



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA

## MAESTRÍA EN BIOCENCIAS

### **Actividad antibacteriana y antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Agave cupreata***

#### T E S I S

Para obtener el grado de  
Maestría en Biociencias

Presenta

Q. B. P. Diana Teresa Salazar Pineda

Directora de tesis: Dra. Natividad Castro Alarcón  
Codirectora de tesis: Dra. Patricia Alvarez Fitz

Chilpancingo Gro, abril de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA  
**Maestría en Biociencias**

Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. C.P. 39090. Tel 01 747 47 1 93 10 ext: 3601

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 20 días del mes de enero de dos mil diecisiete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada "**Actividad antibacteriana y antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Agave cupreata***", presentada por la alumna Diana Teresa Salazar Pineda, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón  
Dirección de tesis

Dra. Patricia Alvarez Fitz  
Codirección de tesis

Dra. Yaneth Castro Coronel

Dr. Arturo Ramirez Peralta

Dr. Victor Manuel Navarro Garcia



Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas



Vo. Bo

Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas

La presente investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (FCQB-UAGro) y en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), ubicado en Xochitepec, Morelos. Los extractos fueron obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Toxicología y Salud Ambiental de la FCQB-UAGro, bajo la codirección de la Dra. Patricia Alvarez Fitz. La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó en el Laboratorio de Investigación en Microbiología de la FCQB-UAGro, bajo la dirección de la Dra. Natividad Castro Alarcón y la codirección de la Dra. Patricia Alvarez Fitz. El fraccionamiento del extracto de diclorometano se efectuó con la asesoría externa del Dr. Victor Manuel Navarro en el laboratorio de Microbiología del CIBIS. La evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizó en colaboración con la Dra. Ma. del Pilar Nicasio Torres en el laboratorio de Biotecnología del CIBIS.

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis contó con el financiamiento del proyecto fortalecimiento del posgrado en Biociencias, clave 249671 de los Fondos Mixtos CONACYT Gobierno del Estado de Guerrero. Con el apoyo para realizar una estancia de un mes en el CIBIS-IMSS, en el Estado de Morelos, del Proyecto “Consolidación de la Innovación Educativa en los Programas Educativos de Educación Superior para asegurar su calidad, competitividad y pertinencia con las necesidades del desarrollo sustentable de la entidad, la región y el país”. La autora contó con la Beca CONACYT, durante el periodo de dos años (No. de registro 402686). Se agradece también al comité tutorial de éste trabajo integrado por la Dra. Natividad Castro Alarcón, Dra. Patricia Alvarez Fitz, Dra. Yaneth Castro Coronel, Dr. Arturo Ramírez Peralta y Dr. Victor Manuel Navarro García. Así como a la Dra. Ma. del Pilar Nicasio Torres y Dra. Juanita Pérez Hernández por su colaboración en la realización de la actividad antiinflamatoria, a la Biol. Margarita Avilés y Biol. Macrina Fuentes del jardín etnobotánico del INAH de Cuernavaca, Morelos, por su apoyo en la identificación taxonómica del Agave y al M.C. Marco Antonio Ramírez por su ayuda con el análisis estadístico.

## DEDICATORIAS

**A mis papás:** Carlos Salazar Olivares y Blandina Pineda Leal, por el apoyo y confianza que me han brindado todo el tiempo.

**A mis hermanos:** por sus consejos.

**A mis amigos:** por su apoyo durante la realización de esta tesis.

Con cariño para todos ustedes.

# Índice

Título	1
Resumen	2
Abstract	3
Introduction	4
Material and methods	6
Results	10
Discussion	15
References	19
Anexos	25

# **Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of Extracts and Fractions from *Agave cupreata***

<sup>1</sup>D. T. Salazar-Pineda, <sup>1</sup>N. Castro-Alarcón, <sup>1</sup>M. E. Moreno-Godínez, <sup>2</sup> P. Nicasio-Torres, <sup>3</sup>J. Pérez-Hernández, and <sup>4</sup>P. Alvarez-Fitz\*.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químico Biológica, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas S/N Col. La Haciendita CP. 39090 Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Argentina #1, Col. Centro CP. 62790 Xochitepec, Morelos, México.

<sup>3</sup>Estancia Postdoctoral CONACYT- Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Instituto Politécnico Nacional, (IPN). P. O. Box 24, Yautepec 62730, Morelos, México.

<sup>4</sup>Catedrática CONACYT-UAGro. Av. Lázaro Cárdenas S/N Col. La Haciendita CP. 39090 Chilpancingo, Guerrero, México.

\*Corresponding author

Patricia Alvarez Fitz, Laboratorio de Investigación en Microbiología. Facultad de Ciencias Químico Biológica, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas S/N Col. La Haciendita CP. 39090 Chilpancingo, Guerrero, México. E-mail address: paty\_fitz@hotmail.com

Tel: 527474725503

Fax: 527474725503

## Resumen

**Objetivo:** El objetivo de éste estudio fue evaluar la actividad antibacteriana y antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de hojas de *Agave cupreata*.

**Metodología:** Las hojas de *A. cupreata* fueron extraídas por maceración usando disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y acetona. Las fracciones del extracto de diclorometano se obtuvieron mediante cromatografía en columna abierta con sílica gel y sistema de elución hexano-acetona 7:3. La actividad antibacteriana se evaluó usando el método de doble dilución en agar y microdilución en caldo. La actividad antiinflamatoria se realizó utilizando los modelos de edema auricular en ratón inducido con TPA y edema subplantar de ratón inducido con  $\lambda$ -carragenina. La CMI de los extractos de hexano y diclorometano fue de 16 mg mL<sup>-1</sup> contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y todos los aislados clínicos ensayados; para el extracto de acetona únicamente *Staphylococcus simulans* fue susceptible (CMI 16 mg mL<sup>-1</sup>). De las fracciones obtenidas del extracto de diclorometano, la F-34 fue la más activa contra todas las bacterias ensayadas (CMI de 2-16 mg mL<sup>-1</sup>). Para la actividad antiinflamatoria, los extractos de diclorometano y acetona presentaron un efecto inhibitorio en la formación de los edemas de 64.29% (ED<sub>50</sub>= 107.55 mg por kg de peso) y 48.82% respectivamente cuando la inflamación fue inducido con  $\lambda$ -carragenina y 62.47% (ED<sub>50</sub>=1.21 mg por oreja) y 40.82% al ser inducido con TPA. **Conclusiones:** Los extractos de hexano y diclorometano de hojas de *A. cupreata* presentan actividad antibacteriana tanto para cepas sensibles como para aislados clínicos de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina; además pueden ser fuente importante de compuestos con acción antiinflamatoria.

**Palabras clave:** *Agave cupreata*, Antibacteriano, Antiinflamatorio, CMI, SMR.



## Abstract

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the antibacterial and anti-inflammatory activities of extracts and fractions obtained from *Agave cupreata* leaves. **Methodology:** *A. cupreata* leaves were extracted by maceration with solvents of increasing polarity: hexane, dichloromethane and acetone. The fractions of dichloromethane extract were obtained by open column chromatography on silica gel and elution system hexane-acetone 7:3. The antibacterial activity was evaluated using the double dilution agar and microtiter broth dilution methods. The anti-inflammatory activity was tested using the TPA-induced mouse ear edema and the  $\lambda$ -carrageenan-induced mouse paw edema model. The MIC of extracts of hexane and dichloromethane were 16 mg mL<sup>-1</sup> against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and all clinical isolates tested; for the acetone extract only *Staphylococcus simulans* was susceptible (MIC 16 mg mL<sup>-1</sup>). Of the fractions obtained from the dichloromethane extract, the F-34 was the most active against all bacterial tested (MIC of 2-16 mg mL<sup>-1</sup>). As for the anti-inflammatory activity, the dichloromethane and acetone extracts present an inhibitory effect on the formation of edemas of 64.29% (ED<sub>50</sub>= 107.55 mg per kg of BW) and 48.82% respectively when inflammation was induced with carrageenan and being induced by TPA it was 62.47% (ED<sub>50</sub>=1.21 mg per ear) and 40.82%. **Conclusions:** The extracts of hexane and dichloromethane from *A. cupreata* leaves exhibit antibacterial activity, for both sensitive strains and clinical isolates methicillin-resistant *Staphylococcus*; in addition it can be important source of compounds with anti-inflammatory action.

**Keywords:** *Agave cupreata*, Antibacterial, Anti-inflammatory, MIC, MRS.

## Introduction

Agaves are endemic species of America and Mexico is the primary center of their wealth and distribution, counting on 159 species (119 endemic) which occupy more than 75% of the territory, they are very diverse in the arid and semi-arid provinces of the center and north of the country<sup>1,2</sup>. Agaves are plants of great cultural and economic importance, all their structures (leaves, stems, flowers and floral scapeare) are used as food for humans and livestock as raw material for the production of fibers and beverages (fermented and distilled)<sup>2,3</sup>, as well as for the semi-synthesis of steroidal drugs for the pharmaceutical industry<sup>4</sup>. In addition, to its medicinal use for the treatment of bacterial and inflammatory diseases, (e.g. gastrointestinal and wound infections, urologic disorders, dysentery)<sup>5,6</sup>, plus cancer and diabetes<sup>2,5,7</sup>. Scientific studies report that crude extracts of species of Agave such as *A. tequilana*, *A. americana*, *A. angustifolia* and partially purified fractions have anti-inflammatory<sup>8,9</sup>, anticancer<sup>7,10,11</sup>, antimicrobial, antioxidant<sup>12</sup>, antihypertensive<sup>13</sup>, immunomodulatory<sup>14</sup>, antiparasitary<sup>15,16</sup> and antifungal<sup>17</sup> activities. These activities are due to the secondary metabolites that are present in the extracts and fractions such as fatty acids (ethyl esters), triterpenes, saponins, steroids, tannins, flavonoids, cardiac glycosides and fructans<sup>7,12,18,19</sup>.

Among the species of Agave in Mexico is *A. cupreata*, this is an endemic plant naturally distributed in the Balsas Depression, a semiarid region in Guerrero and Michoacán states in Mexico Southwestern<sup>20</sup>. This species is distinguished by copper-colored spines, broad leaves light green, very serrated and with impressions of spines very marked in the edges<sup>21</sup>. Various parts of the plant are used in traditional medicine; however, its main use is the central head (“piña”) which is used to for “mezcal” elaboration an alcoholic beverage similar to the Mexican tequila<sup>22</sup>.

Considering that other species of agave have antibacterial and anti-inflammatory effects already corroborated, it is expected that *A. cupreata* could present similar biological activity, it is important to mention that for this species there are no scientific reports about its biological activity and as regards its phytochemical composition, only its lipid content has been determined<sup>19</sup>. The interest in anti-inflammatory and antibacterial substances of plant origin is increasing because they offer advantages in some cases in relation to classic drugs, such as the low incidence of side effects<sup>23</sup>, it is because of that the objective of this work was to evaluate the antibacterial and anti-inflammatory activity of extracts of *A. cupreata* which will allow to know molecules with biological activity that in the future can be used to obtain new phytodrugs.

## Material and methods

### *Plants material*

*A. cupreata* leaves were collected in Guerrero State, Mexico in July 2015. The plant material was identified by Dr. Abisaí Josué García Mendoza from Biology Institute of National Autonomous University of Mexico (UNAM), México. A voucher specimen with accession number MEXU-2050 was submitted to the Nation herbarium of Mexico (MEXU) and identified as *Agave cupreata* Trel. & A. Berger.

### *Plants extracts and fractions*

The dried and ground leaves of *A. cupreata* (3.5 kg) were extracted successively by maceration using ascending polarity solvents: hexane, dichloromethane and acetone (1.5 L at 24 h, 3 times). The macerated material was filtered, extracts pooled and evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator (digital rotary evaporator 410, Puebla, México). The extract yields were 0.069%, 0.138% and 0.572%, respectively. The dichloromethane extract was submitted to process of open column chromatography (OCC) on Kiesegel 60 (Merck, Germany). This procedure was initiated with 100% *n*-hexane as eluent system, and polarity was gradually increased by means of successive additions of acetone to obtain ninety two aliquots (150 mL). The fractions obtained were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) (Silica gel 60 F254 Merck, Germany), visualized by Ultraviolet light (UV) to 302 nm and 365 nm, and revealed with acid reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The aliquots were combining according to characteristics observed by TLC in twenty fractions. In this study, we performed the qualitative phytochemical analysis of the extracts was carried out using standard qualitative methods (TLC) for detection the presence of antrones,

anthraquinones, coumarins, alkaloids, essential oils, pungent compounds, saponins, steroids, lignans and catechins.

#### Antibacterial activity

##### *Tested microorganisms*

The following six strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterobacter cloacae* ATCC 700323, *Salmonella dublin* ATCC 9676, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Plus nine clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus* (MRS) were obtained from General Hospital of Acapulco, México: *Staphylococcus haemolyticus* (1129), *Staphylococcus aureus* (1058), *Staphylococcus simulans* (1050), *Staphylococcus haemolyticus* (562), *Staphylococcus hominis* (592), *Staphylococcus hominis* (596), *Staphylococcus haemolyticus* (731), *Staphylococcus haemolyticus* (1036) and *Staphylococcus epidermidis* (1042). All strains were incubated at 37 °C in Mueller Hinton agar. The inoculum for assay was prepared by direct colony suspension with Mueller Hinton broth and adjusted to obtain the turbidity of 0.5 McFarland standard ( $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>).

##### Minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC of extracts and fractions were determined by double dilution agar method and microtiter broth dilution method respective<sup>24</sup>. Briefly, a stock solution of extracts and fractions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO 99.9 % of purity grade culture at 20%, Sigma-Aldrich) at a concentration of 2-16 mg mL<sup>-1</sup>. In the double dilution agar method the stock solution was mixed with 3 mL of Mueller Hinton agar in Petri plates, in the microtiter broth dilution method the stock solution was mixed with 100 µL of

Luria Bertani broth (LB) in microplates (96-wells). Each dilution was inoculated with 2  $\mu$ L of diluted inoculum. The Petri plate and microplates were incubated at 37 °C for 24 h. The microplates were mixed with 200  $\mu$ L of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Merck, Darmstadt, Alemania), the plates were reincubated at 37 °C for 15 min after this incubation if the well-turned purple. The MIC was defined as the lowest concentration of the tested substance that inhibited the visible growth of the bacterial strains. Ceftazidime (Glaxo, Bogota, Colombia) was used as standard antibiotics (positive control).

#### Anti-inflammatory assay

##### *Animals*

Female albino ICR mice (weight 25-30 g) (Harlan, Mexico City, Mexico) were used for this assay in accordance with the protocol approved by the Institutional Research Committee in compliance with the Official Mexican Regulation dating from 1999 (NOM-062-ZOO-1999). Mice were housed seven per cage and were maintained under standard laboratory conditions (25 °C, 12-h light/12-h dark and water/food *ad libitum*). The animals were to acclimatize to the housing facilities for at 3 weeks before the experiments. All experimental were conducted in minimal number of animal ( $n=7$ ) and requisites of observation were employed to obtained consistent data.

##### *Carrageenan footpad edema (CFE)*

The procedure was performed according to that reported by Nicasio *et al.*<sup>25</sup> Acute inflammation was produced by the subplantar injection of 20  $\mu$ L of  $\lambda$ -carrageenan (1%) in the mouse's right paw and after 60 min were orally (p.o.) administrate with 150 mg per kg of BW of dichloromethane and acetone extracts or 10 mg per kg of BW of

indomethacin (99 % of purity; Sigma-Aldrich), the control group received water/tween-20 to 2%. Footpad volume was measured before (time = 0; initial time) and after (1, 3 and 5 h)  $\lambda$ -carrageenan injection using a digital micrometer (Mexico City, México). Footpad edema in the control and treated groups was determined with respect to footpad volume at the time = 0. The percentage of inhibition was calculated using the following expression: inhibition % = [(control-treatment/control) X 100].

#### *TPA-induced mouse ear edema*

The effect produced by extracts of *A. cupreata* on the mice ear edema assay was performed according to that reported by Pérez *et al.*<sup>26</sup> Each mouse received 20  $\mu$ L TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, 2.5  $\mu$ g per ear), it was topically applied to the right ear leaving the left ear of each mouse as control (20  $\mu$ L to methanol). After 15 min of TPA application, the treatments (dichloromethane and acetone extracts, 2 mg per ear) and indomethacin (1 mg per ear) were application (10  $\mu$ L in the inner ear and 10  $\mu$ L in the external ear). Five hours after the assay, the animal were sacrificed by cervical dislocation and circular sections of the central portion (6 mm in diameter) were taken from both ears (treated and no-treated), which were weighed to determine the ear edema by differences in weight. The percentage of inhibition was calculated using the following expression: inhibition % = [(control-treatment/control) X 100].

#### *Statistic analysis*

The analysis of normal distribution of the data of footpad edema (volume and inhibition %) and mouse ear edema (weight and inhibition %) were analyzed by variance (ANOVA) followed by Tukey test. Values of  $p < 0.05$  were considered statically significant (Stata 11.0).

## Results

### *Antibacterial assay*

The antibacterial evaluation of *A. cupeatra* extracts against sensitive strains and clinical isolates of MRS (Table 1), showed that the hexane and dichloromethane extract had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and all clinical isolates MRS at a concentration of 16 mg mL<sup>-1</sup>. The extract of acetone displayed low activity against all strains examined. The fraction F-34 inhibited the growth of all clinical isolates MRS, being more active against *Staphylococcus epidermidis* 1042 with a MIC of 2 mg mL<sup>-1</sup> (Table 1).

### *Anti-inflammatory assay*

The dichloromethane and acetone extracts were analyzed in the CFE and TPA-induced mouse ear edema methods. In the first model, we observed that after the administration of the proinflammatory, the maximum effect in the formation of edema was at 3 and 5h.

The dichloromethane extract significantly inhibited the formation of subplantar edema in 56.22% and 64.29% at 3 and 5 h, respectively (Tabla 2) with a level of edema of 0.51 and 0.40. This extract showed a dose-dependent effect with a median effective dose (ED<sub>50</sub>) of 107.55 mg per kg of BW (Figure 1). Statistically the acetone extract presented an anti-inflammatory effect similar to indomethacin, the highest anti-inflammatory activity was observed at 3 h.



**Table 1.** Minimal inhibitory Concentration (MIC) of extracts and fractions from *Agave cupeatra*.

Strains	Extracts			Fractions (mg mL <sup>-1</sup> )			Control (+)	Control (-)
	HE	DE	AE	F-34	F-60	F-84	CAZ	Culture medio
<b>ATCC</b>								
<i>S. aureus</i>	16	16	*	8	8	*	†	+
<i>E. cloacae</i>	*	*	*	*	*	*	†	+
<i>S. dublin</i>	*	*	*	*	*	*	†	+
<i>E. coli</i>	*	*	*	*	16	*	†	+
<i>P. aeruginosa</i>	16	16	*	8	16	16	†	+
<i>K. pneumonia</i>	*	*	*	*	*	*	†	+
<b>Clinical isolate MRS</b>								
<i>S. haemolyticus</i> 1129	16	16	*	8	16	16	0.5	+
<i>S. aureus</i> 1058	16	16	*	16	16	16	†	+
<i>S. simulans</i> 1050	16	16	16	8	16	16	0.5	+
<i>S. haemolyticus</i> 562	16	16	*	8	16	16	†	+
<i>S. hominis</i> 592	16	16	*	8	16	16	†	+
<i>S. hominis</i> 596	16	16	*	16	16	16	0.5	+
<i>S. haemolyticus</i> 731	16	16	*	8	16	16	†	+
<i>S. haemolyticus</i> 1036	16	16	*	8	16	*	†	+
<i>S. epidermidis</i> 1042	16	16	*	2	16	16	†	+

HE: hexane extract; DE: dichloromethane extract; AE: acetone extract, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*S. aureus*); *Enterobacter cloacae* ATCC 700323 (*E. cloacae*); *Salmonella dublin* ATCC 9676 (*S. dublin*); *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*); *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (*K. pneumoniae*). CAZ Ceftazidime. † MIC <0.5 mg mL<sup>-1</sup>. + Bacterial growth. \* MIC >16 mg mL<sup>-1</sup>.

**Table 2.** Inhibitory activity of dichloromethane and acetone extracts on  $\lambda$ -carrageenan footpad edema in mice orally administered with 150 mg per kg BW.

Time (h)	Paw edema formation			
	Control	Indomethacin	DE	AE
<b>Edema (mm)</b>				
1	0.96±0.07	0.61±0.03	0.66±0.02	0.64±0.03
3	1.16±0.05	0.68±0.01	0.51±0.04*	0.59±0.02
5	1.12±0.08	0.60±0.03	0.40±0.04*	0.55±0.05
<b>Edema inhibition (%)</b>				
1	-	41.07±2.80	31.25±1.68	34.19±3.14
2	-	41.50±1.21	56.22±3.10*	48.82±1.73
3	-	46.30±2.82	64.29±3.88*	47.82±3.09

Mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). ANOVA *post hoc* Tukey with  $n=7$ , \*  $p < 0.05$  when are compared with indomethacin group. DE: dichloromethane extract; AE: acetone extract.

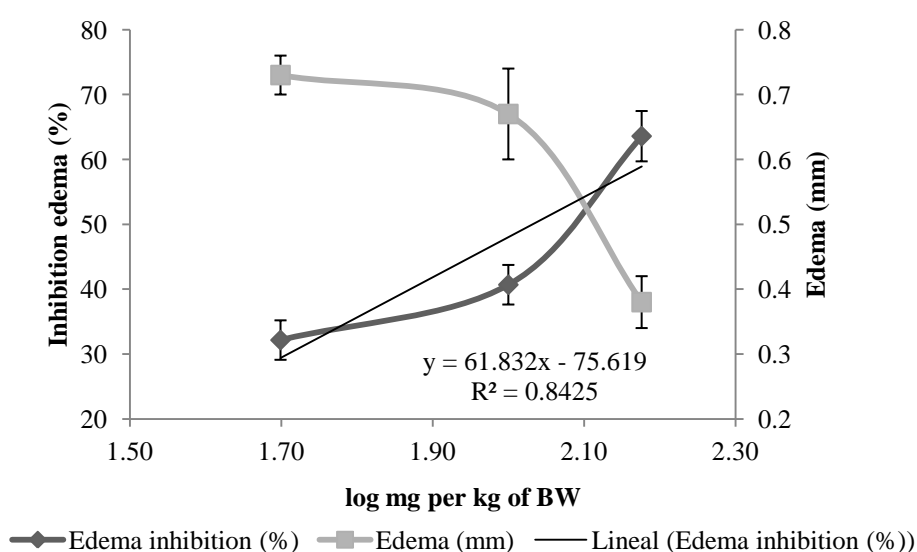


Figure 1. Relationship between the dose of dichloromethane extract and foodpad edema inhibition, as well as between dose and  $\lambda$ -carrageenan foodpad edema. The “best-fit” line shown was generated by linear regression of the data ( $n = 7$ ); squares of correlation coefficient ( $R^2$ ) regression equations are reported. Vertical bars represent the standard error of the means (SEM).

In the TPA-induced mouse ear edema method, the dichloromethane extract at a dose of 2 mg per ear inhibited the formation of edema in 62.47% similar to that obtained in CFE; the acetone extract at this same dose inhibits in 40.82% similar to indomethacin (Table 3). The dichloromethane extract showed an effect dose-dependent with an ED<sub>50</sub> of 1.21 mg per ear (Figure 2).

**Table 3.** Inhibitory activity of dichloromethane and acetone extracts on TPA- induced mouse ear edema.

<b>Treatment</b>	<b>Doses (mg per ear)</b>	<b>Edema (weight mg)</b>	<b>Inhibition (%)</b>
Control	-	12.17±0.69	-
Indomethacin	1.00	8.31±0.54	37.21±3.76
DE	2.00	4.57±0.54*	62.47±4.48*
AE	2.00	7.20±0.48	40.82±3.96

Mean ± standard error of the mean (SEM) ( $n = 7$ ). ANOVA *post hoc* Tukey with  $n = 7$ , \*  $p < 0.05$  when are compared with indomethacin group. DE: dichloromethane extract; AE: acetone extract.

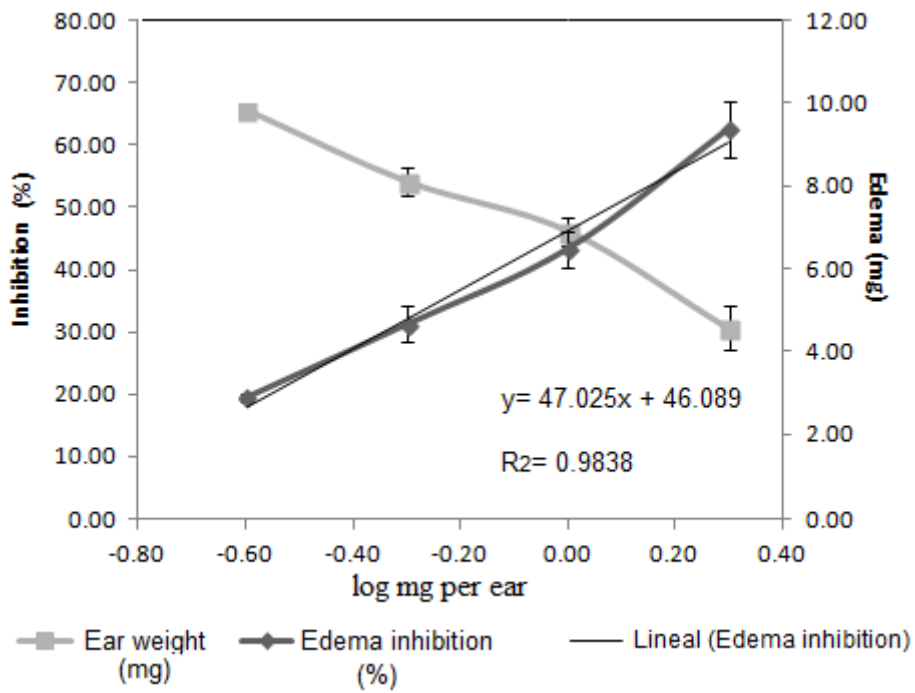


Figure 2. Relationship between the dose of dichloromethane extract and auricular edema inhibition, as well as between dose and TPA-induced mouse auricular edema weight. The “best-fit” line shown was generated by linear regression of the data ( $n = 7$ ); squares of correlation coefficient ( $R^2$ ) regression equations are reported. Vertical bars represent the standard error of the means (SEM).

## Discussion

Have been historically recorded that agave products possess biological activity, in this studio was demonstrate antibacterial and anti-inflammatory action of hexane, dichloromethane and acetone extracts from *A. cupreata*.

In terms of antibacterial activity we found that hexane and dichloromethane extracts have a MIC 8-16 mg mL<sup>-1</sup> against Gram positive and Gram negative species. It is important to mention that there are no reports in which the antibacterial activity of *A. cupreata* is evaluated, so it is not possible to make comparisons for this particular species. However, work has been done on polar extracts and similar MICs were observed in this study; for example, Ahumada *et al.*<sup>12</sup> determined that the methanolic extract of *A. impressa*, *A. ornithobroma*, *A. rzedowskiana*, *A. tequilana*, *A. schidigera* and *A. angustifolia* had MICs 5-15 mg mL<sup>-1</sup> against ATCC strains (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and clinical isolates (*Streptococcus* group A-4, *Salmonella enterica* Typhi and *Shigella dysenteriae*). On the other hand, Hammuel *et al.*<sup>18</sup> determined the MIC of polar extracts (aqueous and methanolic) of *A. sisalana* and found activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans* in a range of 10-20 mg mL<sup>-1</sup>.

When the dichloromethane extract was fractionated, it was observed that the MIC of the fractions is lower in comparison with the total extract. Especially in F-34 which was the fraction with the best activity with MIC 2-16 mg mL<sup>-1</sup>, being up to eight times more active against *Staphylococcus epidermidis* 1042 (methicillin-resistant clinical isolates).

The wide diversity and large number of molecules that may be contained in a whole extract raises the possibility that the constituent molecules may react to generate effects such as synergism or antagonism. Thus, some individual molecules may have stronger effects than the whole extract (antagonist within the extract) or a reduced effect (is a synergistic factor in the extract)<sup>27</sup>.

According to the preliminary phytochemical profile performed in this study, detection of the presence of antrones, anthraquinones, coumarins, alkaloids, essential oils, pungent compounds and saponins, it is probable that the antibacterial action observed in the extracts is caused by these metabolites, for example the alkaloids are capable of intercalating in the DNA, resulting in the alteration of the division and cell death, it can also reduce the motility of *Escherichia coli* (UPEC) and have been shown to increase the antibiotic's capacity to destroy the bacterial biofilm<sup>28,29</sup>; triterpenoids inhibit efflux pumps in *Enterococcus faecalis* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*<sup>30</sup>.

On the other hand, it is known that bacterial infections can trigger inflammatory processes, as a result of some structural components, among which are the peptidoglycans, lipoteichoic acid and lipopolysaccharides<sup>31,32</sup>. In addition to other components such as *Staphylococcus aureus* leucotoxins enhance the host inflammatory response and influence the outcome of infection<sup>33</sup>.

Results obtained by other studies using different methodologies show that the *Agave* genus is characterized by good anti-inflammatory activity. On CFE, the methanolic extract of *A. cantala* (Roxb.) and *A. intermixta* Trel. leaf and capable of generating between 46.15% and 81.4% inhibition at concentrations of 200-500 mg per kg of BW<sup>34,35</sup>; on the other hand, in the TPA-induced mouse ear edema method the extracts of

acetone and methanol from *A. tequilana*, *A. americana*, *A. angustifolia* and *A. cantala* generate 51%-81% inhibition between 3-6 mg per ear<sup>9,35</sup>.

In this study it was observed that dichloromethane and acetone extracts of *A. cupreata* leaves were able to inhibit inflammation with similar effect. It will be interesting to evaluate the anti-inflammatory activity of fractions and/or pure compounds, this behavior would be similar to those reported in other studies, in which were elucidated compounds such as saponins and phytosterols<sup>8,9</sup>, so it is probable that the saponins identified in the acetone extract in this study, are responsible for exercising the action anti-inflammatory; whereas in dichloromethane extract, the presence of alkaloids may be those that exert the action, because according to Beg *et al.*<sup>36</sup>, the alkaloids present in other plant species exert this biological activity.

It is known that the inflammatory response promoted by carrageenan is biphasic type, the early phase in edema formation occurs within the first characterized by the release of histamine and serotonin; the second phase is associated with the release of prostaglandins, bradykinin and protease with a maximum effect occurring about 3 h after carrageenan injection<sup>23,37</sup>. In this study, the dichloromethane extract and acetone extract are presented possess a potent anti-inflammatory activity, both in the first and second phase.

In the case of TPA, it is able to activate protein kinase C, which activates other enzymatic cascades in turn, leading to release of different molecules. This stimulates vascular permeability, vasodilation, polymorphonuclear leukocytes migration, release of histamine and serotonin as well as moderate synthesis of inflammatory eicosanoids by cyclooxygenase and 5-lipoxygenase enzymes<sup>23,37</sup>; therefore, it is likely that the good

anti-inflammatory activity of the *Agave* extracts is due to the inactivation of these enzymes or their products.

In this work, the antibacterial and anti-inflammatory activities of hexane, dichloromethane and acetone extract of *A. cupreata* was reported for the first time. These activities are in agreement with the ethnomedical use. Further studies on *A. cupeatra* could contribute to discover new antibacterial and anti-inflammatory agents. To continue this study, we must isolate compounds from dichloromethane extract and evaluate the antibacterial and anti-inflammatory activity of the pure compounds.

### **Acknowledgements**

This research received financial support provided by grant fortalecimiento del posgrado en Biociencias, 249671 de los Fondos Mixtos CONACYT Gobierno del Estado de Guerrero. Diana Teresa Salazar Pineda thanks Beca CONACYT 402686.



## References

1. García, A. J. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias*. 87, 14-23.
2. García, A. J. 2011. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 88. *Agavaceae*. Instituto de biología, UNAM.
3. Delgado, A., Casas, A. and Téllez, O. 2014. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *J Ethnobiol Ethnomed.*, 10: 1-12. DOI: 10.1186/1746-4269-10-63. PMID: 25185769.
4. Sparg S. G., Light M. E. and van Staden J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.*, 94:219-243. DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.016.
5. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>. Consultado el 05 de marzo de 2017.
6. Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S. and Mariotti, M.G. 2009. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *J Ethnopharmacol.*, 125: 16-30. DOI: 10.1016/j.jep.2009.06.021. PMID: 19563876.
7. Santos, L., Leal, A. M., Cortés, E., Gutiérrez, U. and Janet, A. 2012. *Agave* (*Agave spp.*) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds.*, 8: 218-231.
8. Hernández, E., Herrera, M., Rosas, G., Zamilpa A., Arenas, M. L., Jiménez A., Tortoriello, J. and Jiménez, E. 2014. Anti-Inflammatory Effect of 3-O-[(6'-O-Palmitoyl)- $\beta$ -Dglucopyranosyl Sitosterol] from *Agave angustifolia* on Ear Edema in

- Mice. *Molecules.*, 19: 15624-15637. DOI: 10.3390/molecules191015624 PMID: 25268718.
9. Monterrosas, N., Arenas, M. L., Jiménez, E., Jiménez, A. R., Zamilpa, A., González, M., Tortoriello, J. and Herrera, M. 2013. Anti-Inflammatory Activity of Different Agave Plants and the Compound Cantalasonin-1. *Molecules.*, 18: 8136-8146. DOI: 10.3390/molecules18078136. PMID: 23846754.
  10. Ramos, F., Oranday, A., Rivas, C., Verde, M. J. and Cruz, D. E. 2012. Cytotoxic activity of *Agave lechuguilla* Torr. *Afr. J. Biotechnol.*, 11: 12229-12231. DOI: 10.5897/AJB12.1123
  11. Khade, K. V., Dudev, H., Tenpe, C. R., Yeole, P. G. and Patole, A. M. 2011. Anticancer activity of the ethanolic extracts of *Agave americana* leaves. *Pharmacologyonline.*, 2: 53-68.
  12. Ahumada, Y. P., Montes, J., Uribe, M. De J., Díaz, S. P., López, G., Vega, R., López, J. A., Basilio, J. and Delgado, F. 2013. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Ind Crops Prod.*, 49: 143-149. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.04.050.
  13. Duncan, A. C., Jäger, A. K. and van Staden, J. 1999. Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *J Ethnopharmacol.*, 68: 63-70. PMID:10624863
  14. Chen, P. Y., Kuo, Y. C., Chen, C. H., Kuo, Y. H. and Lee C. K. 2009. Isolation and Immunomodulatory Effect of Homoisoflavones and Flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. *Molecules.*, 14: 1789-1795. DOI: 10.3390/molecules14051789. PMID: 19471199.
  15. Thakur, C. P., Narayan, S., Bahadur, S., Thakur, M., Pandey, SN., Kumar, P., Misra, P., Mukherjee, P. K. and Mitra, D. K. 2015. Anti- leishmanial activity of

- Agave americana* L. A traditional Indian medicinal plant. Indian J Tradit Knowle., 14: 658-663.
16. Orestes, J., Meneses, A., Simonet, A. M., Macías, F. A., Nogueiras, C., Gómez, A. and Escario, J. A. 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (*Agavaceae*) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. Rev. biol. trop., 56: 1645-1652.
17. Verástegui, A., Verde, J., García, S., Heredia, N., Oranday, A. and Rivas, C. 2008. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. World J Microbiol Biotechnol., 24: 1249-1252. DOI: 10.1007/s11274-007-9563-8.
18. Hammuel, C., Yebpella, G. G., Shallangwa, G. A., Magomya, A. M. and Agbaji, A. S. 2011. Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. Acta Pol Pharm., 68: 535-539. PMID: 21796935.
19. Martínez, J. F. and Peña, A. 2009. Characterization of Five Typical *Agave* Plants Used To Produce Mezcal through Their Simple Lipid Composition Analysis by Gas Chromatography. J Agric Food Chem., 57: 1933-1939. DOI: 10.1021/jf802141d. PMID: 19216532.
20. Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
21. Avendaño, C.H., Iracheta, L., Gódinez, J. C., López, P. and Barrios, A., 2015. Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. Phyton-Int J Exp Bot., 84: 148-162.
22. Aguirre, X. and Eguiarte, L.E. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal

- production in Mexico. *J Arid Environ.*, 90: 36-44. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2012.10.018.
23. Gómez, H. A., González, K. M. and Domingo, J. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.*, 10: 182-21.
24. Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis.*, 6: 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
25. Nicasio, M. P., Pérez, J., González, M., Meckes, M., Tortoriello, J. and Cruz, F. 2016. Production of potential anti-inflammatory compounds in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Acta Physiol Plant.*, 38: 209. DOI: 10.1007/s11738-016-2211-x
26. Pérez, J., González, M., Marquina, S., Herrera, M., Meckes, M., Tortoriello, J., Cruz, F. and Nicasio, M. P. 2014. Sphaeralcic Acid and Tomentin, Anti-inflammatory Compounds Produced in Cell Suspension Cultures of *Sphaeralcea angustifol*. *Planta Med.* 80, 1-6. DOI: 10.1055/s-0033-1360302. PMID: 24488717.
27. Wagner, H. and Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine.* 16: 97-110. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.12.018. PMID: 9211237.
28. Dusane, D. H., Hosseinidoust, Z., Asadishad, B. and Tufenkji, N. 2014. Alkaloids Modulate Motility, Biofilm Formation and Antibiotic Susceptibility of Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE.*, 9: e112093. DOI:10.1371/journal.pone.0112093. PMID: 25391152.
29. Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A. and Venkitanarayanan, K. V. 2014. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials:

- A Minireview of the Mechanistic Basis. *Biomed Res Int.*, 2014: 1-18. DOI: 10.1155/2014/761741. PMID: 25298964
30. Ramalhete, C., Spengler, G., Martins, A., Martins, M., Viveiros, M., Mulhovo, S., Ferreira, M. J. U. and Amaral, L. 2011. Inhibition of efflux pumps in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 37: 70-74. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2010.09.011.
31. Płociennikowska, A., Hromada-Judycka A., Borzęcka K. and Kwiatkowska K., 2015. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.*, 72: 557-581. DOI: 10.1007/s00018-014-1762-5. PMID: 25332099.
32. Gutiérrez, G. and Cardoso, P. 2006. Ácido lipoteicoico: receptores y mecanismo de transducción. *REB.* 25, 41-49.
33. Malachowa, N., Kobayashi, S. D., Braughton, K. R., Whitney, A. R., Parnell, M. J., Gardner, D. J. and DeLeo, F.R. 2012. *Staphylococcus aureus* Leukotoxin GH Promotes Inflammation. *J Infect Dis.*, 206: 1185-93. DOI: 10.1093/infdis/jis495. PMID:22872735.
34. Koteswara reddy G., Mohana lakshmi S., Ashok kumar C. K., Satheesh Kumar D. and Lakshmi srinivas T. 2013. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activity of methanolic extract of *Agave cantala* roxb. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences.*, 4: 1300-1309.
35. García, M. D., Quílez, A. M., Sáenz, M. T., Martínez, M. E. and de la Perta R. 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *J Ethnopharmacol.*, 71: 395-400. PMID: 10940576.

36. Beg, S., Swain, S., Hasan, H., Barkat, M. A. and Hussain, M. S. 2011. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. *Pharmacogn Rev.*, 5: 120-137. DOI: 10.4103/0973-7847.91102. PMID: 22279370.
37. Patel, M., Muruganathan, Shivalinge Gowda K. P. 2012. In vivo Animal Models in Preclinical Evaluation of Anti-Inflammatory Activity- A Review. *Int. J. of Pharm. Res. & All. Sci.*, 1: 01-05.

## Anexos

### ANEXO 1

#### Etiquetado de la muestra vegetal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS DE LA TIERRA HERBARIO		
<b>Nombre científico:</b> <i>Agave cupreata</i>	<b>Planta de:</b> Guerrero	
<b>Familia:</b> <i>Agavaceae</i>	<b>Municipio:</b> Tlapa de Comonfort	
<b>Localidad:</b> Totomochapa		
<b>Latitud:</b> 17.541111	<b>longitud:</b> -98.459167	<b>altitud:</b> 1450 metros
<b>Tipo de vegetación:</b> selva baja caducifolia		
<b>Inf. Ambiental:</b>		
<b>Suelo:</b> Arcilloso	<b>Asociada:-</b>	
<b>Otros datos</b>		
<b>Forma biológica:</b> Roseta	<b>Tamaño de la roseta:</b> 1m de altura	
<b>Abundancia:</b> abundante		
<b>Fruto:</b> -	<b>Flor:</b> amarilla	
<b>Nombre local:</b> Maguey ancho	<b>Fecha:</b> 01/Enero/2016	
<b>Determinó:</b>	<b>Usos:</b> Alimento, medicinal, ornamental	
<b>Colectó:</b> Diana Teresa Salazar pineda	<b>Numero de colecta:</b> 02	
<b>Observaciones:</b> Planta de color verde de aproximadamente 8 años de edad, sus hojas son irritantes, altura del escapo floral 5.67 m.		

## ANEXO 2

### Método bioautográfico

Las bioautografías se prepararon en cromatoplasmas de sílica gel No. 60 de 5 cm de longitud, el ancho dependió del número de extractos a ensayar. El sistema de elución utilizado fue hexano-acetona 7:3.

Los extractos y fracciones fueron disueltos con su correspondiente disolvente y se cargaron en dos cromatoplasmas gemelas eluidas al mismo tiempo. Una vez eluidas las placas secas fueron separadas como cromatograma control y cromatograma experimental. En la Figura 1S se muestra la bioautografía de los extractos de hexano, diclorometano y acetona.

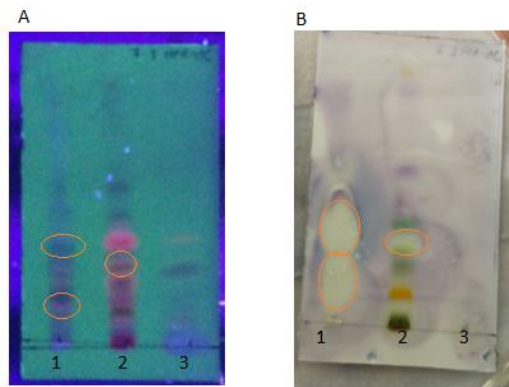


Figura 1S. Bioautografía, A) Cromatograma control, los círculos muestran a los compuestos que tienen actividad antibacteriana en el panel B. B) Cromatograma experimental, los círculos muestran las áreas de inhibición de crecimiento bacteriano (manchas blancas). 1. Extracto hexánico, 2. Extracto diclorometánico, 3. Extracto acetónico.

El cromatograma control se utilizó como referencia para la localización de los compuestos una vez separados, siendo analizados con una lámpara de luz UV marcando los compuestos que fluorescen a 302 nm y 356 nm. Posteriormente, los compuestos



fueron revelados con revelador ácido (10% ácido sulfúrico concentrado, 20 % etanol, 70% agua). El otro cromatograma se utilizó para el ensayo bioautográfico, para lo cual fue inoculado con una solución de *Staphylococcus aureus* en caldo Mueller Hinton ajustado al estándar 0.5 de Mc Farland, la placa se sumergió en la solución de *Staphylococcus aureus* durante 30 s hasta estar completamente embebidas, en seguida se colocaron sobre un porta objetos dentro de una caja Petri con papel filtro humedecido en el fondo durante 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo el cromatograma fue revelada utilizando una solución acuosa de MTT (3mg 10 mL<sup>-1</sup> de agua) como colorante vital, rociando una capa ligera y homogénea sobre el cromatograma e incubándola durante 30 min a 37 °C. El efecto inhibitor del crecimiento antibacteriano en el cromatograma se observa como manchas blancas. En la Figura 2S se muestra la bioautografía de las fracciones del extracto de diclorometano.

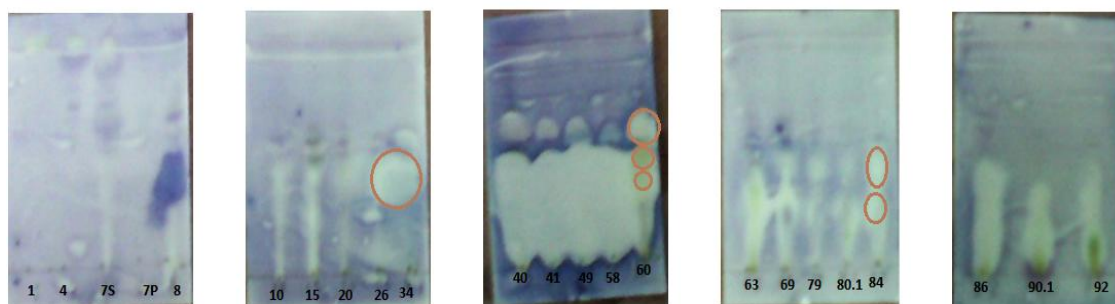


Figura 2S, Bioautografía de las fracciones del extracto de diclorometano. Las manchas blancas indican actividad antibacteriana. Las fracciones F-34, F-60 y F-84 fueron seleccionadas para determinarles la CMI; los círculos anaranjados indican la actividad antibacteriana de dichas fracciones.

### ANEXO 3

#### **Método de doble dilución en agar.**

Las bacterias utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterobacter cloacae* ATCC 700323, *Salmonella dublin* ATCC 9676, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y nueve aislados clínicos resistentes a meticilina: *Staphylococcus haemolyticus* (1129), *Staphylococcus aureus* (1058), *Staphylococcus simulans* (1050), *Staphylococcus haemolyticus* (562), *Staphylococcus hominis* (592), *Staphylococcus hominis* (596), *Staphylococcus haemolyticus* (731), *Staphylococcus haemolyticus* (1036) y *Staphylococcus epidermidis* (1042). Las cuales se mantuvieron en medio Mueller Hinton en refrigeración hasta ser utilizadas.

Para la prueba de actividad antibacteriana se realizaron suspensiones bacterianas de trabajo de cada uno de las bacterias, las cuales se estandarizaron con el nefelómetro 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) de Mc Farland, para después realizar diluciones 1/20.

Los extractos fueron diluidos con DMSO al 20%, posteriormente se colocaron en cajas Petri estériles en un rango de concentraciones de 2-16 mg mL<sup>-1</sup> para después adicionar 3 mL de agar Mueller Hinton, una vez solidificado el agar, fueron inoculadas con 2 µL de las suspensiones bacterianas de trabajo y posteriormente incubadas a 37 °C durante 24 h (Figura 3S).

Los controles utilizados fueron cajas únicamente con agar, para comprobar el crecimiento bacteriano de todas las bacterias ensayadas; DMSO, el cual nos indica la no interferencia durante el experimento y como control positivo se empleó el antibiótico Ceftazidima (Figura 3S). Finalmente se determinó la concentración mínima inhibitoria

(CMI), definida como la concentración más baja a la cual el extracto es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

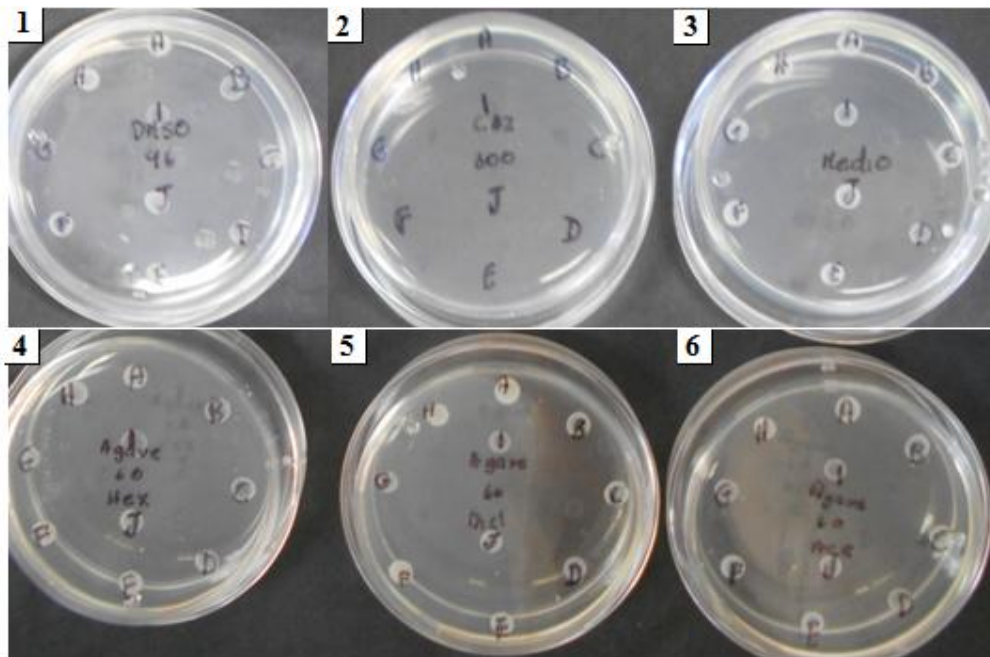


Figura 3S. Método de doble dilución en agar. 1. Control DMSO. 2. Control positivo (Ceftazidima,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). 3. Control negativo (medio de cultivo). 4 Extracto hexánico. 5. Extracto diclorometánico. 6. Extracto acetónico. Los círculos blancos dentro de las cajas corresponden al crecimiento bacteriano. A. *Staphylococcus haemolyticus* 1129, B. *Staphylococcus aureus* 1058, C. *Staphylococcus simulans* 1050, D. *Staphylococcus haemolyticus* 562, E. *Staphylococcus hominis* 592, F. *Staphylococcus hominis* 596, G. *Staphylococcus haemolyticus* 731, H. *Staphylococcus haemolyticus* 1036, I. *Staphylococcus epidermidis* 1042, J. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

## ANEXO 4

### Microdilución en caldo

Las bacterias empleadas fueron las mismas que las utilizadas en el anexo 3 y bajo las mismas condiciones. Las fracciones fueron disueltas en DMSO al 20%, se adicionaron en los pocillos de la placa de 96 en concentraciones de 2-16 mg mL<sup>-1</sup>, y se le agregaron 100 µl de caldo LB. Posteriormente fueron inoculadas con 2 µL de las suspensiones bacterianas e incubadas a 35 °C durante 24 h.

Una vez inoculado, a todos los pocillos se le adicionaron 20 µl de MTT, e incubado nuevamente a 35 °C durante 30 min. Finalmente se determinó la CMI, la interpretación se realizó de manera visual (Figura 4S), esto es mediante la observación en un cambio de coloración de amarillo a morado del colorante MTT, como consecuencia del metabolismo bacteriano.

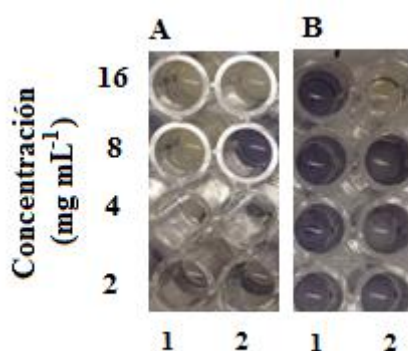


Figura 4S. CMI de las fracciones del extracto de diclorometano determinado mediante el método de microdilución en caldo. A. Fracción F34; B. F84. 1. *S. haemolyticus* 1036. 2. *S. hominis* 596.

## ANEXO 5

### Edema subplantar inducido por carragenina

Se realizaron 3 grupos de siete ratones de la siguiente manera: control negativo (agua/Tween 20 solución al 2 %; Merck, México), control positivo (indometacina 10 mg kg<sup>-1</sup> 99 % de pureza; Sigma-Aldrich Química, México) y grupo experimental (150 mg kg<sup>-1</sup> de extracto). La administración de los tratamientos fue vía oral (Figura 5S A), una hora después de la administración se indujo inflamación en la pata derecha de todos los ratones mediante la aplicación de 20 µL de λ-carragenina al 1% (Sigma-Aldrich Química, México).

El tamaño de las almohadillas plantares se midieron antes (tiempo = 0) y después (a las 1, 3 y 5 h) de la inyección de λ-carragenina usando un micrómetro digital (Ciudad de México, México) (Figura 5S B y C). Se realizó una curva dosis-efecto para el extracto de diclorometano cuyas concentraciones empleadas fueron 50, 100 y 150. El porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula: % de inhibición= [(control-tratamiento/control) X 100].



Figura 5S. A. Vía de administración (p.o.) de los diferentes tratamientos, B. Medida de la pata de los ratones. C. Inflamación de la pata derecha con λ-carragenina.

## ANEXO 6

### Edema auricular inducido por TPA

Se utilizaron tres grupos de ratones (siete ratones cada uno) colocados en cajas correspondientes al control negativo (TPA,  $2.5 \mu\text{g oreja}^{-1}$ ), control positivo (indometacina,  $1 \text{ mg oreja}^{-1}$ ) y experimental ( $2 \text{ mg extractos oreja}^{-1}$ ). Los tratamientos se aplicaron de manera tópica en la superficie interna ( $10 \mu\text{L}$ ) y externa ( $10 \mu\text{L}$ ) de la oreja derecha del ratón, dejando la oreja izquierda como control, a la que solo se le aplicó  $20 \mu\text{l}$  de vehículo (metanol) (Figura 6S).

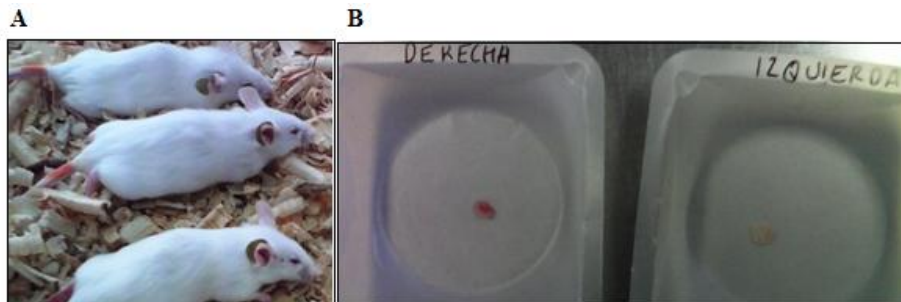


Figura 6S.A. Administración tópica de los diferentes tratamientos en la oreja derecha. B. de las orejas derechas e izquierda de los ratones para ser pesadas.

A todos los grupos se les administró  $20 \mu\text{l}$  de TPA, seguido de los diferentes tratamientos. Después de 5 h, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se cortaron secciones circulares de cada oreja (6 mm) las cuales fueron pesadas (Figura 6S B) para determinar el porcentaje de inhibición; para el extracto de diclorometano se realizó un curva dosis respuesta empleando concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 2 mg  $\text{oreja}^{-1}$ . El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación: % de inhibición=  $[(\text{peso oreja vehículo}-\text{peso oreja tratamiento}/\text{peso oreja vehículo}) \times 100]$ .

## ANEXO 7

### Caracterización fitoquímica

La caracterización fitoquímica se realizó mediante métodos cualitativos de acuerdo a lo reportado por Wagner y Sabine (2001). Se utilizaron cromatoplasmas que fueron vistas a luz UV (302 nm y 365 nm) y reveladas con revelador ácido como revelador universal (10% ácido sulfúrico concentrado, 20% etanol, 70% agua); además, se emplearon reveladores específicos: para la determinación de alcaloides se utilizó el reactivo Dragendorff (solución A: 0.85 g de nitrato de bismuto en 10 mL de ácido acético glaciar y 40 mL de agua; solución B: 8 g de yoduro de potasio en 30 mL de agua; mezclar A más B en proporción 1:1, coloración naranja-café se considera positiva); la determinación y esteroide se realizó con el reactivo de Liebermann-Burchard (5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado en 50 mL de etanol absoluto), calentar la cromatoplasma a 100 °C por 5 min y visualizar a luz UV a 365 nm. Coloración café se considera positiva); las antranas, antraquinonas y cumarinas se determinaron con el reactivo hidróxido de potasio (hidróxido de potasio etanólico al 5%. Coloración amarilla para antranas; rojas para antraquinonas y azul para cumarinas); para aceites esenciales se empleó el reactivo de vainillina-ácido sulfúrico (I: vainillina etanólica al 1% II: ácido sulfúrico etanólico al 10%, la cromatoplasma es impregnada con la solución I seguido de la solución II, calentar a 110 °C por 5 min coloración verde será positivo para aceites esenciales y color violeta para compuestos pungentes); para la identificación de lignanos se empleó el reactivo vainillina-ácido fosfórico (1 g de vainillina en 100 mL de ácido fosfórico al 50%, coloración violeta será positiva); las catequinas fueron identificados a través del reactivo vainillina-ácido clorhídrico; las saponinas se identificaron mediante el ensayo de espuma (a una pequeña cantidad de

extracto agregar agua caliente, agitar vigorosamente. La formación de espuma será considerada positiva).

### Resultados de la caracterización fitoquímica

La comparación fitoquímica de los extractos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (Figura 7S), dichas placas fueron observadas a través de luz UV (Figura 7SA y 7SB) y reveladas con revelador ácido (Figura 7SC). El perfil fitoquímico indica que para el extracto hexánico la mayoría de los compuestos son de baja y mediana polaridad, para el extracto diclorometánico se observan compuestos tanto polares como de baja y mediana polaridad y para el extracto acetónico los compuestos son polares con trazas de compuestos medianamente polares.

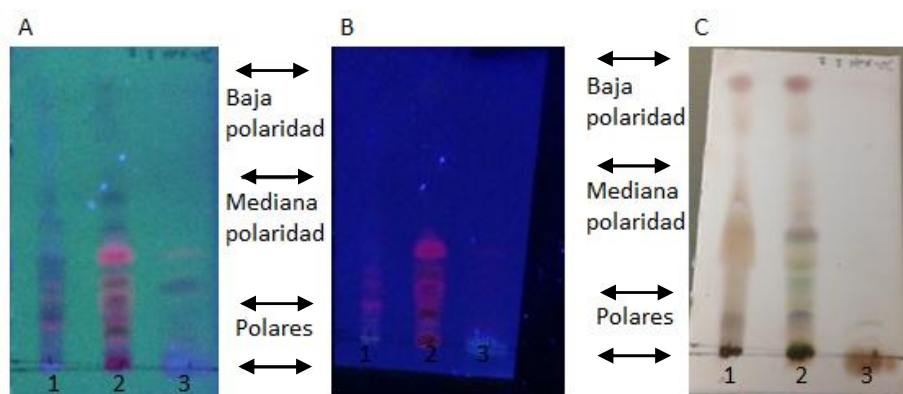


Figura 7S. Perfil cromatográfico de los extractos de hexano, diclorometano y acetona visto al UV 302 nm (A), 365 nm (B) y revelador ácido (C). 1. Extracto hexánico, 2. Extracto diclorometano, 3. Extracto acetónico. Sistema de elución hexano-acetona 7:3.

El perfil fitoquímico preliminar (Cuadro 1S) revela que el extracto hexánico presenta antronas, antroquinonas y cumarinas; el extracto diclorometánico presentan mayor cantidad de metabolitos, siendo éstos, alcaloides, antroquinonas, aceites esenciales y



compuestos pungentes y para el extracto acetónico solo se detectaron cumarinas y saponinas.

Cuadro 1S. Metabolitos presentes en los extractos íntegros de hojas de *Agave cupreata*

Metabolito	Extracto		
	Hexano	Diclorometano	Acetona
Alcaloides	-	+	-
Antronas	+	-	-
Antraquinonas	+	+	-
Cumarinas	+	-	+
Esteroides	-	-	-
Aceites esenciales	-	+	-
Compuestos pungentes	-	+	-
Saponinas	-	-	+
Lignanós	+	+	-
Catequinas	-	-	-

- Reacción negativa; + Reacción positiva