mi familia que también a su manera estuvo apoyándome desde que entré a la universidad y que gracias a ese apoyo pude llegar hasta este momento. Pero sobre todo agradezco el apoyo incondicional de mi mamá que sin importar lo mal que estuvieran las cosas siempre creyó en mí, me dio ánimo para seguir adelante y no darme por vencida.

# CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
MEDICINA TRADICIONAL .....	2
ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS .....	2
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .....	3
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS ..	4
MEDICINA TRADICIONAL EN MÉXICO .....	5
GÉNERO AGAVE.....	6
AGAVE MAPISAGA .....	10
JUSTIFICACIÓN .....	11
HIPÓTESIS .....	11
OBJETIVO GENERAL .....	11
OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
ELECCIÓN DE MICROORGANISMOS Y VALIDACIÓN DE CEPAS .....	11
ELECCIÓN DE TESTIGOS ANTIBIÓTICOS Y ANTIFÚNGICOS .....	13
<i>Bacterias y levadura</i> .....	13
<i>Hongo dermatofito</i> .....	14
CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS .....	15
<i>Bacterias</i> .....	15
<i>Levadura</i> .....	16
<i>Hongo dermatofito</i> .....	16
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .....	17
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	17
<i>HPLC</i> .....	17
<i>Espectrometría de masas</i> .....	18
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
VALIDACIÓN DE CEPAS .....	18

<i>Bacterias</i> .....	18
<i>Levadura</i> .....	19
<i>Hongo dermatofito</i> .....	20
ELECCIÓN DE TESTIGOS.....	20
CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS .....	20
<i>Bacterias</i> .....	20
<i>Levadura</i> .....	23
<i>Hongo dermatofito</i> .....	24
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .....	25
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	26
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>PROSPECTIVA</b> .....	<b>36</b>
<b>ANEXO DE IMÁGENES</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>

## ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR UNA TLC.....	4
IMAGEN 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS COMPONENTES DEL HPLC-MS.....	5
IMAGEN 3 PLACAS DE SÍLICA DE LAS TLCs REALIZADAS. ....	26
IMAGEN 4 CROMATOGRAMA DEL EHA (ESI+). . . . .	27
IMAGEN 5 CROMATOGRAMA DEL EHA (ESI-). . . . .	27
IMAGEN 6 ESPECTRO DE MASAS MIN 17.4-17.5 . . . . .	28
IMAGEN 7 ESPECTROS DE MASA MIN 17.6-17.7.....	29
IMAGEN 8 ESPECTROS DE MASAS MIN 17.7-17.8.....	29
IMAGEN 9 ESPECTROS DE MASAS MIN 20.1-20.2 . . . . .	30
IMAGEN 10 ESPECTROS DE MASAS MIN 20.3-20.5.....	30
IMAGEN 11 ESPECTROS DE MASAS MIN 2.9-3. . . . .	31
IMAGEN 12 SIEMBRA EN AGAR P DE S. AUREUS 24 HORAS DE CRECIMIENTO . . . . .	37
IMAGEN 13 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE B. BRONCHISEPTICA. . . . .	37
IMAGEN 14 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE P. AERUGINOSA. . . . .	38
IMAGEN 15 COLONIA DE T. MENTAGROPHYTES . . . . .	38
IMAGEN 16 MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE T. MENTAGROPHYTES . . . . .	39
IMAGEN 17 TINCIÓN DE GRAM DE C. ALBICANS, OBJETIVO 100X . . . . .	39
IMAGEN 18 TUBO GERMINAL C. ALBICANS. OBJETICO 40X.....	40
IMAGEN 19 ANTIBIOGRAMA DE S. AUREUS.....	40
IMAGEN 20 ANTIBIOGRAMA DE B.....	41
IMAGEN 21 ANTIBIOGRAMA DE C ALBICANS. . . . .	41
IMAGEN 22 ANTIBIOGRAMA T. MENTAGROPHYTES. . . . .	42
IMAGEN 23 CONTEO DE UFC DE C. ALBICANS CAJA STX Y AGAVE 20 MG. . . . .	42



## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AGAVES.....	6
CUADRO 2 ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES ESPECIES DE AGAVES. ....	8
CUADRO 3 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN UTILIZADAS PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS....	12
CUADRO 4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN UTILIZADAS PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS..	13
CUADRO 5 AGARES UTILIZADOS PARA CRECIMIENTO Y ANTIBIOGRAMA DE ACUERDO CON CADA MICROORGANISMO.....	14
CUADRO 6 MEZCLAS DE SOLVENTES EMPLEADOS EN LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EHA.....	17
CUADRO 7 PERFIL BIOQUÍMICO PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS .....	18
CUADRO 8 PERFIL BIOQUÍMICO PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS .....	19
CUADRO 9 PRUEBAS REALIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE C. ALBICANS.....	19
CUADRO 10 RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA PARA LAS BACTERIAS.....	20

## ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Agar Dextrosa Papa	PDA
Agar Dextrosa Sabouraud	SDA
Agar Muller Hinton	MHA
Agar Sangre	AS
Agar Tripticasa Soya	TSA
Clinical and Laboratory Standards Institute	CLSI
Concentración mínima bactericida	MBC
Concentración mínima inhibitoria	MIC
Cromatografía líquida de alta eficiencia- Espectrometría de masas	HPLC-MS
Dimetilsulfóxido	DMSO
Electrospray	ESI

Espectrometría de masas	MS
Extracto hidrosoluble de <i>Agave mapisaga</i>	EHA
Grados Celsius	°C
Horas	Hrs
Infrarrojo	IR
Libras por pulgada cuadrada	psi
Masa/carga	m/z
Mayor o igual que	≥
Microgramos	µg
Microlitros	µL
Miligramo	mg
Mililitro	mL
Milímetros	mm
Minutos	min
Organización Mundial de la Salud	OMS
Óxido/Fermentación	O/F
Resonancia Magnética Nuclear	RMN
Solución Salina Fisiológica	SSF
Sulfhídrico Indol Motilidad	SIM
Thin Layer Chromatography (Cromatografía en capa fina)	TLC
Triple Azúcar Hierro	TSI
Ultravioleta	UV
Unidades Formadoras de Colonias	UFC
Voltios	V

## RESUMEN

La medicina tradicional es ampliamente empleada en muchas regiones del mundo, por ser asequible y accesible económicamente, el 80% de las personas de regiones menos desarrolladas la utiliza para cubrir sus necesidades sanitarias primarias. Dentro de esta medicina, la herbolaria es la práctica más difundida. En México, la medicina tradicional cuenta con una vasta colección de especies vegetales, entre las que destaca el uso del Agave; este, se ha utilizado para tratar diferentes patologías como infecciones gastrointestinales, desórdenes urológicos, inflamación, cáncer, diabetes, mordeduras de serpientes, espasmos estomacales, traumatismos, heridas entre otros. Debido a lo anterior, se han desarrollado múltiples diseños experimentales para identificar sus efectos biológicos y sus compuestos. Sin embargo, aun con la información disponible no todos los Agaves que se consideran medicinales han sido estudiados con respecto a sus propiedades antimicrobianas y su contenido fitoquímico, como es el caso del *Agave mapisaga*.

En este trabajo se evaluó el efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del extracto hidrosoluble de *A. mapisaga*. Los microorganismos utilizados fueron *S. aureus*, *S. agalactiae*, *B. bronchiseptica*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *T. mentagrophytes* y se determinó su actividad mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias. También se realizó un primer acercamiento en la identificación de compuestos presentes en el extracto por medio de TLC y HPLC-MS. Los resultados mostraron que el extracto inhibe el crecimiento de *C. albicans* a las concentraciones de 5,10 y 20 mg ( $p=0.005613$ ), mostró una tendencia en la disminución de UFC del *T. mentagrophytes* con la concentración de 20 mg del extracto y no tuvo efecto contra bacterias. Además, se encontraron saponinas y fructanos como algunos de los compuestos presentes.

Los resultados dan paso a evaluar otros géneros micóticos y realizar pruebas *in vivo*, además de una caracterización de los compuestos.

# INTRODUCCIÓN

## Medicina tradicional

La OMS define a la medicina tradicional como: todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (1).

Esta misma organización estima que cerca de una tercera parte de la población mundial no tiene acceso a medicinas esenciales; en África, Asia y América Latina utilizan la medicina tradicional para cubrir sus necesidades sanitarias primarias por ser accesible y asequible económicamente, además de formar parte de un sistema de creencias que se considera como parte integral de la vida diaria y del bienestar (2).

Se estima que el 80% de las personas en regiones menos industrializadas emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado de la salud (3). La fitoterapia es la ciencia que estudia el uso de las plantas medicinales, enteras o sus partes, secas o frescas, solas o asociadas; así como sus extractos y formulaciones, que no se le adicionen otros principios activos industriales, para la prevención y/o tratamiento de problemas de salud (4).

Hasta el advenimiento de la medicina alopática, el hombre dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades y las de animales (5), ya que las plantas medicinales son especies vegetales que contienen sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (3). Alrededor del 50 % de los medicamentos de uso clínico provienen de productos naturales, derivados y análogos (6).

## Análisis de los compuestos

La identificación de los compuestos de las plantas medicinales es fundamental para conocer las moléculas activas y su mecanismo de acción para su posible empleo como tratamientos. Se han desarrollado muchas técnicas analíticas para la investigación de los constituyentes y la actividad biológica de las plantas medicinales, como son: cromatografía en capa fina

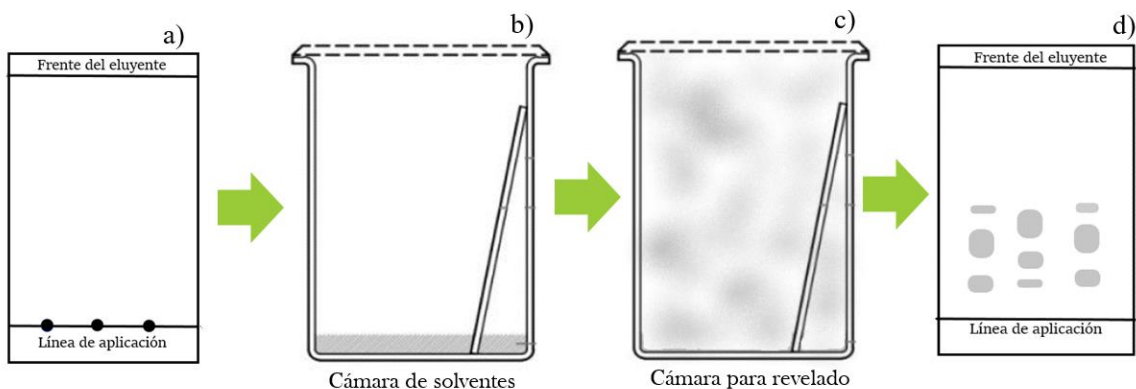
(TLC), cromatografía de gas-líquido (GLC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y las espectroscópicas (ultravioleta, infrarrojo, masas) (3).

### Cromatografía en capa fina

La TLC es un tipo de técnica cromatográfica que se usa para la separación de los componentes presentes en la mezcla usando una fase estacionaria delgada. La separación de los componentes depende de la competencia entre la adsorción del soluto sobre la superficie sólida (fase estacionaria) y su desorción por el disolvente necesario para eliminar la fase estacionaria (7).

La mayoría de las aplicaciones de esta técnica se dirigen al análisis de muestras botánicas (principalmente en medicinas tradicionales y análisis de la composición de componentes terapéuticos y su autenticación), medicamentos (control de calidad), muestras de alimentos (control de calidad y autenticación) y muestras ambientales (principalmente para detectar contaminantes) (8).

La TLC consiste en colocar cierta cantidad de la muestra diluida en la placa (*Imagen 1a*), cuando ésta se seca se introduce en una cámara que contiene la mezcla de solventes por utilizar, se deja el tiempo necesario para que la fase móvil recorra la placa por capilaridad hasta el frente del solvente (*Imagen 1b*). Una vez que llegó al punto antes descrito se deja secar para posteriormente meterla a otra cámara con cristales de yodo para revelar los compuestos separados (*Imagen 1c*). En la imagen 1 se esquematiza el procedimiento (7,9).



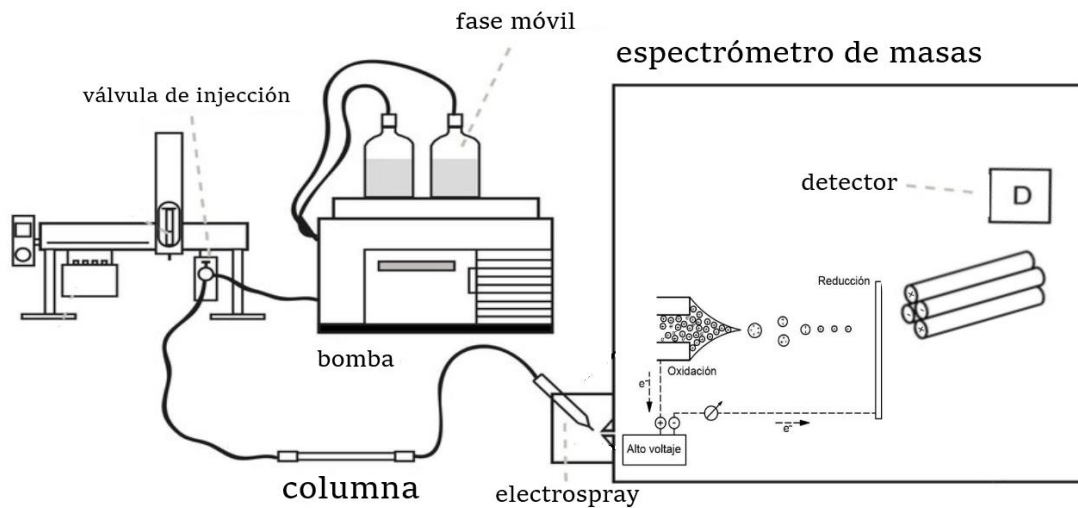
*Imagen 1 Esquema del procedimiento para realizar una TLC. Placa con la muestra a), paso de la fase móvil para la elución de los compuestos b), revelado de los componentes c), visualización de las bandas correspondientes a los diferentes componentes d).*

## Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía líquida ha sido utilizada para la separación e identificación de productos naturales, en el análisis de productos farmacológicos, además es empleada para la separación e identificación de compuestos bioactivos de las plantas, separación de iones inorgánicos y hormonas esteroidales, entre otros. La espectrometría de masas se utiliza para elucidar la estructura de sustancias desconocidas, analitos forenses y ambientales, control de calidad de drogas, alimentos y polímeros, y para el análisis secuencias de biomoléculas (7,10).

El equipo para HPLC está compuesto por un sistema de suministro de disolventes, bomba, inyector, columna, detector y un sistema de control (software) (9).

El espectrómetro de masas está conformado por una fuente de iones, el analizador de masas y un detector. (Imagen 2)



*Imagen 2 Representación esquemática de los componentes del HPLC-MS. Esquema modificado de Östman (11).*

La separación de compuestos de una mezcla o de una solución muestra se basa en hacer pasar la fase móvil (transporte) y la mezcla con una alta presión a través de una columna (fase estacionaria) los compuestos serán separados al quedarse en cierto lugar de la columna, debido al flujo continuo de la fase móvil y a la afinidad de los compuestos por dicha fase serán arrastrados nuevamente para salir por la columna. Pasarán por una interfase que ayuda a unir ambas técnicas; esta interfase también fungirá como la fuente de iones como el electroespray (ESI).

Los componentes de la muestra se fragmentarán y junto con la fase móvil pasarán por un capilar cargado positivamente o negativamente dependiendo de la modalidad elegida, se formarán gotas con varios iones que al aplicarles nitrógeno disminuirán su volumen para contener sólo un ion cargado. Pasarán al cuadrupolo (analizador de masas) que consiste en cuatro barras que generarán campos magnéticos y sólo las moléculas con una determinada  $m/z$  podrán pasar directo al detector para ser registrados (7,10,12,13).

## Medicina tradicional en México

La medicina tradicional mexicana es un mosaico de piezas procedentes de las culturas que se han desarrollado en el territorio nacional. Posterior al mestizaje es cuando se retoma la utilidad empírica de los recursos naturales empleados para las prácticas curativas. La

medicina tradicional es asociada a las plantas medicinales, su recurso más abundante, accesible y conocido (14).

México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética debido a su topografía y variaciones climáticas, por tanto es considerado como un país megadiverso con alrededor del 12% de especies a nivel mundial (3,15).

De todas las especies de plantas cerca de 7,000 tienen algún tipo de uso, de las cuales 4,000 especies se consideran con atributos medicinales (15% de la flora total mundial). Sin embargo, la validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en un 5% de las especies; esto evidencia un campo de estudio trascendente (3).

Entre los grupos de plantas medicinales más importantes por conocer sus metabolitos secundarios y su comportamiento, se encuentran los magueyes o agaves. Estas plantas han sustentado los grupos humanos en México y han evolucionado junto con los pueblos de esta región (16).

### Género Agave

Los agaves son plantas perennes que pertenecen al orden Liliales (*Cuadro 1*); sus hojas están dispuestas en espiral arregladas en rosetas con una inflorescencia en forma de espiga, las especies grandes alcanzan su madurez entre los 10 y 25 años, mientras que las especies pequeñas lo hacen entre cuatro y cinco años. Están adaptados a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas (16,17).

*Cuadro 1 Clasificación taxonómica de los Agaves*

División	Angiospermae
Clase	Monocotyledoneae
Orden	Liliales
Familia	Agavaceae
Género	<i>Agave</i>



Este género se distribuye en el norte de las regiones montañosas del centro de México, Sierra Madre Occidental, en el Altiplano, Baja California y en la Sierra Madre Oriental (18).

De acuerdo a lo reportado existen de 136 a 350 especies del género Agave, los datos varían según lo reportado por diferentes autores; en México se encuentran aproximadamente el 75% de las especies de éste género (16,18,19).

De las miles de plantas existentes en México con las que se ha beneficiado el ser humano, el maguey ha sido una de las más aprovechadas, tanto por los antiguos mesoamericanos como por los actuales habitantes del altiplano central (16). Su uso va desde fuente de alimento, bebidas, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas, hasta la elaboración de implementos agrícolas y forraje (17,19).

Con respecto a su uso medicinal estas plantas se han utilizado para el tratamiento contra la disentería, desórdenes urológicos, infecciones gastrointestinales, inflamación, cáncer, diabetes, mordeduras de serpientes, espasmos estomacales, fiebre, golpes, heridas, depurativo de la sangre y como diurético (16,18).

Los constituyentes químicos de las hojas de Agave son metabolitos secundarios como las saponinas, flavonoides, terpenos, glicósidos, esteroides, taninos, fructanos, alcaloides y policosanoles, éstos tienen diversos efectos biológicos ya que este componente fitoquímico no es esencial para la nutrición de la planta sino le provee protección contra depredadores y condiciones climatológicas. Se ha descrito un efecto antimicrobiano *in vitro* de saponinas, taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides (18,20,21).

En los (*Cuadros 1 y 2*) se presentan los hallazgos de estudios *in vitro* relacionados con la exploración de la actividad antimicrobiana de diferentes especies de Agaves(18).

**Cuadro 2 Estudios de la actividad antimicrobiana de diferentes especies de Agaves.**

<b>Agave</b>	<b>Tipo de extracto</b>	<b>Dosis</b>	<b>Susceptibilidad a los extractos</b>	<b>Referencia</b>
<i>A. sisalana</i>	Metanólico	0-40 mg/mL	MIC: 10-20 mg/mL y MBC: 20-40 mg/mL <i>S. aureus</i> , <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. pyogenes</i>	Hammuel C, <i>et al</i> (2011)
	Acuoso			
	Metanólico	0-12,500 µg/mL	MIC: >12 500 µg/mL <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>S. choleraesuis</i>	Ribeiro BD, <i>et al</i> (2013)
	Metanólico	0-40 mg/mL	MIC: >12 500 µg/mL <i>C. albicans</i> , <i>A. Niger</i>	Ade-Ajayi A, <i>et al</i> (2011)
	Acuoso		MIC:10-20 mg/mL , MBC: 20-40 mg/mL <i>S. dysenteriae</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. fecalis</i>	
	Hidroalcohólico	1- 48.8 mg/mL	No actividad contra bacterias	Santos J, <i>et al</i> (2009)
<i>A. lechuguilla</i>			MIC: 0.39 para <i>C. albicans</i>	
<i>A. picta</i>			MIC: 6-7 mg/mL <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. ateroides</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>S. aureus</i>	Verástegui MA, <i>et al</i> (1996)
<i>A. scabra</i>				Verástegui Á, <i>et al</i> (2008)
<i>A. lophantha</i>	Etanólico	0-12 mg/mL	MIC: 4-6 mg/mL <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. albidus</i>	
			MIC: 4-6 mg/mL <i>M. gypseum</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>S. schenckii</i>	
<i>A. attenuata</i>	Metanol	0-252 mg/mL	MIC: 15.2-252 mg/mL <i>B. subtilis</i> , <i>P. multocida</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Rizwan K, <i>et al</i> (2012)
	Cloroformo			
	Acetato de etilo			
	n-Butanol			
	n-Hexano			
<i>A. intermixta</i>	Acuoso	0-15 mg/mL	MIC: 10-15 mg/mL <i>E coli</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>M. lacunata</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B megaterium</i> y <i>S. aureus</i>	García M, <i>et al</i> (1999)

<i>Agave</i>	<i>Tipo de extracto</i>	<i>Dosis</i>	<i>Susceptibilidad a los extractos</i>	<i>Referencia</i>
<i>A. impressa</i>	Metanólico n-hexano	0-15 mg/mL	MIC: 5-15 mg/mL y MBC: 10-15 mg/mL <i>S. gupo</i> A4, <i>S. typhi</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>E. coli</i> y <i>P.aeruginosa</i>	Ahumada-Santos YP, <i>et al</i> (2013)
<i>A. ornithobroma</i>				
<i>A. rzedowskiana</i>				
<i>A. tequilana</i>				
<i>A. schidigera</i>				
<i>A. angustifolia</i>				
<i>A. asperrima</i>	Metanólico	0-60 mg/mL	<i>A. flavus</i> MIC: 0.5->60 mg/mL	Sánchez E, <i>et al</i> (2005)
<i>A. striata</i>			<i>A. parasiticus</i> MIC: 1->60 mg/mL	
			% reducción del micelio: <i>A. flavus</i> (3-70%) y <i>A. parasiticus</i> (0-80%)	
			% reducción de aflatoxina: <i>A. flavus</i> (16->99%) and <i>A. parasiticus</i> (0->99%)	
<i>A. lechuguilla</i>	Etanólico n-Hexano	0-5000 µg/L	Inhibición de esporulación: <i>Rhizopus stolonifer</i> (9.4-77.1%), <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (100%) y <i>Penicillium digitatum</i> (6.5-52.6%)	De Rodríguez DJ, <i>et al</i> (2011)
			Inhibición del micelio: <i>R. stolonifer</i> (43-100%), <i>C. gloeosporioides</i> (44-100%) <i>P. digitatum</i> (20-84%)	

Se describe la especie de Agave, el tipo de extracto utilizado, la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), Concentración Mínima Bactericida (MBC) obtenidas y los autores que realizaron estos estudios para identificar la susceptibilidad a los extractos de Agave.

### *Agave mapisaga*

Pertenece a la familia *Agavaceae* y al subgénero *Agave*, es una planta con un tallo pequeño, sus hojas son verdes, lineales formando rosetas desplegadas de 185 -250 x 19 -25 cm con espinas cónicas de 3-5 cm de longitud, su inflorescencia mide 8 m o más de alto; sus flores son largas, densas y succulentas 8-10 cm de longitud; pétalos frecuentemente rojizos (16).

Cuenta con tres variedades: *A. mapisaga* Trel var. *lisa*, *A. mapisaga* var. *ferox* y *A. mapisaga* Trel var. *mapisaga*.

De forma común se le denomina como “maguey penca larga”, “maguey manos largas”, “maguey mano delgada”, “maguey mexicano”, “maguey blanco”, “maguey bueno”, “maguey manso”, se ha utilizado para la elaboración de pulque, las flores jóvenes se comen horneadas y los pedúnculos secos se emplean en la construcción como postes y para erigir cercas. Además, en el Estado de Hidalgo es considerada como una de las 7 especies de *Agave* medicinales, su uso ha sido para el tratamiento de heridas y golpes de manera local colocando la penca asada con o sin epidermis en el sitio dañado (16,22).

La información científica en cuanto a los efectos biológicos de esta especie aún es limitada. Sin embargo, se sabe que en un modelo de cáncer de próstata murino disminuyó la implantación tumoral cuando se les administró el extracto acuoso vía oral, en este mismo estudio se identificó un patrón isotópico por HPLC-MS similar a la hecogenina, que es la aglicona de una saponina esteroideal denominada agavósido C (23). Por otra parte, se observó un efecto antiinflamatorio reflejado en la disminución de óxido nítrico en macrófagos J774 A.1 cuando se expusieron al extracto acuoso sin afectar su viabilidad (24). Además se determinó un efecto citotóxico en células de cáncer de mama de la línea 4T1 a una concentración de 0.5 mg/mL (25), en células de cáncer de próstata de la línea PEC-Src a una concentración de 0.125mg (23), en macrófagos J774A.1 a una concentración de 0.5 mg (24) y en células de cultivo primario de esplenocitos murinos a una concentración de 20mg/mL (26).

En el presente estudio se buscó demostrar la actividad antimicrobiana del *Agave mapisaga* que es usado como una planta medicinal.

## Justificación

El *Agave mapisaga* se ha utilizado con fines medicinales por el pueblo originario Hñähñu, sin embargo, no hay un respaldo científico para su uso como microbicida, este estudio es un primer acercamiento al efecto bactericida y fungicida *in vitro* del extracto.

## Hipótesis

El extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* tiene un efecto bactericida y fungicida *in vitro* comparable con tratamientos antimicrobianos de referencia.

## Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana y antimicótica *in vitro* del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* por medio de la cuantificación de unidades formadoras de colonia como una alternativa en el uso del extracto de *Agave mapisaga* como microbicida.

## Objetivos particulares

1. Determinar la actividad antimicrobiana del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* a distintas concentraciones mediante cuantificación de unidades formadoras de colonias de cepas bacterianas y micóticas en comparación con antimicrobianos de uso en medicina veterinaria.
2. Analizar la composición química del extracto hidrosoluble de *A. mapisaga*, empleando técnicas cromatográficas para conocer de manera general los compuestos fitoquímicos que le otorgan sus propiedades antimicrobianas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### Elección de microorganismos y validación de cepas

Los microorganismos fueron seleccionados por ser representativos de los dos grandes grupos de bacterias Gram positivas y negativas. Las bacterias seleccionadas fueron las siguientes: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*. En cuanto a los hongos se emplearon el *Trichophyton mentagrophytes* y la levadura *Candida albicans*. Cabe mencionar que los microorganismos fueron aislados de

muestras clínicas recibidas en el área de diagnóstico del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia del año 2019.

Una vez obtenidas las cepas bacterianas y micóticas se procedió a verificar la identidad de las mismas de acuerdo a la metodología de Jang *et al.* (27). Para el caso de las bacterias se realizó la tinción de Gram para identificar las Gram (+) y las Gram (-), además de la morfología microscópica para elegir el perfil bioquímico adecuado. (Cuadros 3 y 4)

*Cuadro 3 Pruebas de identificación utilizadas para bacterias Gram positivas.*

<b>Pruebas de identificación</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<b>Tinción de Gram</b>	X	X
<b>Catalasa</b>	X	X
<b>Hemólisis en agar sangre</b>	X	X
<b>Crecimiento en agar P</b>	X	NA
<b>Coagulasa</b>	X	NA
<b>Manitol</b>	X	NA
<b>Prueba de CAMP</b>	NA	X
<b>Esculina</b>	NA	X
<b>Siembra en caldo sangre</b>	NA	X
<b>Polimixina B</b>	X	NA

NA= no aplica la prueba para ese microorganismo, X= indica que se realizó esa prueba

*Cuadro 4 Pruebas de identificación utilizadas para bacterias Gram negativas.*

<b>Bacteria</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<b>Tinción Gram</b>	X	X
<b>Oxidasa</b>	X	X
<b>TSI</b>	X	X
<b>SIM</b>	X	X
<b>Citrato</b>	X	X
<b>Urea</b>	X	X
<b>O/F</b>	X	NA
<b>Lisina</b>	X	NA
<b>Crecimiento 42°/37°/ 5°C</b>	X	NA

*NA= no aplica la prueba para ese microorganismo, X= indica que se realizó esa prueba*

En el caso particular del *T. mentagrophytes* se realizó el microcultivo de Ridell, posteriormente se hizo la tinción de azul de algodón lactofenol para la observación de estructuras microscópicas, las cuales se compararon con lo descrito en la literatura.

Para *Candida albicans* se realizó la tinción de Gram, la tinción de tinta china, la prueba formación de tubo germinal y de clamidoconidias.

### Elección de testigos antibióticos y antifúngicos

A todos los microorganismos se les realizó la prueba *in vitro* de susceptibilidad a antimicrobianos por difusión en agar o antibiograma para determinar si eran susceptibles o resistentes a los antibacterianos o antifúngicos.

### Bacterias y levadura

La metodología empleada fue de acuerdo con Bauer *et al.* y el apartado 15 del CLSI (28,29). Primero se obtuvo un cultivo de 24 horas de las bacterias y levadura, posteriormente para cada uno de los cultivos se realizó un inóculo en SSF estéril ajustado al 0.5 del nefelómetro de McFarland. Con un hisopo estéril se sembró la bacteria o levadura por estría cerrada en

toda la superficie del agar Muller Hinton (MHA) o MHA suplementado (*Cuadro 5*) se esperó a que se secase en el agar y se colocaron los sensibilizadores con los antibióticos seleccionados. Se incubó a 37° (bacterias) o 35°C (levadura) por 24 h. Posterior al tiempo de incubación se midieron los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano para clasificar a las cepas como susceptibles, intermedias o resistentes.

#### Hongo dermatofito

La metodología seguida fue de acuerdo con Espinel-Ingroff *et al.* y Nweze *et al.* (30,31) se sembró el *T. mentagrophytes* en agar dextrosa papa (PDA) por 7 días a 35°C, en SSF estéril se suspendieron conidias tomadas con el asa microbiológica impregnada de Tween 20. Se dejó sedimentar el Tween 20 por 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo, se agitó el sobrenadante con el vortex por 15 segundos. Con un hisopo estéril se tomó de la suspensión de conidias y se sembró en tres direcciones diferentes a toda la superficie del agar MH (*Cuadro 4*), se dejó secar por 5 min aproximadamente. Previamente se impregnó el disco de papel filtro estéril con una concentración final de 1µg en un volumen de 20 µL de Terbinafina diluida en DMSO, se dejó secar por 5 min y se colocó en el agar ya sembrado. Las condiciones de incubación fueron 35°C por 5 días.

*Cuadro 5 Agares utilizados para crecimiento y antibiograma de acuerdo con cada microorganismo.*

<b>Microorganismo</b>	<b>Agar para crecimiento</b>	<b>Agar para antibiograma</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	TSA	MHA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Agar sangre	MHA con sangre
<i>Candida albicans</i>	SDA	MHA suplementado con 2% de glucosa y 0.5µg/mL de azul de metileno
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	SDA	MHA



Los antibióticos seleccionados para la prueba se enlistan a continuación:

1. Penicilina G (10 $\mu$ g)
2. Ciprofloxacina (5 $\mu$ g)
3. Tetraciclina (30 $\mu$ g)
4. Gentamicina (10 $\mu$ g)
5. Neomicina (10 $\mu$ g)
6. Sulfa-trimetoprim (25 $\mu$ g)
7. Cefotaxima (30 $\mu$ g)

Antifúngicos seleccionados para la prueba de susceptibilidad:

1. Nistatina (100 UI)
2. Terbinafina (1 $\mu$ g)

## Cuantificación de unidades formadoras de colonias

### Bacterias

Se realizó un cultivo primario en agar tripticasa soya (TSA) o agar sangre (AS) que se incubó por 24 h, de éste se realizó una suspensión en 6mL de SSF estéril ajustada al 0.5 del nefelómetro de McFarland, posteriormente se hicieron 6 diluciones décuples seriadas en SSF de las cuales se eligieron las tres últimas (-4, -5 y -6). Se tomaron 20  $\mu$ L de cada dilución bacteriana y se desafiaron con 20  $\mu$ L a una concentración de 5, 10 y 30  $\mu$ g (Ciprofloxacino, Penicilina G y Cefotaxima) como testigos de tratamientos antimicrobianos; se homogenizó la mezcla y posteriormente se sembraron en tres regiones del agar 10  $\mu$ L de cada mezcla (dilución bacteriana más antibióticos) en TSA o AS según los requerimientos de la bacteria. A su vez se expusieron las diluciones bacterianas a tres concentraciones del extracto hidrosoluble de *A. mapisaga* (EHA) (20 mg/ 20 $\mu$ L, 10 mg/20 $\mu$ L y 5 mg/20 $\mu$ L). Como testigo de crecimiento bacteriano en lugar del extracto o antibiótico se adicionó SSF 20 $\mu$ L.

Las cajas se incubaron a 37°C por 18 a 24 h dependiendo del crecimiento de la bacteria, una vez incubadas se procedió a realizar el conteo de UFC.

Se realizaron 4 repeticiones por bacteria y sólo se usaron los datos obtenidos de la dilución -5 por ser la mejor para contar las UFC, para el análisis de datos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis.

#### Levadura

De manera similar a la metodología antes descrita para bacterias, se comenzó con un cultivo primario de 24 h de crecimiento sembrado en SDA, del cual se seleccionaron 5 colonias  $\geq$  1mm para suspender en SSF estéril, esta suspensión estaba ajustada al 0.5 del nefelómetro de McFarland. Se realizaron cuatro diluciones décuples seriadas en SSF de las cuales sólo se eligieron las tres últimas (-2, -3 y -4), cada dilución fue desafiada con la nistatina (100 UI) y las tres concentraciones del EHA (20, 10 y 15 mg) en una proporción 1:1 suspensión-tratamiento, es decir, se colocaron 20  $\mu$ L de la dilución con 20  $\mu$ L de cada tratamiento se mezclaron y se sembraron en tres regiones del agar SDA 10  $\mu$ L de la mezcla. Las cajas se incubaron a 35°C por 15 h; finalmente se procedió hacer el conteo, obtener las UFC/mL.

La prueba se realizó cuatro veces y los datos ocupados fueron de la dilución intermedia (-3) por ser la más factible para el conteo, para el análisis de datos también se hizo la prueba de Kruskal-Wallis.

#### Hongo dermatofito

Se sembró en PDA por 7 días a 35°C, se recogieron las conidias con el asa microbiológica impregnada de Tween 20 para suspenderlas en SSF estéril, se dejó sedimentar el Tween 20 por 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se desafió la suspensión de conidias con terbinafina a una concentración de 1  $\mu$ g/20 $\mu$ L para el testigo antifúngico, así mismo se probó la actividad del EHA a tres concentraciones (20, 10 y 5mg/100 $\mu$ L). Después de homogenizar las mezclas se sembraron 100  $\mu$ L de cada una y se dispersó el volumen con ayuda de un asa de vidrio por toda la superficie del SDA. Las cajas se incubaron a 35° por 72 h y se contaron las UFC obtenidas.

## Cromatografía en capa fina

Para esta técnica se empleó una solución del EHA a una concentración de 20 mg/mL. Se colocó un volumen de 10 µL en placas de sílica en la línea de aplicación y se dejó secar por 20 min.

Las placas de sílica se colocaron en cámaras de vidrio que contenían las mezclas de solventes o fase móvil hasta que llegara al frente de eluyente (*Cuadro 5*), permitiendo que por capilaridad esta recorriera la placa generando la elución de los componentes. Posterior al tiempo de exposición se dejó secar la placa y se reveló con polvo de yodo. El procedimiento se llevó a cabo por duplicado por cada mezcla de solvente utilizado.

*Cuadro 6 Mezclas de solventes empleados en la cromatografía en capa fina del EHA.*

<b>Solventes</b>	<b>Proporción</b>	<b>Compuesto objetivo</b>
<b>Tolueno: acetato de etilo: metanol</b>	5:1:2	Saponinas
<b>Cloroformo: metanol: agua</b>	65:35:10	Saponinas
<b>Butanol: agua: ácido acético</b>	84:14:7	Saponinas
<b>Butanol: metanol: agua: ácido acético</b>	50:25:20:1	Fructanos

## Cromatografía líquida de alta eficiencia-espectrometría de masas

El análisis de HPLC-MS se realizó en la Unidad de servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

### HPLC

Como fase móvil se usó ácido fórmico al 0.1% y acetonitrilo en una proporción 95:5 respectivamente, volumen de inyección 3 µL, flujo de 0.5 mL/min, columna utilizada C18 5µm 4.5x150mm (fase estacionaria).

## Espectrometría de masas

La ionización fue por ESI (+) y ESI (-), la temperatura del capilar fue de 3000°C a un voltaje de 4000 V, flujo de gas 10 L/min, la presión del nebulizador de 40 psi, el rango de masas cubierto por el escáner fue a partir de 50-1650 m/z con un voltaje de fragmentación de 135 V.

Se realizó una búsqueda bibliográfica de la caracterización de los compuestos presentes en diferentes Agaves para comparar sus espectros de masas con los obtenidos en este trabajo.

## RESULTADOS

### Validación de cepas

#### Bacterias

En los (Cuadros 6, 7 y 8) se describen las pruebas de identificación realizadas a cada microorganismo con el resultado obtenido.

*Cuadro 7 Perfil bioquímico para bacterias Gram positivas*

<b>Pruebas de identificación</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<b>Tinción de Gram</b>	Cocos Gram (+) en racimos	Cocos Gram (+) en cadena
<b>Catalasa</b>	+	-
<b>Hemólisis en agar sangre</b>	completa	incompleta
<b>Crecimiento en agar P</b>	+	NA
<b>Coagulasa</b>	+	NA
<b>Manitol</b>	+	NA
<b>Prueba de CAMP</b>	NA	+
<b>Esculina</b>	NA	-
<b>Hemólisis en caldo sangre</b>	NA	+
<b>Polimixina B</b>	R	NA

*NA= No aplica, (+) positivo a la prueba y (-) negativo a la prueba*

*Cuadro 8 Perfil bioquímico para bacterias Gram negativas*

<b>Bacteria</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Bordetella bronchiseptica</i>		
<b>Tinción Gram</b>	Bacilos Gram (-)			Bacilos Gram (-)		
<b>Oxidasa</b>	+			+		
<b>TSI</b>	Reacción 5			Reacción 5		
<b>SIM</b>	-	-	+	-	-	-
<b>Citrato</b>	+			+		
<b>Urea</b>	+			+		
<b>O/F</b>	(-) / (-)			NA		
<b>Lisina</b>	+			NA		
<b>Crecimiento 42°/37°/ 5°C</b>	+	+	-	NA		

NA= No aplica, (+) positivo y (-) negativo a la prueba

Levadura

Los resultados de las pruebas de identificación se muestran en el siguiente cuadro:

*Cuadro 9 Pruebas realizadas para la identificación de C. albicans*

<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>
<b>Tinción de Gram</b>	Células sugerentes de levaduras teñidas como Gram positivo
<b>Tinción de tinta china</b>	positiva
<b>Producción de tubo germinal</b>	positiva
<b>Producción de clamidoconidias</b>	positiva

## Hongo dermatofito

Con la tinción de azul de algodón lactofenol se observaron hifas septadas algunas de ellas enrolladas o en espiral característico de la especie, microconidas esféricas y pequeñas dispuestas en racimo (32,33) (*Imagen 16*).

## Elección de testigos

Los resultados del antibiograma de las bacterias se presentan en el (*Cuadro 9*). Se decidió utilizar el ciprofloxacino como antibiótico testigo para *S. aureus* y *B. bronchiseptica*, mientras que para *S. agalactiae* se utilizó la penicilina G y para *P. aeruginosa* la cefotaxima.

Los resultados obtenidos de la levadura se compararon con los reportados por BioRad (34), con lo cual se determinó la susceptibilidad de *C. albicans* a la Nistatina 100UI.

Para el hongo dermatofito los resultados obtenidos se compararon con lo descrito por Nweze *et al.* (31) con lo cual se determinó la susceptibilidad del *T. mentagrophytes* a la terbinafina.

*Cuadro 10 Resultados del antibiograma para las bacterias*

<b>Bacteria/ antibiótico</b>	<b>P (10 µg)</b>	<b>Cp (5 µg)</b>	<b>T (30 µg)</b>	<b>G (10 µg)</b>	<b>N (10 µg)</b>	<b>SxT (25 µg)</b>	<b>CTX (30 µg)</b>
<i>S. aureus</i>	R	<b>S</b>	R	S	I	S	NP
<i>S. agalactiae</i>	<b>S</b>	I	R	R	R	I	NP
<i>B. bronchiseptica</i>	R	<b>S</b>	S	S	I	R	NP
<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	<b>I</b>

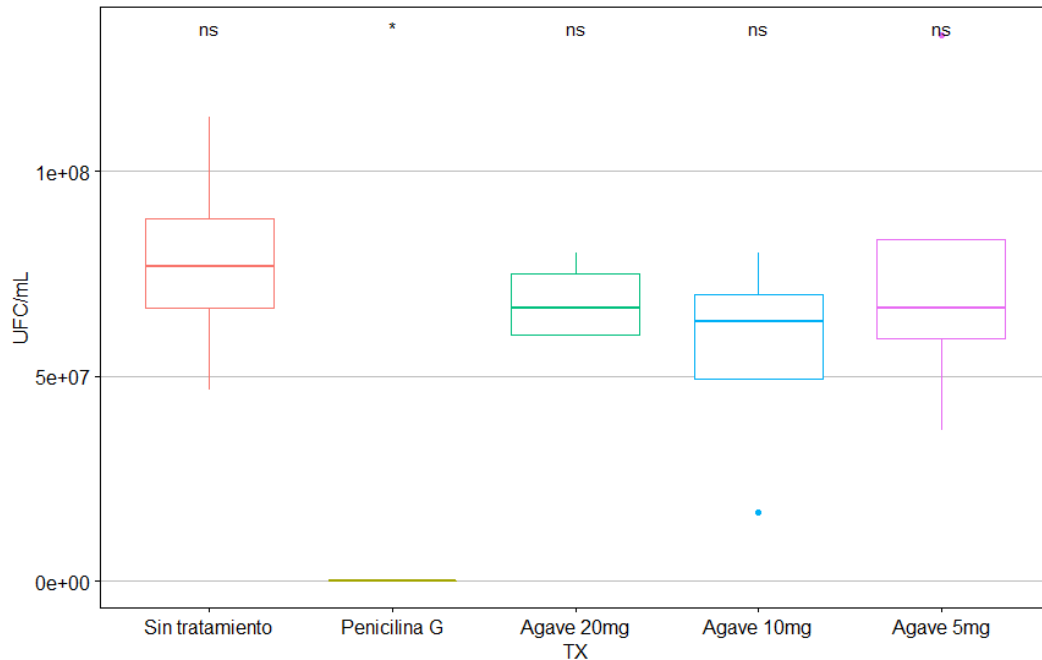
P= penicilina G, Cp= ciprofloxacina, T= tetraciclina, G= gentamicina, N=Neomicina y SXT= sulfametoxazol-trimetoprim, CTX= cefotaxima. S= sensible, I= intermedio, R= resistente y NP= no probado.

## Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias

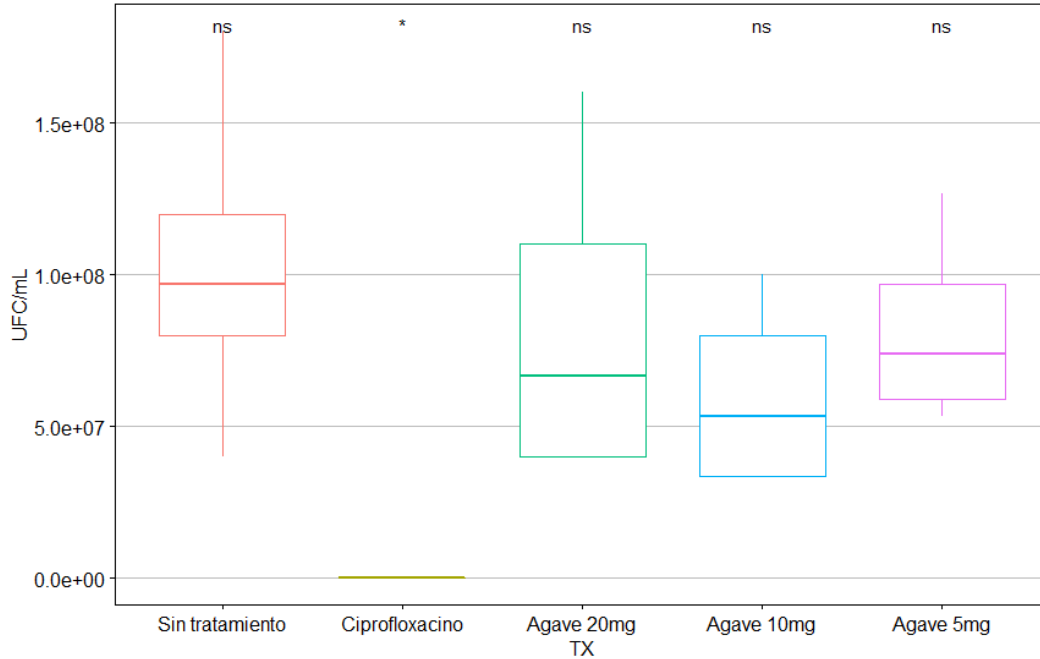
### Bacterias

En el caso de *S. agalactiae* no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el testigo sin tratamiento (Stx) con  $7.6 \times 10^7$  UFC/mL y los grupos de extracto de *Agave* en los

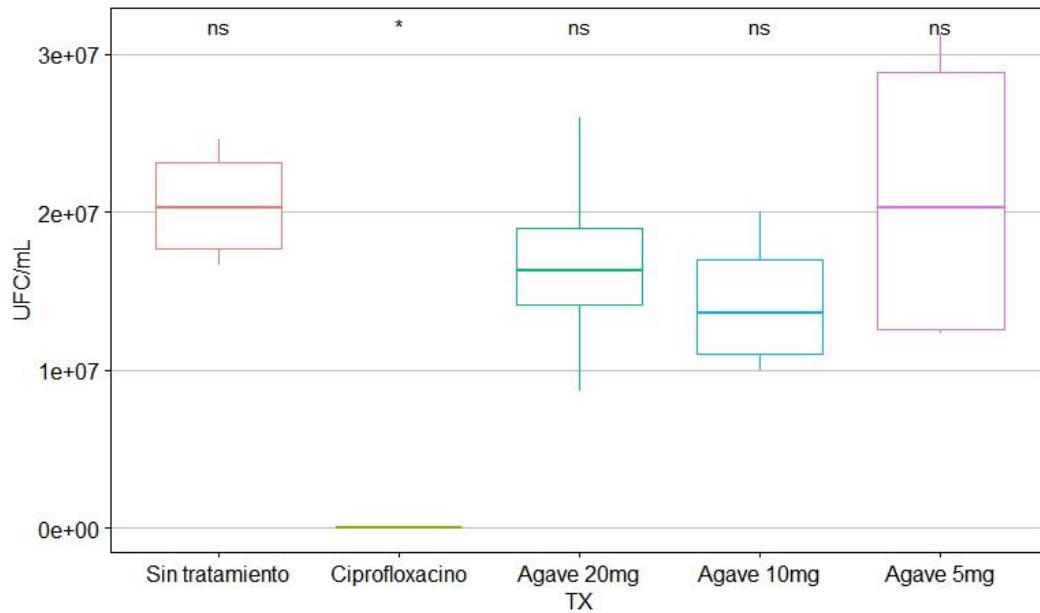
que el rango de UFC/mL es de  $6.6-6.3 \times 10^7$ . En el grupo Penicilina G no hubo crecimiento bacteriano (*Gráfica 1*). Algo muy similar sucedió con el resto de las bacterias, no hay diferencia estadística entre el grupo control Stx y los tres de *Agave*, pero si la hay comparados con el grupo al que se le administró el antibiótico (*Gráficas 2-4*), lo que indica que el extracto no disminuyó el crecimiento de las bacterias. En el grupo Stx de *S. aureus* se contaron  $9.6 \times 10^7$  UFC/mL, en *Agave* 20 mg  $6.6 \times 10^7$  UFC/mL, en *Agave* 10 mg  $5.3 \times 10^7$  UFC/mL y en *Agave* 5 mg  $7.3 \times 10^7$  UFC/mL. Los datos obtenidos para *B. bronchiseptica* son Stx  $2 \times 10^8$  UFC/mL, *Agave* 20 mg  $1.6 \times 10^8$  UFC/mL, *Agave* 10 mg  $1.3 \times 10^8$  UFC/mL y *Agave* 5 mg  $2 \times 10^8$  UFC/mL. Los datos de *P. aeruginosa* son Stx  $1.6 \times 10^8$  UFC/mL, *Agave* 20 mg  $1.4 \times 10^8$  UFC/mL, *Agave* 10 mg  $1.6 \times 10^8$  UFC/mL y *Agave* 5 mg  $1.6 \times 10^8$  UFC/mL.



**Gráfica 1** Comparación entre los diferentes tratamientos vs *Streptococcus agalactiae*. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis donde  $p=0.03926$ . ns= no significativo, \* significativo a una  $p < 0.05$ , \*\* significativo a una  $p < 0.01$ . Se realizaron cuatro ensayos independientes para la obtención de las UFC.

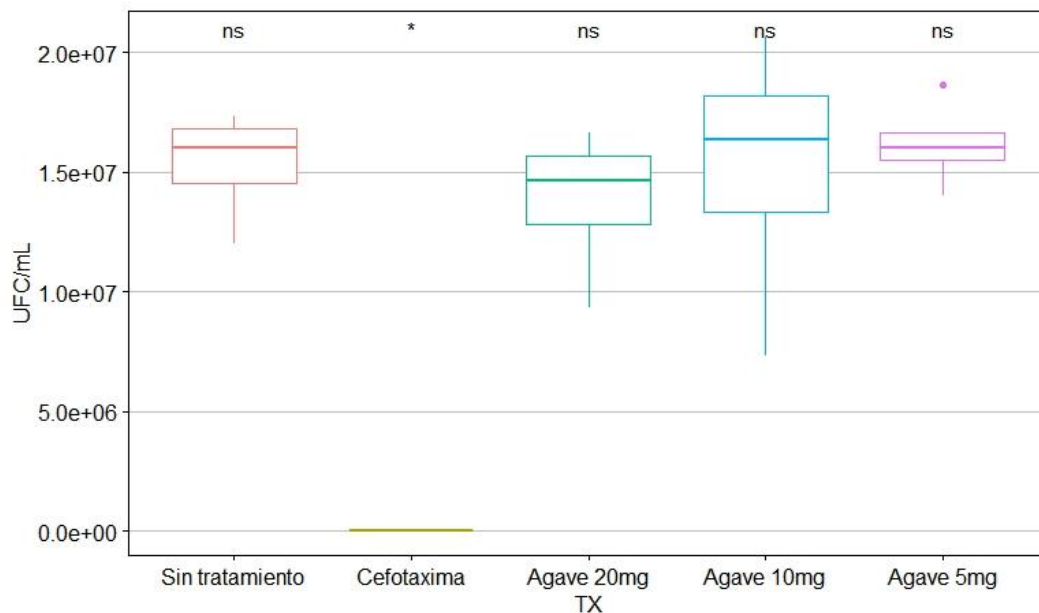


**Gráfica 2 Comparación de los diferentes tratamientos vs *Staphylococcus aureus*.** Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis donde  $p=0.03046$ . ns= no significativo, \* significativo a una  $p < 0.05$ , \*\* significativo a una  $p < 0.01$ . Se realizaron cuatro ensayos independientes para la obtención de las UFC.



**Gráfica 3 Comparación de los tratamientos vs *Bordetella bronchiseptica*.** Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis donde  $p=0.02436$ . ns= no significativo, \* significativo a una  $p < 0.05$ , \*\* significativo a una  $p < 0.01$ . Se realizaron cuatro ensayos independientes para la obtención de las UFC.

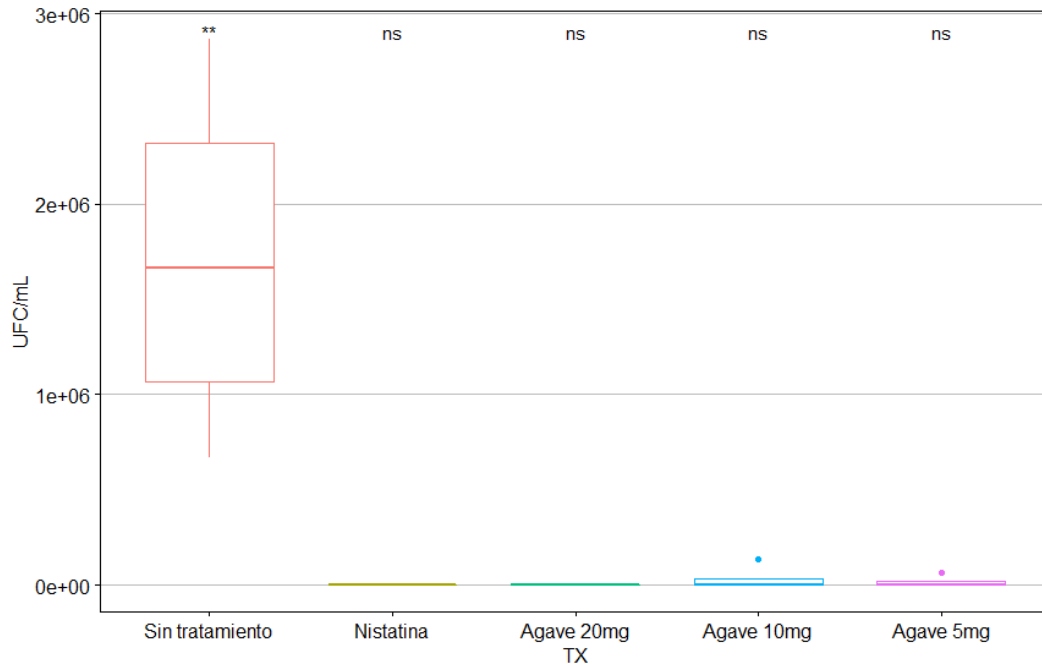




*Gráfica 4 Comparación de los diferentes tratamientos vs Pseudomonas aeruginosa. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis donde  $p = 0.03882$ . ns= no significativo, \* significativo a una  $p < 0.05$ , \*\* significativo a una  $p < 0.01$ . Se realizaron cuatro ensayos independientes para la obtención de las UFC.*

### Levadura

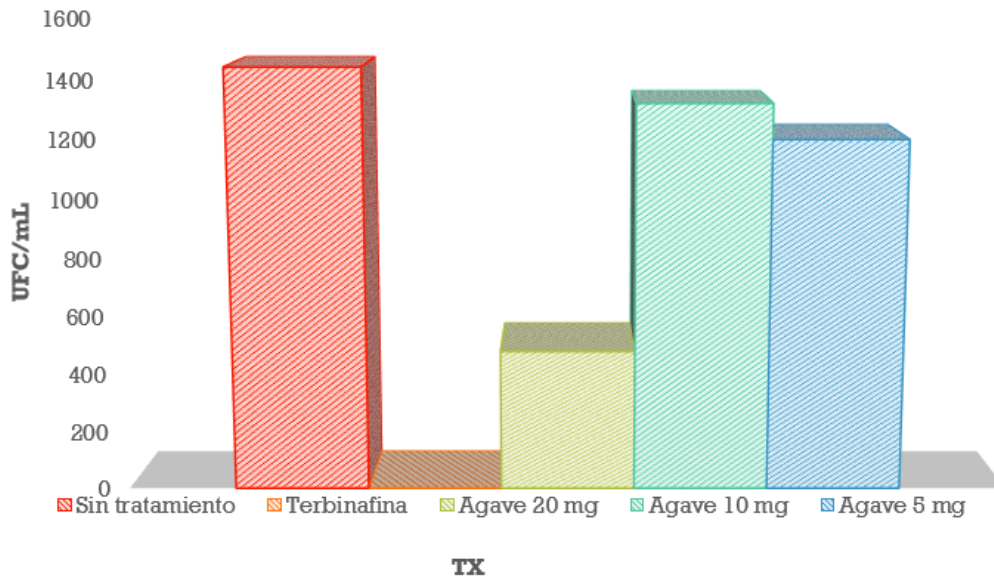
Los resultados obtenidos de *C. albicans* se puede observar una diferencia significativa entre el testigo sin tratamiento con  $1.6 \times 10^6$  UFC/mL y los tres grupos de Agave (20, 10 y 5mg) en los que no hay conteo de UFC, al igual que en el grupo con Nistatina en el que no hubo crecimiento; No hay diferencia estadística entre los grupos Nistatina y los tres de Agave. (Gráfica 5)



*Gráfica 5 Comparaciones entre los diferentes tratamientos vs Candida albicans. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis donde  $p=0.005613$ . ns= no significativo, \* significativo a una  $p < 0.05$ , \*\* significativo a una  $p < 0.01$ . Se realizaron cuatro ensayos independientes para la obtención de las UFC.*

### Hongo dermatofito

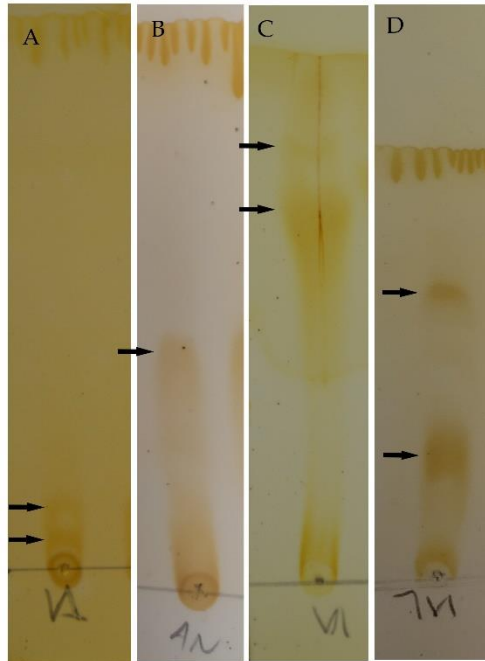
Los resultados mostraron un conteo de 1440 UFC/mL en el testigo sin tratamiento, en Agave 20mg 480 UFC/mL, un conteo menor comparado con el grupo anterior, sin embargo, los conteos en Agave 10 y 5 mg las UFC/mL (1320 y 1200) son parecidas entre sí y se acercan mucho al número obtenido en el testigo sin tratamiento, no se observó crecimiento con la terbinafina. (Gráfica 6)



*Gráfica 6 Comparación entre los diferentes tratamientos vs T. mentagrophytes. No se realizó análisis estadístico al no contar con más repeticiones.*

### Cromatografía en capa fina

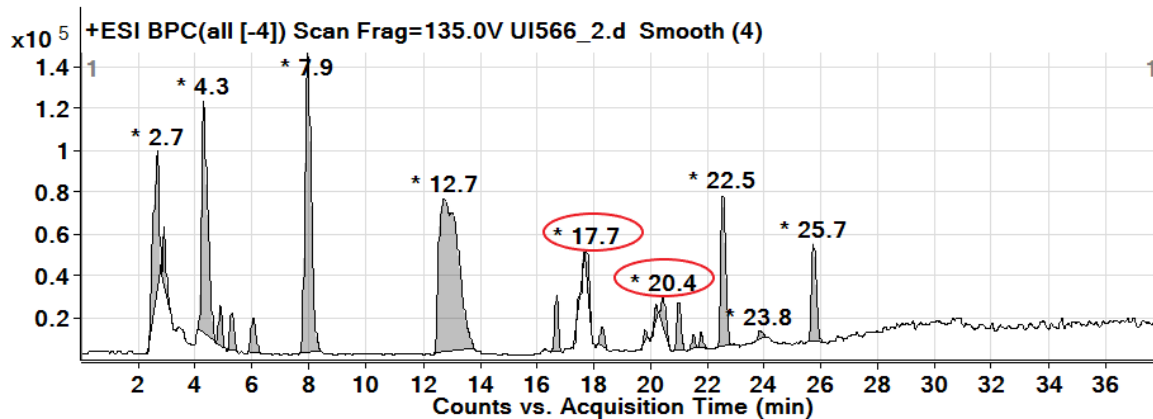
En las siguientes imágenes se demuestra la separación de los compuestos con la presencia de bandas a diferentes niveles de la placa según la fase móvil utilizada. Teniendo 5 bandas diferentes que corresponden a saponinas en tres de las placas (*Imagen 3 A-C*) y dos bandas para fructanos en una placa (*Imagen 3 D*).



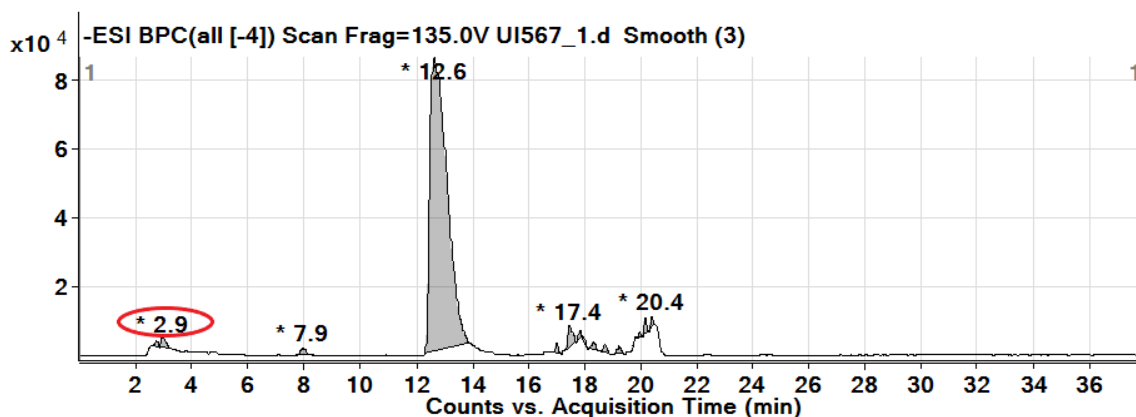
*Imagen 3 Placas de sílica de las TLCs realizadas. Las flechas señalan las bandas que corresponden a los compuestos separados. En la imagen A las flechas señalan dos compuestos separados por la mezcla de Tolueno: acetato de etilo: metanol. En la Imagen B se observa una banda ancha, la mezcla de solventes fue butanol: agua: ácido acético. La imagen C muestra las bandas separadas por la mezcla cloroformo: metanol: agua. En A, B y C las bandas corresponden a saponinas. Para la placa D se usó butanol: metanol: agua: ácido acético; las flechas señalan dos bandas obtenidas que corresponden a fructanos.*

### Cromatografía líquida de alta eficiencia-espectrometría de masas

En los cromatogramas se observan múltiples picos que corresponden a los diferentes compuestos separados del extracto hidrosoluble de *Agave*. Cada pico se relaciona con los espectros de masas de acuerdo al minuto que se detectaron, al comparar las masas con lo reportado con diversos autores se determinó la presencia de saponinas, picos señalados por los números 17.7 y 20.4 y posiblemente también los picos alrededor de éstos y fructanos, pico del min 2.9. (Imagen 4-5)

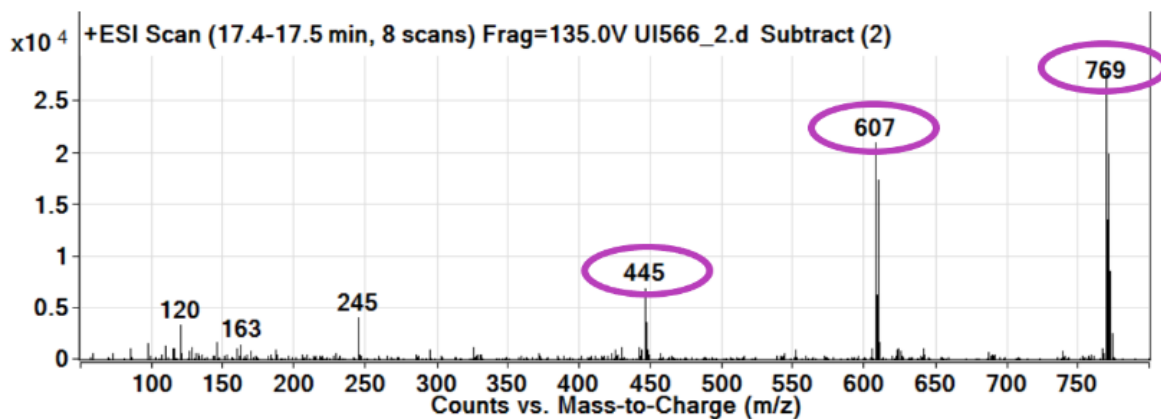


*Imagen 4 Cromatograma del EHA (ESI+). Los picos corresponden a los diferentes compuestos separados por el HPLC, los círculos demarcan el minuto al cual se detectó uno que pueden corresponder a las saponinas.*



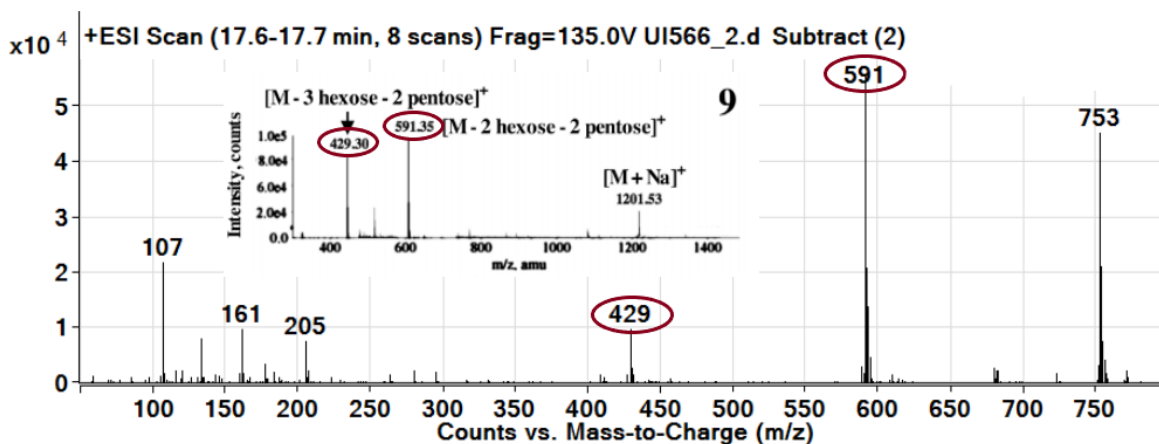
*Imagen 5 Cromatograma del EHA (ESI-). El círculo demarca el minuto al cual se detectó un fructano uno de los compuestos sugeridos.*

De acuerdo con los patrones de masas encontradas en el análisis y al hacer la comparación con lo reportado por Leal M *et al*, Santos L *et al* y Figueroa L *et al* (35–37), se sugiere que las saponinas esteroidales presentes podrían corresponder al agavósido C (detectado al min 17.7), cantalosaponina 4 (detectada al min 20.4), gentrogenina tetraglicosidada, glicósido de kamogenina, magueyosido H y A o B. (Imagen 6-10). También podría estar presente la inulina que es un fructano, debido a las coincidencias en las masas comparadas de acuerdo con lo encontrado por Trytek *et al* (38). (Imagen 11)

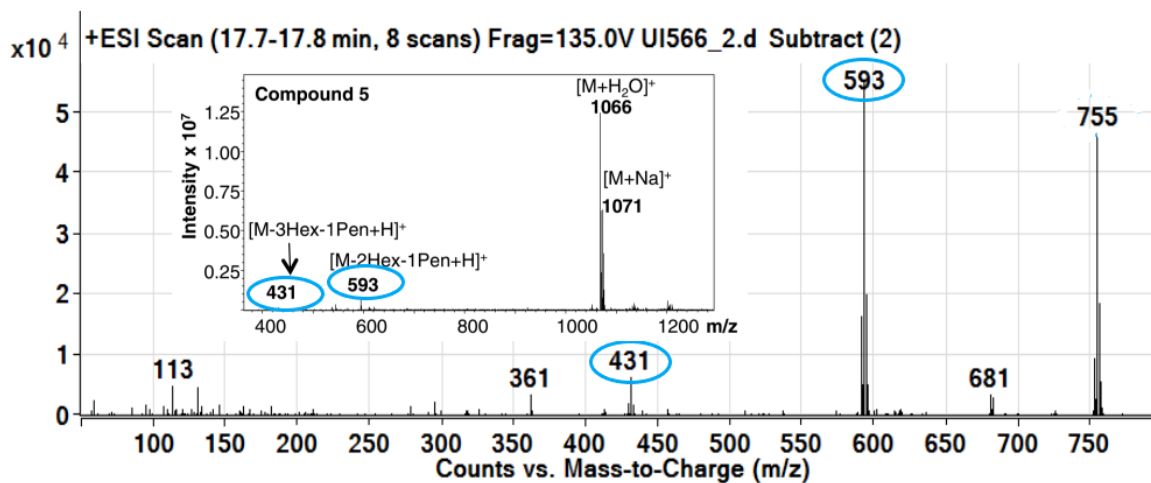


Compound	Suggested Compounds	Accurate Mass	<i>m/z</i>
2	Magueyoside A	1194.48	445.29 M-3Hex-2Pen + H) <sup>+</sup> , 607.34 M-2Hex-2Pen + H) <sup>+</sup> , 769.35 M-1Hex-2Pen + H) <sup>+</sup> , 1217.51 (M + Na) <sup>+</sup>
	Magueyoside B	1062.44	445.29 M-3Hex-1Pen + H) <sup>+</sup> , 607.34 M-2Hex-1Pen + H) <sup>+</sup> , 769.36 M-1Hex-1Pen + H) <sup>+</sup> , 1085.48 (M + Na) <sup>+</sup>
4	Kammogenin glycoside 1 (KG1)	1092.44	445.29 M-4Hex + H) <sup>+</sup> , 607.34 M-3Hex + H) <sup>+</sup> , 769.36 M-2Hex + H) <sup>+</sup> , 931.40 (M-1Hex + H) <sup>+</sup> , 1115.51 (M + Na) <sup>+</sup>
	Kammogenin glycoside 2 (KG2)	1224.48	445.29 (M-4Hex-1Pen + H) <sup>+</sup> , 607.34 (M-3Hex-1Pen + H) <sup>+</sup> , 769.36 (M-2Hex-1Pen + H) <sup>+</sup> , 1247.47 (M + Na) <sup>+</sup>

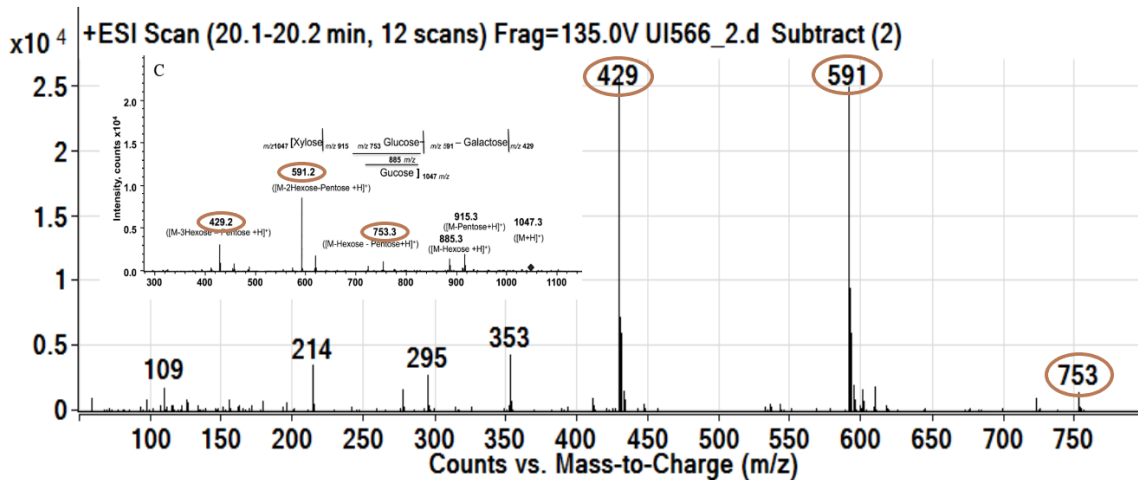
*Imagen 6 Espectro de masas min 17.4-17.5. Comparación de m/z dónde observamos las m/z 445, 607 y 769 de acuerdo al cuadro modificado de Figueroa L et al. (2017) están presentes tanto en dos tipos de Magueyosidos (A y B) y en dos tipos de glucósidos de Kamogenina.*



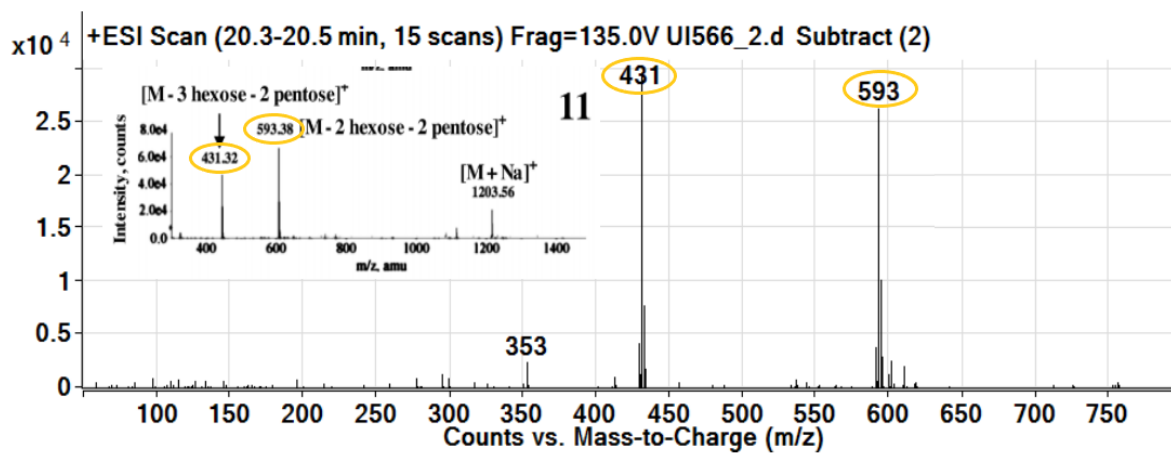
*Imagen 7 Espectros de masa min 17.6-17.7. La comparación de los espectros de masas demuestra una coincidencia de las m/z 429 y 591 (círculos color vino) de acuerdo con Leal A et al. (2015) las m/z corresponden a un compuesto denominado Magueyosido H*



*Imagen 8 Espectros de masas min 17.7-17.8. La comparación de los espectros de masas 431 y 593 m/z (círculos azules) del HPLC-MS sugieren una coincidencia con lo reportado por Santos L, et al. (2016) que identificaron al compuesto como Agavósido C (imagen pequeña)*

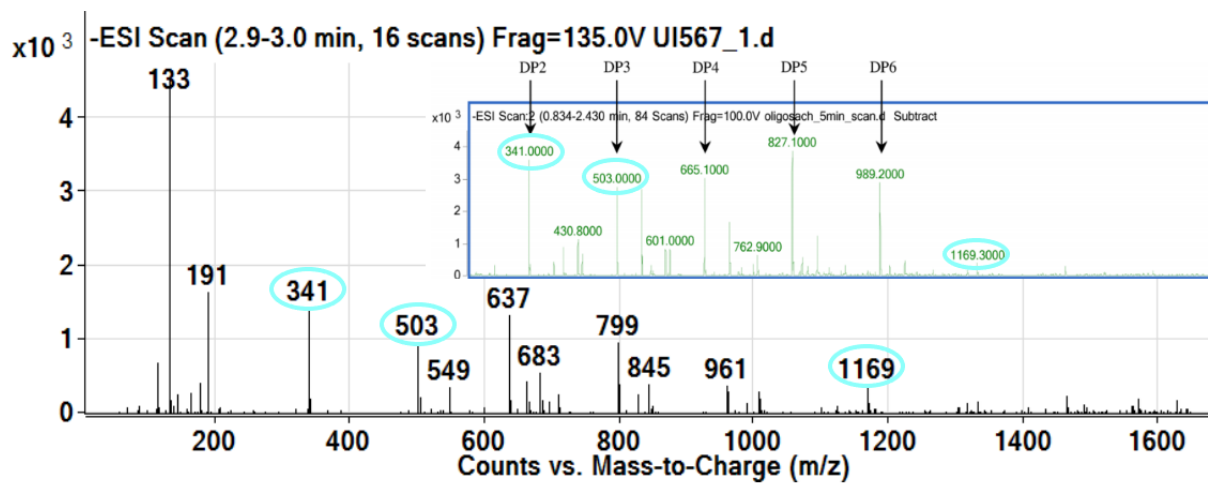


*Imagen 9 Espectros de masas min 20.1-20.2. Las m/z 429, 591 y 753 (círculos) se encuentran en ambos análisis al compararlos, de acuerdo con lo reportado por Leal A et al. (2015) material suplementario, corresponde a una Gentrogenina tetraglicosidada.*



*Imagen 10 Espectros de masas min 20.3-20.5. Comparación de los espectros de masas dónde observamos las coincidencias en las m/z 431 y 593 (círculos amarillos) sugiriendo la presencia de Cantalasonina 4 de acuerdo con Leal A, et al. (2015).*





*Imagen 11 Espectros de masas min 2.9-3. Las m/z 341, 503 y 1169 de acuerdo con Trytek M et al. (2015) corresponden a la inulina, en ambos análisis están presentes por lo que se sugiere su presencia en el extracto.*

## DISCUSIÓN

La susceptibilidad de *C. albicans* a extractos de agaves ya ha sido documentada; en tres estudios diferentes se usó el extracto de *A. sisalana*, de acuerdo con Ade-Ajayi *et al.* la MIC corresponde a 20 mg/mL y la MBC de 40mg/mL al probar extracto metanólico (20), Hammuel *et al.* reportaron que la MIC correspondía a 20 mg/mL y la MBC a 40 mg/mL extracto acuoso (39); por otro lado, Santos *et al.* señalan que la MIC es de 0.39 mg/mL y las zonas de inhibición del crecimiento fueron de 18 y 19 mm al utilizar un extracto crudo e hidroalcohólico (40). Verástegui *et al.*, al usar el extracto de *A. lechuguilla* obtuvieron una MIC de 4 mg/mL (41). Los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con lo ya reportado por Ade-Ajayi *et al.* y Hammuel *et al.*; ya que, a las concentraciones de 5, 10 y 20 mg/mL del extracto hidrosoluble de *A. mapisaga* se observó un efecto inhibitorio del crecimiento de la levadura. Sin embargo, el hecho que Santos *et al.* encontraron una concentración mucho menor dónde se viera un efecto, discrepa con otros autores e incluso con este estudio, lo cual pudo deberse al método de extracción utilizado y al tipo de solvente empleado ya que los diferentes compuestos contenidos serán atraídos o solubilizados mejor por unos solventes, de esta manera habrá mayor cantidad de unos compuestos que otros.

Verástegui M *et al.* y Rizwan *et al.* reportan un efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos filamentosos al obtener la MIC (3.0- 27.5 mg/mL), utilizando extractos de *A. lechuguilla*, *A. picta*, *A. scabra*, *A. lophanta* y *A. Attenuata* (41–43). A pesar de que en este trabajo no se pudo repetir la prueba con el hongo dermatofito, se muestra una reducción de UFC/mL a una concentración de 20 mg/mL, por lo que sería recomendable repetir este ensayo para determinar su efecto mediante un análisis estadístico.

Por otra parte, está documentado el efecto antifúngico de las saponinas presentes en los Agaves que se han estudiado, éstas se probaron ante hongos filamentosos y levaduras, en los que se reportó una reducción del micelio en hongos filamentosos y halos de inhibición en levaduras (44–46) por lo cual se puede deducir que el efecto observado en *C. albicans* podría deberse a las saponinas, uno de los compuestos encontrados en el EHA con los estudios cromatográficos empleados (HPLC-MS y TLC).

Las saponinas están compuestas de manera general por una parte glúcida (cadenas de azúcares) y una no glúcida (sapogenina, genina o aglicona) las cuales le otorgarán características anfifílicas, la parte glúcida es la región hidrofílica y por el contrario la aglicona es hidrófoba. Esto le confiere a la aglicona la capacidad de unirse de manera espontánea con el colesterol de la membrana plasmática formando complejos, que se van acumulando para dar origen a placas. Las propiedades estéricas de estos compuestos pueden provocar la curvatura de la membrana, detenerse en ese momento o bien podría resultar en la formación de una estructura vesicular o de un poro debido a la interacción de los restos de azúcares, con el consecuente incremento de la permeabilidad de la membrana, salida de iones y macromoléculas. Dichas perturbaciones o la formación del poro pueden darse en paralelo y el tipo de saponina será lo que determine qué perturbación predomine (47).

Se tiene evidencia de que la estructura de las saponinas es de gran relevancia, dependiendo del tipo de aglicona y la cadena de azúcares con las que cuenta, habrá un efecto biológico diferente. Por ejemplo, se ha reportado que con cadenas de azúcares menores a cuatro unidades pierde su actividad antifúngica cuando la aglicona es una hecogenina. También se sabe que ciertas agliconas tienen un efecto antifúngico como la hecogenina, neohecogenina, tigogenina, neotigogenina, clorogenina y diosgenina (48). De acuerdo a lo anterior si se caracterizara el EHA y se determinara la presencia del agavósido C y cantalasaponina-4, compuestos que tienen como aglicona a la hecogenina sería congruente con el efecto observado en la levadura (35). Además, podríamos suponer que el mecanismo de acción sería similar a lo que describe Alcázar E (2016) en su trabajo doctoral, donde halló que al adicionar extracto de *A. duranguensis* y *A. salmiana* a *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* se generan invaginaciones y ruptura de la pared celular producto de la acción de las saponinas (agavósido A y B, cantalasaponina N, otras saponinas no identificadas con agliconas gentrogenina y manogenina). Se observó que con la adición de estos extractos se disminuyen los  $\beta$  glucanos y mananos, los  $\beta$  glucanos son los componentes estructurales de mayor proporción de la pared celular, por lo que al observar dicha reducción se dedujo que la parte glúcida de la saponina interactúa con éstos generando una ruptura de los polímeros. Aunado a lo anterior, en el mismo estudio se observó que los fosfolípidos de la membrana

también se ven afectados al reducir las cadenas acilo y aumentar la insaturación, lo que genera un aumento de la permeabilidad. Ambos cambios favorecerían la interacción saponina-ergosterol para la formación de poros y por tanto la inhibición del crecimiento o a la muerte de la levadura (45). Aun cuando falta más información acerca de si todas las saponinas con aglicona hecogenina tienen el mismo mecanismo de acción se puede sugerir este efecto fungicida en el EHA; sin embargo, sería necesario corroborarlo.

A pesar de no haber encontrado a los flavonoides no podemos descartar su presencia ya que en la literatura se describe que son metabolitos muy frecuentes en las plantas y se han reportado algunos tipos en los Agaves (18). Además, se ha demostrado que tienen un efecto antifúngico el cual también podría estar relacionado con el hallazgo de este trabajo, algunos estudios describen que el mecanismo de acción implicado en cierto tipo de flavonoides es aumentar el  $Mg^{2+}$  intracelular lo cual provoca un incremento en el  $Ca^{2+}$  de la mitocondria, esto conlleva una disfunción mitocondrial incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno y la despolarización de la membrana mitocondrial, interrupción del sistema antioxidante, daño al ADN y apoptosis (49).

Por otro lado, Ade-Ajayi *et al.* y Hammuel *et al.* reportan la susceptibilidad de *S. dysenteriae*, *B. atrophaeus*, *P. aeruginosa*, *E. fecalis*, *S. aureus*, *S. typhi*, *E coli* y *S. pyogenes* al utilizar el extracto metanólico y acuoso de *A. sisalana* (20,39). Por el contrario, Verástegui *et al.* (1996, 2008), López-Romero *et al.*, Ahumada-Santos *et al.* y Rojas J (2017) obtienen resultados muy variables, y en algunos casos no todas las bacterias utilizadas son susceptibles a los extractos. Por ejemplo, Verástegui *et al.* prueban 4 especies diferentes de Agaves, de los cuales solo una especie (*A. picta*) muestra un efecto inhibitorio en el crecimiento de 4 bacterias de las 6 probadas y Ahumada-Santos *et al.* seleccionan 6 especies, todas tienen un efecto inhibitorio, pero éste varía de acuerdo a la bacteria, las más susceptibles a los extractos probados fueron *Streptococcus* grupo A-4 y *S. dysenteriae*. Incluso cuando sólo se trabaja con una especie de Agave no todas las bacterias muestran susceptibilidad como lo refieren Verástegui *et al.*, López-Romero *et al.* y Rojas J (2017) al utilizar extractos de *A. angustifolia* y *A. duranguensis* (41,43,50–52). Aun cuando hay evidencia de la susceptibilidad por parte de las bacterias a diferentes extractos, Santos J. *et al.* reportan no haber encontrado

susceptibilidad en ninguna de las bacterias al utilizar el extracto de *A. sisalana* (40). De manera similar en este ensayo no se encontró un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano debido a que no se halló una disminución significativa en el número de UFC comparado con el control.

El hecho de que en algunos casos y en otros no se haya encontrado un efecto de inhibición en el crecimiento bacteriano puede deberse a diferentes causas como la especie de Agave utilizada o el método de extracción, ya que dependiendo de si es un extracto acuoso, metanólico u de otro tipo habrá diferencias en cuanto a su actividad antimicrobiana (20,39,42). Otro factor podría ser la concentración del extracto usada, en los diversos estudios mencionados la variabilidad de concentraciones es muy grande aun cuando se trata de la misma especie de Agave. También los compuestos y las cantidades presentes de éstos, ya que de acuerdo a la edad, clima, tipo de suelo, entre otros, van cambiando los requerimientos de la planta (45,53).

En el análisis del extracto de *A. mapisaga* utilizado en este estudio se encontró la presencia de fructanos. El efecto biológico más estudiado es como prebiótico e inmunomodulador (54), sin embargo, Martínez A *et al.* reportaron que al agregar cantidades crecientes de fructanos provenientes de Agave había un crecimiento menor de *Salmonella enterica* serovar *thypimurium* cuando se realizaron curvas de crecimiento, también observaron que los halos de inhibición eran dependientes de la concentración (55). No obstante, este hallazgo, se requiere más información para determinar la posible actividad antibacteriana de los fructanos y si estuvieron relacionados con el efecto antifúngico que se observó en este trabajo.

## CONCLUSIONES

El extracto de *Agave mapisaga* inhibe el crecimiento de *C. albicans* y también el de *T. mentagrophytes*. Dicho efecto se puede deber a la presencia de saponinas en el EHA.

El extracto de *A. mapisaga* no tiene efecto un efecto inhibitorio frente a las bacterias utilizadas en este ensayo: *S. aureus*, *B. bronchiseptica*, *S. agalactiae* y *P. aeruginosa*.

No se pudo caracterizar el tipo de saponinas presentes en el EHA al faltar los estándares y otras pruebas como IR o RMN. Sin embargo, lo encontrado podría orientar su caracterización en futuros estudios.

## PROSPECTIVA

Probar el EHA con otras levaduras de interés médico veterinario como *Cryptococcus* spp, y *Malassezia* spp.

Robustecer la evidencia frente al hongo dermatofito que se usó en este ensayo y probar el efecto del EHA contra otros hongos filamentosos.

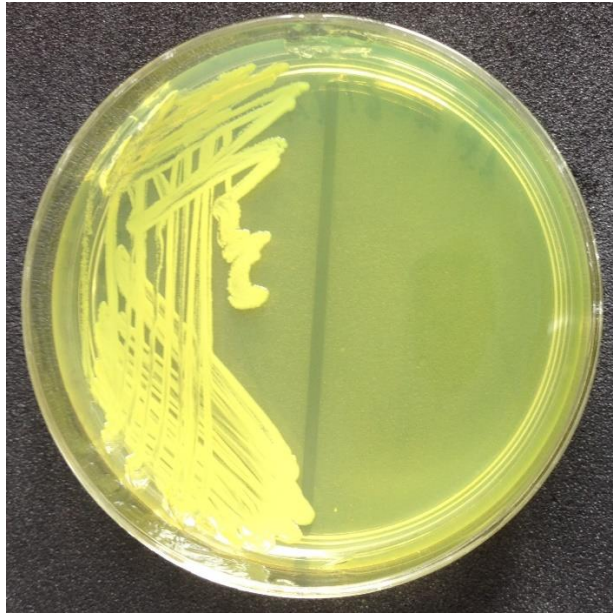
Llevar a cabo pruebas *in vivo* en pacientes con candidiasis para complementar los estudios que pudieran justificar su uso como una opción terapéutica.

Realizar otro HPLC-MS con los estándares requeridos para hacer la caracterización de los compuestos identificados en el extracto de Agave.

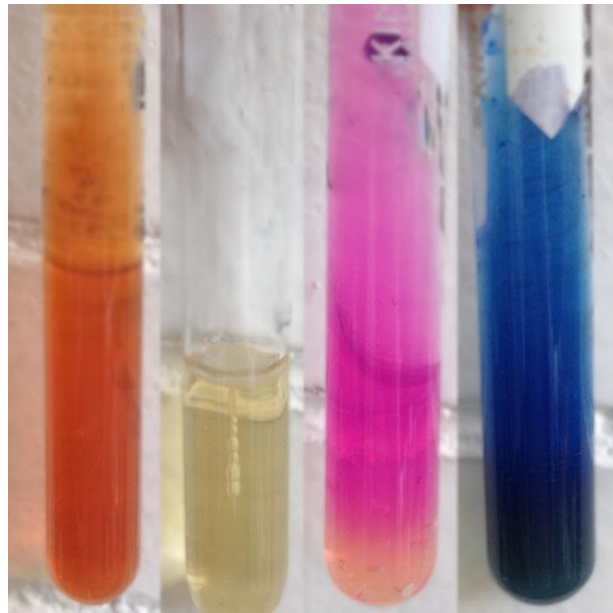
Buscar la presencia de flavonoides en el EHA y caracterizarlos.

Aislar los compuestos presentes en el EHA y probar sus efectos biológicos en comparación a productos comerciales similares.

## ANEXO DE IMÁGENES



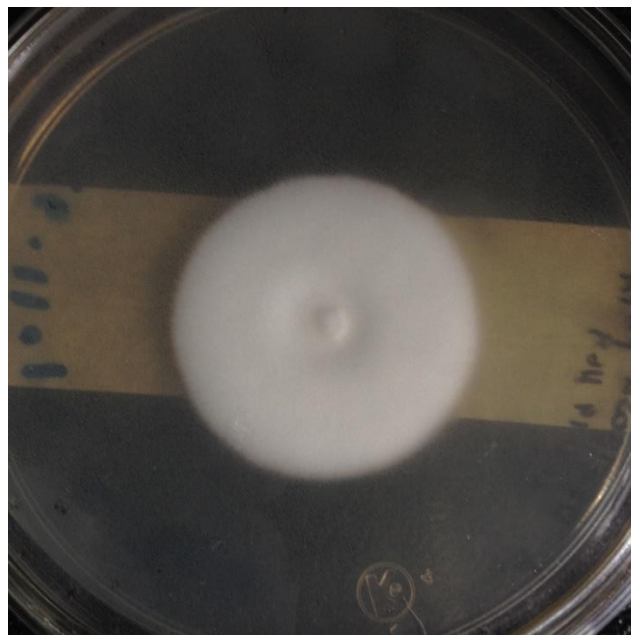
*Imagen 12 Siembra en agar P de S. aureus 24 horas de crecimiento*



*Imagen 13 Pruebas bioquímicas de B. bronchiseptica. TSI, SIM, urea y citrato respectivamente (comenzado de izquierda a derecha)*

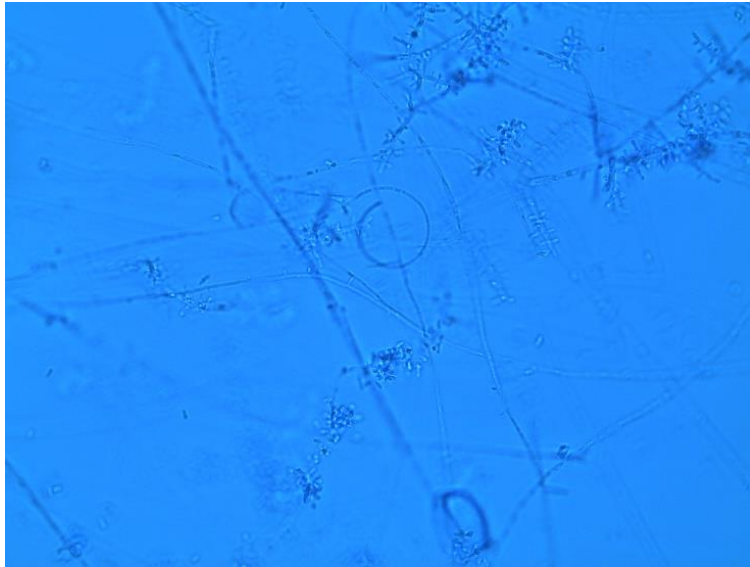


*Imagen 14 Pruebas bioquímicas de P. aeruginosa. TSI, SIM, urea y citrato respectivamente (comenzado de izquierda a derecha)*

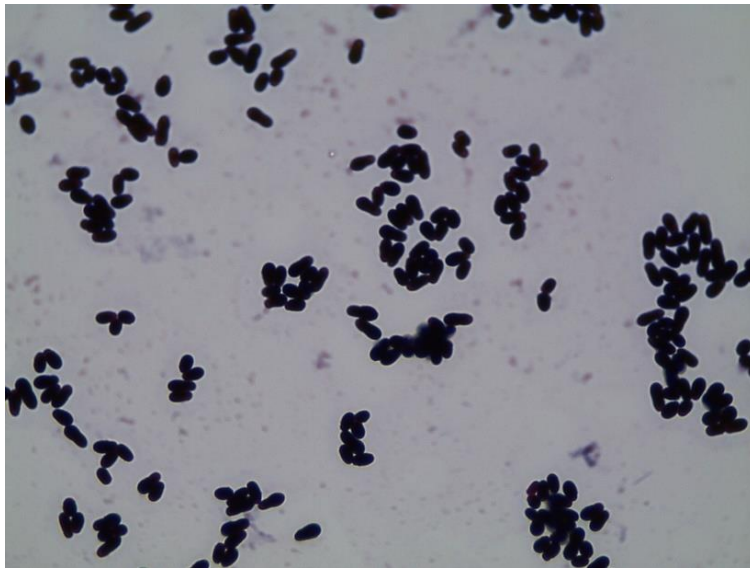


*Imagen 15 Colonia de T. mentagrophytes sembrado en SDA con 7 días de crecimiento*





*Imagen 16 Morfología microscópica de T. mentagrophytes teñido con azul de algodón lactofenol, 10 días de crecimiento, objetivo 40X.*



*Imagen 17 Tinción de Gram de C. albicans, objetivo 100x*



*Imagen 18 Tubo germinal C. albicans. Objetivo 40X*



*Imagen 19 Antibiograma de S. aureus. 1=sulfametoxazol-trimetoprim, 2= penicilina G, 3=ciprofloxacino, 4= gentamicina, 5= tetraciclina, 6= neomicina.*

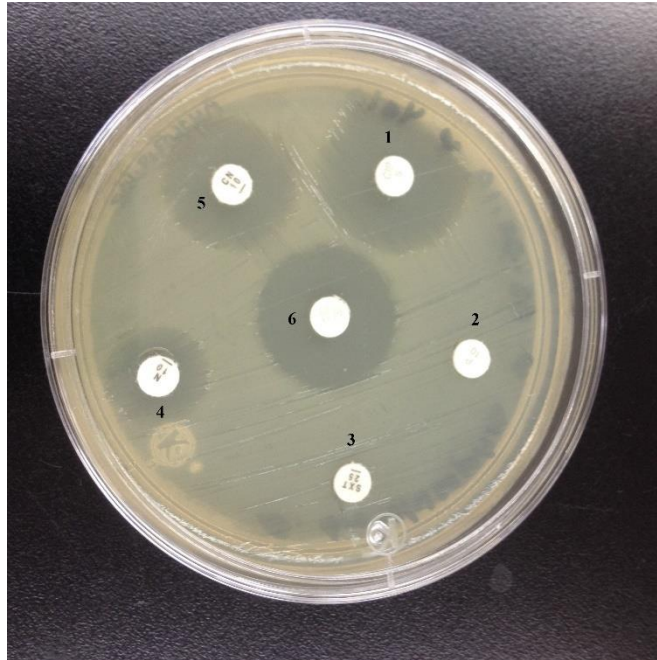


Imagen 20 Antibiograma de *B. bronchiseptica*. 1= ciprofloxacino, 2= penicilina G, 3= sulfametoxazol-trimetoprim, 4= neomicina, 5= gentamicina, 6= tetraciclina.

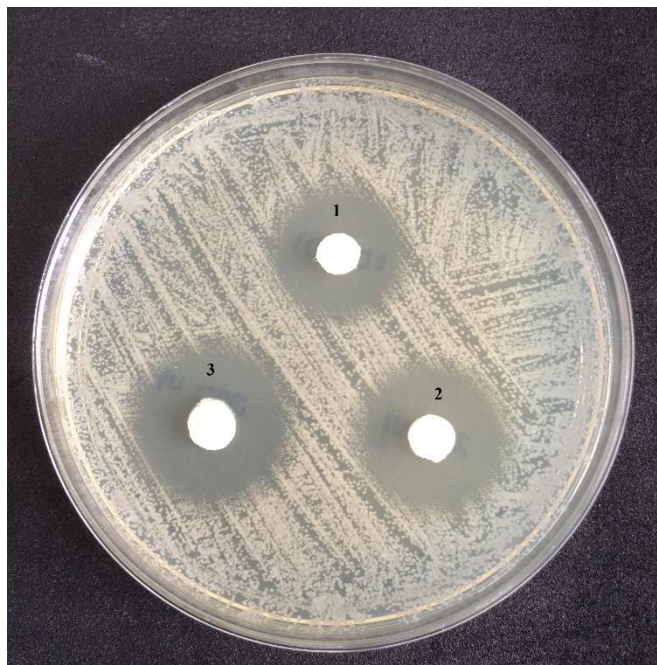
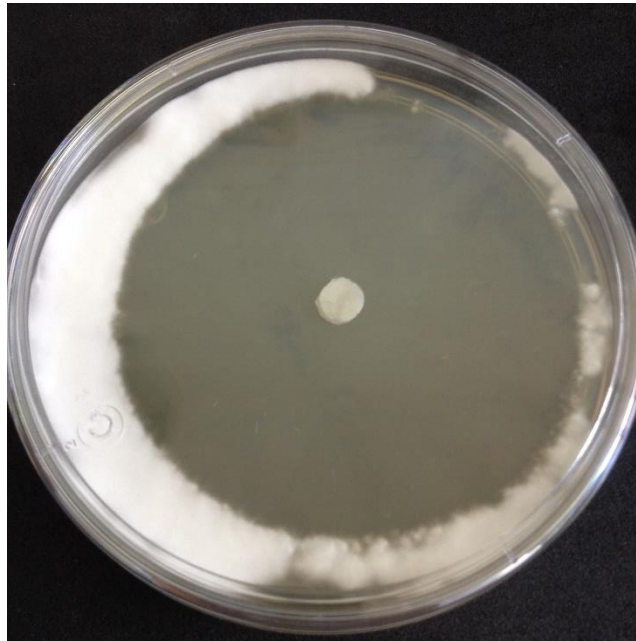
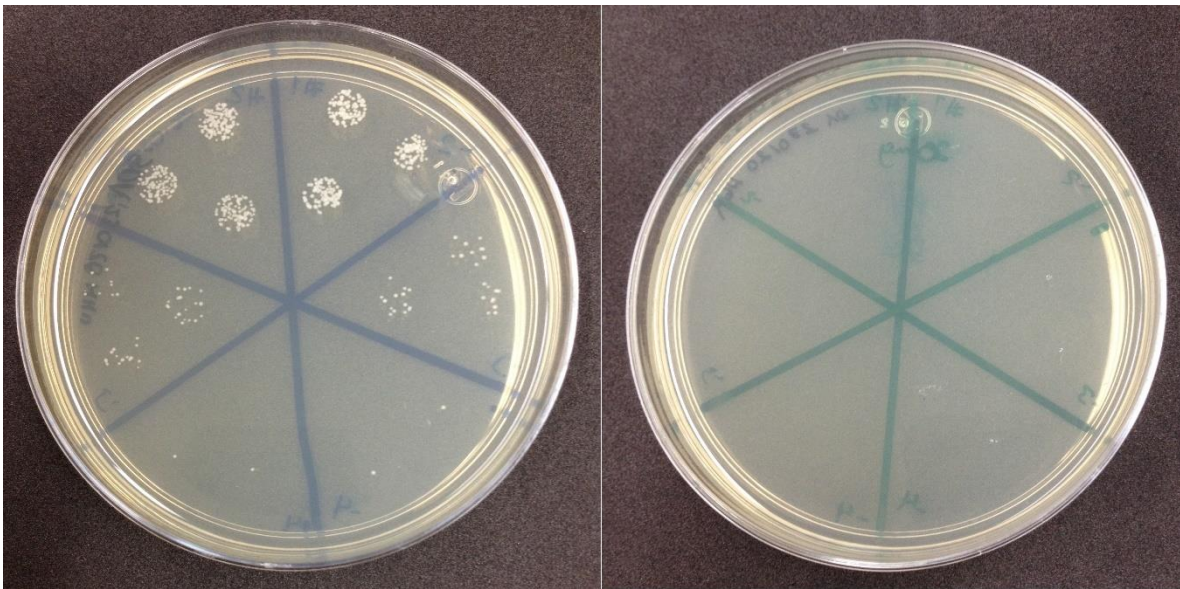


Imagen 21 Antibiograma de *C. albicans*. Antifúngico probado Nistatina 1=100 UI, 2= 200 UI, 3=300 UI



*Imagen 22 Antibiograma T. mentagrophytes. Disco de terbinafina 1µg*



*Imagen 23 Conteo de UFC de C. albicans caja STX y Agave 20 mg respectivamente, diluciones -4 a -6 de arriba hacia abajo y su repetición.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional: definiciones [Internet]. [cited 2019 Apr 5]. Available from: [https://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
2. Organización Mundial de la Salud. Medicina Tradicional – Necesidades Crecientes y Potencial. World Heal Organ. 2002;2:1–6.
3. Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Rev Mex Ciencias Farm. 2010;41(4).
4. Organización Panamericana de la Salud. Medicina Natural y Tradicional [Internet]. [cited 2019 Apr 6]. Available from: <https://www.paho.org/cub/dmdocuments/Fitoterapia.pdf>
5. Zambrana T. Beneficios de la fitoterapia. Rev Cuba Plantas Med. 2005;10(2):0–0.
6. Maridass M, De Britto AJ. Origins of Plant Derived Medicines. Ethnobot Leaflet. 2008;12:373–87.
7. Muhammad Sajid, Hamid Akash; Kanwal R. Essentials of Pharmaceutical Analysis. Singapore: Springer Nature Singapore; 2020. 222 p.
8. Sajewicz M, Kowalska T, Sherma J. Sample preparation for thin layer chromatography. Adv Chromatogr. 2017;53:301–29.
9. Polo Díez LM. Fundamentos de Cromatografía. España: Dextra Editorial S.L; 412 p.
10. Groos J. Mass spectrometry. 3rd ed. Switzerland: Springer Nature Singapore; 2017. 986 p.
11. Östman M. Antimicrobials in sewage treatment plants. 2018. 77 p.
12. Ayala Bretón C, de Regil Hernández R. Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. Cuernavaca, Morelos; 2004.
13. Plascencia Villa G. Espectrometría de masas. Universidad Nacional Autónoma de

- México; 2003.
14. Alvarez C, Garduno M, Guerrero M, Martinez AM, Miller B, Zavala R. Medicina tradicional. Rev Col Nac Enferm. 1979;26(104):23–9.
  15. CONABIO. Capital natural y bienestar social. CONABIO. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; 2006. 7–31 p.
  16. Ayón Peña Y. Estudio Etnofarmacológico de las diferentes especies endémicas de Agave en la medicina tradicional del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2007.
  17. García Mendoza A. Los agaves de México. Ciencia. 2007;(87):14–23.
  18. López-Romero JC, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA, Peña-Ramos EA, González-Ríos H. Biological activities of Agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. J Sci Food Agric. 2018;98(7):2461–74.
  19. Rojas A, Solano L, Porfirio J, Pérez R, Enrique J, Mexicana RF, et al. Diversidad genética en poblaciones de Agaves pulqueros (*Agave* spp.) del noriente del Estado de México. Rev Fitotec Mex. 2007;30(1):1–12.
  20. Ade-Ajayi a. F, Hammuel C, Ezeayanaso C, Ogabiela EE, Udiba UU, Anyim B, et al. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of Agave sisalana Perrine juice (waste). J Environ Chem Ecotoxicol. 2011;3(7):180–3.
  21. Verástegui MA. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de gaves y su acción sobre el trigmotropismi y dimorfismo de *C. albicans*. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2000.
  22. García-Mendoza AJ. Agavaceae, Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Primera. Universidad Nacional Autónoma de México. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011. 1–95 p.
  23. Hernández Peralta P. Evaluación anti-neoplásica e inmunomoduladora in vivo e in vitro del extracto hidrosoluble del *Agave mapisaga* en cáncer de próstata murino.

Universidad Nacional Autónoma De México; 2016.

24. Gallegos Ibarra LC. Determinación de la presencia y actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) en macrófagos de origen murino expuestos al extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*. Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.
25. Diaz Cortés J. Evaluación de tumor primario y metástasis en ratones isotransplantados con cáncer de mama y tratados con el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*. Ciudad der México; 2020. p. 104.
26. Hernández Peralta P, García Espejo D, Gracia Mora M, Velasco Velázquez M, Cobos Marín L. *Agave mapisaga* aqueous extract shows in vitro and in vivo activity on murine prostate cancer cells.
27. Jang S, S; Biberstain L, E; Hirah C D. A diagnostic manual of veterinary clinical bacteriology and micology. University of California, Davis; 1986. 221 p.
28. Bauer, A; Kirby, W; Sherris, J; Turck M. Technical section. Vol. 45, the American Journal of Clinical Pathology. United Statates of America; 1966. 493–496 p.
29. Cantón Lacasa, E; Martín Mazuelos, E; Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-4). Rev Iberoam Micol. 2010;15(1).
30. Espinel-Ingroff A, Cantón E, Pemán J. Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Curr Fungal Infect Rep. 2012;6(1):41–50.
31. Nweze EI, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Agar-based disk diffusion assay for susceptibility testing of dermatophytes. J Clin Microbiol. 2010;48(10):3750–2.
32. Murray R, Patrick; Rosehtal S, Ken; Pfaller A M. Microbiología médica. 8a ed. Elsevier; 2017. 848 p.
33. López Martinez, Rubén; Méndez Tovar Luis Javier; Hernández Hernández, Francisca; Castañón Olivares RL. Micología médica Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 8a ed. Trillas; 2012.

34. Bio-rad. Disks for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Cartridge of 50 Disks. 2006;6–8.
35. Leal-Díaz AM, Santos-Zea L, Martínez-Escobedo HC, Guajardo-Flores D, Gutiérrez-Uribe JA, Serna-Saldivar SO. Effect of *Agave americana* and *Agave salmiana* Ripeness on Saponin Content from Aguamiel (Agave Sap). J Agric Food Chem. 2015;63(15):3924–30.
36. Santos-Zea L, Fajardo-Ramírez OR, Romo-López I, Gutiérrez-Uribe JA. Fast Centrifugal Partition Chromatography Fractionation of Concentrated Agave (*Agave salmiana*) Sap to Obtain Saponins with Apoptotic Effect on Colon Cancer Cells. Plant Foods Hum Nutr. 2016;71(1):57–63.
37. Figueroa LM, Santos-Zea L, Escalante A, Gutiérrez-Uribe JA. Mass spectrometry-based metabolomics of agave sap (*Agave salmiana*) after its inoculation with microorganisms isolated from agave sap concentrate selected to enhance anticancer activity. Sustain. 2017;9(11):1–11.
38. Trytek M, Fiedurek J, Podkościelna B, Gawdzik B, Skowronek M. An efficient method for the immobilization of inulinase using new types of polymers containing epoxy groups. J Ind Microbiol Biotechnol. 2015;42(7):985–96.
39. Hammuel C, Yebpella GG, Shallangwa GA, Magomya AM, Agbaji AS. Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. Acta Pol Pharm - Drug Res. 2011;68(4):535–9.
40. Santos JDG, Branco A, Silva AF, Pinheiro CSR, Neto G, Uetanabaro APT, et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. African J Biothechnology. 2009;8(22):6181–4.
41. Verástegui MA, Sánchez CA, Heredia NL, García-Alvarado JS. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. J Ethnopharmacol. 1996;52(3):175–7.
42. Rizwan K, Zubair M, Rasool N, Riaz M, Zia-Ul-Haq M, de Feo V. Phytochemical and



- biological studies of *Agave attenuata*. *Int J Mol Sci*. 2012;13(5):6440–51.
43. Verástegui Á, Verde J, García S, Heredia N, Oranday A, Rivas C. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24(7):1249–52.
  44. Khan H, Khan MA, Abdullah. Antibacterial, antioxidant and cytotoxic studies of total saponin, alkaloid and sterols contents of decoction of *Joshanda*. *Toxicol Ind Health*. 2012;31(3):202–8.
  45. Alcázar Valle EM. Caracterización de saponinas de *Agave durangensis* y *salmiana* , y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. CIATEJ; 2016.
  46. Siddhapura S, Maharshi A, Thaker V. Varietal difference in antifungal activity of some species of *Agave*. *Arch Phytopathol Plant Prot*. 2011;44(2):135–41.
  47. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* [Internet]. 2011;72(6):435–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
  48. Yang CR, Zhang Y, Jacob MR, Khan SI, Zhang YJ, Li XC. Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(5):1710–4.
  49. Kwun MS, Lee DG. Quercetin-induced yeast apoptosis through mitochondrial dysfunction under the accumulation of magnesium in *Candida albicans*. *Fungal Biol* [Internet]. 2020;124(2):83–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.009>
  50. Ahumada-Santos YP, Montes-Avila J, Uribe-Beltrán M de J, Díaz-Camacho ç SP, López-Angulo G, Vega-Aviña R, et al. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Ind Crops Prod*. 2013;49:143–9.
  51. López-Romero JC, Ayala-Zavala JF, Peña-Ramos EA, Hernández J, González-Ríos

- H. Antioxidant and antimicrobial activity of *Agave angustifolia* extract on overall quality and shelf life of pork patties stored under refrigeration. *J Food Sci Technol*. 2018;55(11):4413–23.
52. Rojas Elizalde JH. Identificación y evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los compuestos extraídos de seis morfotipos de *Agave durangensis*. Instituto Politécnico Nacional; 2017.
53. Sidana J, Singh B, Sharma OP. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*. 2016;130:22–46.
54. Franco-Robles E, López MG. Implication of fructans in health: Immunomodulatory and antioxidant mechanisms. *Sci World J*. 2015;2015.
55. Martínez-Ortega EA, López-Briones JS, Rodríguez-Hernández G, Ramírez-Orozco RE, Franco-Robles E. Antibacterial activity of Agave fructans against *Salmonella typhimurium*. *Nat Prod Res [Internet]*. 2020;34(18):2639–41. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548446>