

PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE *Agave tequilana*. Weber

Háuad-Marroquín LA^{1*}, Rodríguez Padilla C², Franco M,² Castillo P²,
Vázquez Alvarado R³ y Rojas MA⁴

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

¹Laboratorio de Química, ²Laboratorio de Inmunología y Virología, ³ Facultad de Agronomía, UANL

Autor de correspondencia: * leticiahauad@gmail.com, Tel. 0052(81) 83294110

El género *Agave*, cuyo significado es “noble” o “admirable han sido utilizados por los habitantes de Mesoamérica desde hace aproximadamente 9,000 años (Callen 1965, citado por Gentry 1982). En general, antes de la llegada de los españoles la utilidad de los agaves fue para la producción de azúcares y fibras. Su uso decayó cuando el cultivo de la caña de azúcar llegó a México con los conquistadores. Especies de *Agave* importantes en la producción de fibras son el “henequén” (*Agave fourcroides*) y *Agave sisalana* (Gentry 1982). Sin embargo, estas fibras naturales están siendo desplazadas por las fibras sintéticas. Desde la antigüedad se han usado de manera tradicional según reportes en el Códice Badiano (1552). Los Aztecas se caracterizaron por realizar una clasificación de acuerdo al uso de cada planta asombrando a los europeos durante la conquista de América. En esta investigación se realizó un estudio fitoquímico a fin de tener extractos de polaridad creciente, estos fueron sometidos a pruebas para determinar su actividad citotóxica. (Háuad 2009). El ensayo de proliferación celular por MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) desarrollado por Mossman, es un método simple, versátil y comúnmente usado para la determinación de la viabilidad celular y evaluación del efecto de diferentes productos de acción biológica (agentes citotóxicos). Para determinar el efecto de cada extracto, en una placa de 96 pozos de fondo plano se sembraron 5,000 células B16F10/pozo y se incubaron durante una noche en 200 μ L de medio RPMI1640/10% SFB en una atmósfera a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂. Al término de la incubación, se aplicaron los siguientes tratamientos: IMMUNEPOTENT CRP, en diferentes concentraciones (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 μ L) de cada extracto terminado el período de incubación se leyó la absorbancia se determinó a 540nm mediante un lector de ELISA Bio-tek Instruments, Inc. (Winooski, VT) modelo EL311, Hamburg. Los resultados se muestran como el porcentaje de viabilidad celular relativa (VCR). Todos los extractos obtenidos presentaron una citotoxicidad variable.

Palabras clave: citotoxicidad, *Agave tequilana*, viabilidad celular, melanoma murino B16F10

Agave gender whose meaning is “noble” or “admirable, the inhabitants of Mesoamérica used this term since approximately 9,000 years (Callen 1965, mentioned by Gentry 1982). In general, before the arrival of the Spanish, the utility of Agave was for the production of you sugar and fibers. The Agave use decayed when the sugar cane arrived in Mexico with the conquerors. Important Agave species in the production of fibers are the “henequen” (Agave fourcroides) and Agave sisalana (Gentry 1982). However, these natural fibers are being displaced by the synthetic fibers. From the ancients they have been used in a traditional way according to reports in the Badiano Codice (1552). The Aztecs were characterized to carry out a classification according to the use of each plant, astonishing the Europeans during the conquest of America. In this research one study was carries out in order to have extracts of growing polarity. These extracts were subjected to tests cytotoxicity activity. (Háud 2009). The cellular proliferation trial by MTT (Bromide of 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) developed by Mossman, is a simple and versatile method. Commonly it is used for determination of cellular viability and the evaluation of different products of biological action (Cytotoxicity agents). To determine the effect of each extract, in a plate of 96 deep badge of plane bottom 5,000 cells B16F10/pozo were sowed and incubated during one night in 200 µL

The used media was RPMI1640/10% SFB in an atmosphere at 37°C, 95% O₂ and 5% CO₂. At the end of the incubation, the following treatments were applied: IMMUNEPOTENT CRP, in different concentrations (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 µL) of each extract, end the absorbance was read. It was determined at 540nm by means of a reader delISA Bio-tek Instruments, Inc. (Winooski, VT), model EL311, Hamburg. The results are shown as the percentage of relative cellular viability (VCR). All the obtained extracts presented a variable cytotoxicity.

Index words: Cytotoxicity, *Agave tequilana*, cellular viability, murino melanoma B16F10

Recibido: Abril 25 de 2010. Aceptado: Julio 1 de 2010

INTRODUCCIÓN

El *Agave tequilana* presenta metabolismo ácido de las crasuláceas. Este tipo de metabolismo se descubrió en especies de la familia Crassulaceae, razón por la cual a los vegetales que lo presentan se les denomina plantas CAM (por sus siglas en inglés). Este metabolismo se caracteriza por que los estomas se mantienen abiertos durante la noche para absorber bióxido de carbono, en tanto que en el día los estomas permanecen cerrados para evitar la pérdida de humedad. Los agaves, al igual que otras plantas CAM, almacenan el bióxido de carbono que fijan durante el periodo de oscuridad (por la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa-PEPcase) en forma de ácidos orgánicos, por lo cual tienden a incrementar la acidez por las noches. Se ha encontrado que las temperaturas cálidas nocturnas reducen la actividad de la mencionada enzima (Pimienta *et al.*, 2000), por lo cual disminuye también la producción de azúcares y la consecuente acumulación de los mismos en los tejidos de

reserva (Pimienta *et al.*, 1999). El metabolismo CAM es un mecanismo de adaptación de las plantas de zonas áridas para facilitar la fotosíntesis y ahorrar agua (Nobel y Hartscock 1976, Kluge 1979, Nobel 1994).

Agave tequilana Weber “azul”. Descripción

Planta de 1.5 a 1.8 m de alto; tallo reducido y cubierto por las hojas las cuales se encuentran aglomeradas formando una roseta. Hojas lanceoladas, de color azul glauco, de 1 a 1.45 m de largo y 7 a 11 cm de ancho en la parte media, con una espina apical de 8 a 20 mm de largo y numerosos dientes marginales curvados, ganchudos, de 5 a 6 mm de largo. Inflorescencia de 3 a 6 m de longitud, con 20 a 35 ramificaciones en cuyos extremos se encuentran las flores. Flores color verde amarillento, el ovario 23 a 38 mm de largo y 7 mm de diámetro, estambres color amarillento. Fruto seco cuando maduro, capsular, de alrededor de 3.5 cm de largo y 2.4 cm de diámetro. Semillas aplanadas, de color negro. Florece de junio a agosto, fructifica de septiembre a diciembre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de Extractos de Agave

En Las pencas de se sometieron a extracciones exhaustivas a través de solventes de polaridad creciente a fin de obtener los diferentes compuestos químicos de interés terapéutico. El proceso se llevó a cabo utilizando extractores soxhlet a fin de obtener extractos a las 46 horas, posteriormente las fracciones de cada solvente se sometieron a evaporación con un Rotavapor Büchi y llevadas a sequedad bajo presión reducida. Se realizaron cromatografías en ccd con una variedad de solventes y determinar los compuestos presentes determinando su Rf, observación bajo luz ultra violeta. Sometidos los extractos a pruebas químicas para determinar la presencia de sustancias como son: sapogeninas esteroidales, de donde se pueden derivar compuestos anticonceptivos, antiinflamatorios y hormonas sexuales., pruebas para azúcares ya se han reportado en cantidades considerables.(Háuad *et al.*, 2009) Posteriormente los extractos de agave fueron sometidos a pruebas biológicas y determinar así su grado de citotoxicidad mediante la técnica de MTT.

Ensayo de viabilidad celular mediante la técnica de MTT

El ensayo de proliferación celular por MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) desarrollado por Mossman, es un método simple, versátil y comúnmente usado para la determinación de la viabilidad celular y evaluación del efecto de diferentes productos de acción biológica (agentes citotóxicos). Para determinar el efecto de cada extracto, en una placa de 96 pozos de fondo plano se sembraron 5,000 células B16F10/pozo y se incubaron durante una noche en 200 μ L de medio RPMI1640/10% SFB en una atmósfera a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂. Al término de la incubación, se aplicaron los siguientes tratamientos: Agave tequilana metanólico, Agave tequilana clorofórmico, Agave tequilana hexano (polvo), , en diferentes concentraciones (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 μ L) de cada extracto.

Posteriormente se incubaron durante 72 h en una atmósfera a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂, se lavaron con medio RPMI1640/10% SFB y se adicionaron 20 μ L de MTT (Sigma, USA)(5mg/ml) por pozo y se incubaron en una atmósfera a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂ durante un período de 2-4 horas, para disolver los gránulos de formazan, se adicionaron 80 μ L de DMSO y la absorbancia se determinó a 540nm mediante un lector delISA Bio-tek Instruments, Inc. (Winooski, VT) modelo EL311, Hamburg. Los resultados se muestran como el porcentaje de viabilidad celular relativa (VCR).

RESULTADOS

Efecto de los diferentes extractos sobre la viabilidad de las células de melanoma murino B16F10

Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con *Agave tequilana* metanólico, *Agave tequilana* clorofórmico, *Agave tequilana* hexano (polvo), afectaron el crecimiento de las células B16F10 de una manera dependiente de dosis: En el caso de *Agave tequilana*, podemos observar que en todos los casos hay un efecto citotóxico a partir de la dosis de 30 μ L tal como se muestran a continuación: *Agave tequilana* metanólico, 30 μ L (86.84% VCR), 60 μ L (81.73% VCR), 90 μ L (73.27% VCR), 120 μ L (65.83% VCR), 150 μ L (61.59% VCR), 180 μ L (56.20% VCR), 200 μ L (55.55% VCR). *Agave tequilana* clorofórmico 30 μ L (59.84% VCR), 60 μ L (59.84% VCR), 90 μ L (58.97% VCR), 120 μ L (58.43% VCR), 150 μ L (57.83% VCR), 180 μ L (55.93% VCR), 200 μ L (55.82% VCR). *Agave tequilana* hexano (polvo) 30 μ L (85.14% VCR), 60 μ L (80.29% VCR), 90 μ L (76.89% VCR), 120 μ L (66.50% VCR), 150 μ L (66.27% VCR), 180 μ L (68.29% VCR), 200 μ L (67.37% VCR). Sin embargo podemos observar que el mayor efecto obtenido es del extracto metanólico a una concentración de 200 μ L, dejando 55.55% de VCR, a diferencia de los extractos cloroformico y hexano donde se obtienen 55.88% y 67.37% de VCR a una concentración

de 200 μ L respectivamente, tal como se observa en las Figuras 1, 2, 3, y donde podemos observar que el efecto citotóxico celular de los

extractos se incrementa de una manera tiempo, dosis dependiente ($P < 0.05$).

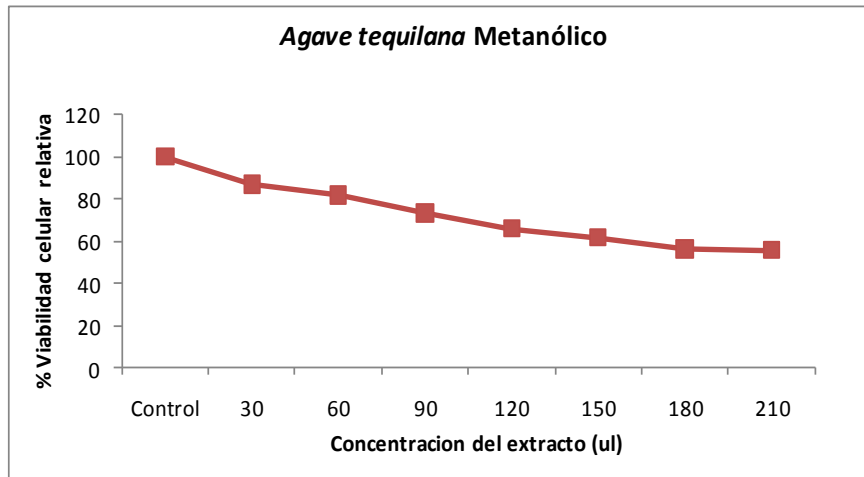


Figura 1. Efecto del Extracto Metanólico de *A. tequilana* sobre las células de Melanoma B16F10: 5,000 células fueron tratadas con diluciones del extracto a una concentración de 1.38 mg/m; e incubadas a 37° C en una atmósfera de 95 % CO₂, durante un período de 72 hrs. Adicionadas de 20 μ L de MTT y se incubaron 4 hrs. Posteriormente se adicionó Buffer de lisis y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. La D.O. se leyó a 540 nm. Los datos representan por triplicado las medias con su D.S. La viabilidad celular se representa como el % de células vivas * $P < 0.05$ en comparación con el control.

1
1

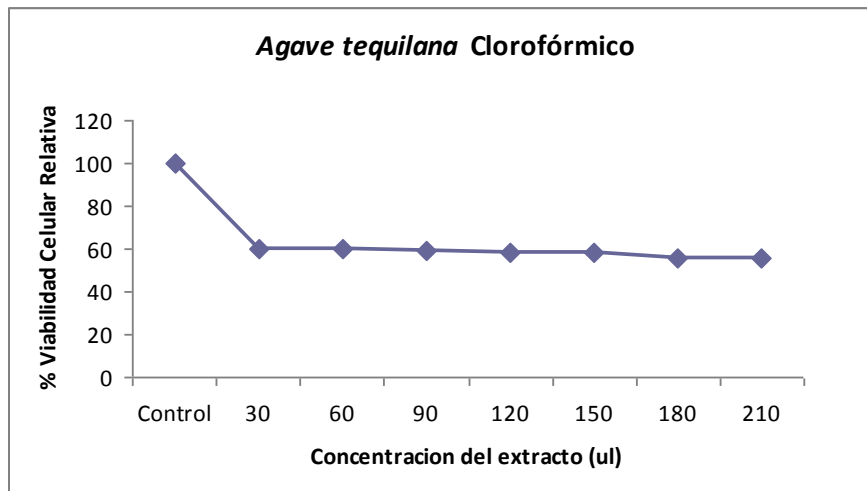


Figura 2. Efecto del Agave tequilana clorofórmico sobre las células de Melanoma B16F10: 5,000 células B16F10, fueron tratadas con diluciones de Agave tequilana clorofórmico a una concentración de 1.38mg/ml e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% O₂ y 5% CO₂ durante 72 hrs. Luego, se les agregaron 20 ml de MTT y se incubaron durante 4 hrs. Posteriormente se les agregaron 80ml de Buffer de lisis y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La D.O. de las muestras fueron leídas a 540 nm. Los datos representan por triplicado las medias con su DS. La viabilidad celular es representada como el % de células vivas. * $P < 0.05$ en comparación con el control.

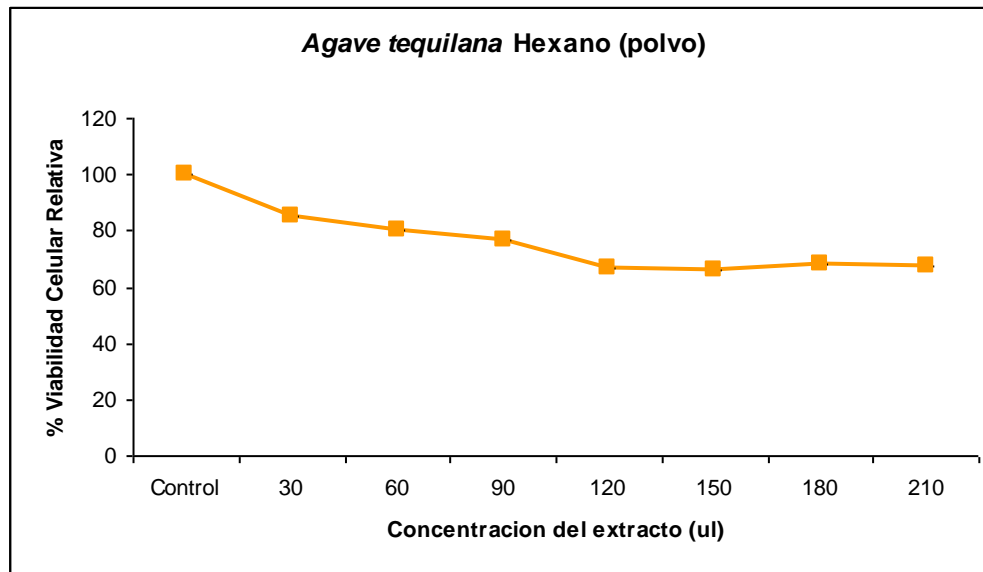


Figura 3. Efecto del Agave tequilana hexano sobre las células de Melanoma B16F10: 5,000 células B16F10, fueron tratadas con diluciones de Agave tequilana hexano (polvo) a una concentración de 1.38mg/ml e incubadas a 37°C en una atmósfera a 95% O₂ y 5% CO₂, durante 72 hrs. Luego, se les agregaron 20 ml de MTT y se incubaron durante 4 hrs. Posteriormente se les agregaron 80ml de Buffer de lisis y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La D.O. de las muestras fueron leídas a 540 nm. Los datos representan por triplicado las medias con su DS. La viabilidad celular relativa es representada como el % de células vivas. * $P < 0.05$ en comparación con el control.

CONCLUSIONES

De esta investigación destaca la capacidad de inhibición de las células de melanoma murino B16F10 a partir de 30 microlitros (1.38 mg/ml), lo que pone en evidencia la presencia de productos químicos de importante actividad biológica en particular citotóxica. Ello nos motiva a continuar el monitoreo de cada extracto hasta el aislamiento de compuestos puros. Su identificación y elucidación de las estructuras químicas presentes utilizando para ello métodos espectroscópicos tales como: I.R., R.M.N., S.M. entre otros.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración y el apoyo de la UANL en programa Paicyt por el financiamiento del proyecto de C. Académicos de Química Biológica 2009, así como también a todos los

estudiantes involucrados en investigación y formación académica. UANL. Andrea Rojas Mercado., Selegna E. Lara Vasquez, David Abraham Lázaro López.

REFERENCIAS

- Breitung AJ. 1968. The agaves. Cactus and Succulent Journal. 1968 Yearbook. Reprint by Abbey Garden Press, Reseda, California, 107 pp.
- García-Galindo J. 2004. Ecofisiología de Plantas Jóvenes del Agave Azul (Agave tequilana) Weber, Tesis de Maestría, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.
- Gentry HS. 1972. The Agave family in Sonora. Agriculture Handbook 399. United States Department of Agriculture, Washington, D. C. 195 pp.

- Gentry HS. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, U.S.A. 670 pp.
- Gómez-Flores R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Monreal-Cuevas E, Háuad Marroquín LA, Cordova-Puente C, Rangel-Llanas A. 2006. In vitro Antibacterial and Antifungal Activities of *Nopalea cochenillifera* Pad Extracts. *Am J Infect Dis* 2(1):1–8,
- Háuad-Marroquín LA, Córdoba-Puente C, Rangel-Llanas A, García-González S, González LR, C. Rodríguez-Padilla C. 2009. Evaluación de los Efectos del Extracto de *Nopalea cochenillifera* en la Actividad Antimicrobiana In vitro. *RESPYN*, Edición especial “VII Simposium Nacional: Taller de Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México” 2:123–134
- Kluge M. 1979. Photosynthesis II photosynthetic, carbon metabolism and related process, The flow of carbon in Crassulacean acid Metabolism (CAM). In: Gibbs, M. y E. Latzko. *Encyclopedia of plants physiology*. New series. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. Tomo 2. Ed Springer-Verlag. pp 113–125.
- Mabberley DJ. 1990. *The plant book. A portable dictionary of the higher plants*. Cambridge University Press, Great Britain, 707 pp.
- McVaugh R. 1989. Bromeliaceae to Dioscoreaceae. *Flora Novo-Galiciana*. Vol. 15. The University of Michigan Herbarium. 398 pp.
- Nobel PS, Hartsock TL. 1976. Watering converts a CAM plants to daytime CO₂ uptake. *Nature*. 262:574–576.
- Nobel PS. 1994. *Remarkable agaves and cacti*. Cambridge University Press. New York. USA. 166 p.
- Pimienta-Barrios E, Robles-Murguía C, Ruíz-Corral JA, Nobel PS, García-Galindo J. 1999. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el estado de Jalisco. Ed. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. 47 p.
- Pimienta-Barrios E, Zañudo J, Yopez E, Pimienta-Barrios E, Nobel PS. 2000. Seasonal variation of net CO₂ uptake for cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) and pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) in a semi-arid environment. *Journal of Arid. Enviroments* 44:73–83.
- Ramos-Nino ME, Giovina ., Sabo-Attwood T, Mutti L, Porta C, Heintz N, Mossman BT. 2005. Human mesothelioma cells exhibit tumor cell-specific differences in phosphatidylinositol 3-kinase/AKT activity that predict the efficacy of Onconase *Mol Cancer Ther.* 4:835–842
- Valenzuela ZAG. 1997. El agave tequilero, su cultivo e industria. *Litteris editores*. 204 p.



“El abuelo” Retrato tarahumara a lápiz
Por Marco Antonio Juárez-Aguilar

Toctli – Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica
Es una publicación de Red CIB
Certificado de reserva de INDAUTOR: 04-2009-090711155800-102



Red de Comunicación e Integración Biomédica

<http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB>

Cd. Juárez, Chih., México 2010.