



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

## TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DEL  
ESCAPO FLORAL DE *Agave salmiana*”**

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS EN  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**PRESENTA:**

M. en C. MARIA IVETTE MEDINA GALVÁN

**DIRECTOR:**

DRA. AUREA BERNARDINO NICANOR

**CO-DIRECTOR:**

DR. JAVIER CASTRO ROSAS



NOVIEMBRE, 2018

CELAYA, GTO., MÉXICO

Celaya, Gto., 07/Noviembre/2018

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

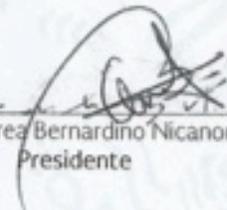
No. de Oficio PIBQ-02-02-2018

ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ  
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
PRESENTE.

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, con el fin de determinar la aprobación de impresión del proyecto del Programa del Doctorado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulado:

**"IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DEL ESCAPO FLORAL DE *Agave salmiana*"**

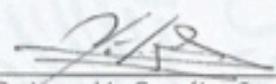
Presentado por el (la) pasante: **C. M.C. María Ivette Medina Galván**, comunicamos a Usted que esta Comisión Revisora ha tenido a bien aprobar la impresión de este trabajo.



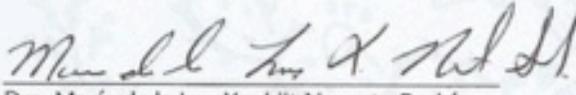
Dra. Aurea Bernardino Nicanor  
Presidente



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE CELAYA  
POSGRADO ING. BIOQUÍMICA



Dr. Leopoldo González Cruz  
Secretario



Dra. María de la Luz Xochilt Negrete Rodríguez  
Vocal

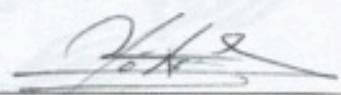


Dr. Javier Castro Rosas  
Co-director



Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa  
Asesor Externo

Vo. Bo.



DR. LEOPOLDO GONZÁLEZ CRUZ  
COORDINADOR DEL POSGRADO  
INGENIERIA BIOQUÍMICA

## **DEDICATORIA**

A Dios ser maravilloso que me dió fuerza y fe para creer lo que me parecía imposible de terminar, porque al trabajar bajo su mano, recibí aliento y consuelo para vencer los obstáculos que encontré en el camino.

A mi esposo Francisco Gómez, por su paciencia, su comprensión, por su amor, por apoyarme y cuidarme en esos malos ratos, porque tú sabes lo difícil que fue y siempre estuviste conmigo para alentarme durante todo este trabajo.

A mis hijos Santiago y Gabriel, que a pesar de su corta edad, mostraron madurez para entender lo complicado de este trabajo, brindándome paciencia y muchos abrazos. Son mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y espero poder llegar a ser un ejemplo para ustedes.

A mis padres J. Félix y Silva Galván, por su comprensión y ayuda en los malos y buenos momentos. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Así también por apoyarme en cuidar de mis hijos mientras yo realizaba investigaciones y por estar a mi lado en cada momento de mi vida.

A mis hermanos Xochitl, Michelle e Iván, por las risas y los buenos momentos que me ayudaron sobrellevar el estrés del trabajo y su apoyo con mis hijos cuando más lo necesitaba.

A mi otra familia, Gómez Olvera, por su apoyo y aliento en todos los aspectos de mi vida, incluyendo el término de este proyecto profesional.

A todos ellos,

Muchas gracias de todo corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco sinceramente a mi directora y tutora de Tesis, la Dra. Aurea Bernardino Nicanor y al Dr. Leopoldo González Cruz por su esfuerzo y dedicación en este proyecto. Sus conocimientos, consejos, su guía, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como doctora en ciencias.

También me gustaría agradecer el apoyo y consejos recibidos a lo largo de estos 4 años y medio al Dr. José Mayolo Simitrio Juárez Goíz, que me ayudo a no decaer en el proceso.

De igual manera agradecer al Dr. Javier Castro Rosas y a al Dr. Carlos Alberto Gómez aldapa, profesores investigadores de la UAEH, por su cálido recibimiento en mis estadías en la universidad, por su apoyo, por su paciencia, por su trato humano y su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, que ayudaron a formarme como persona e investigador.

A la Ing. Eva y familia, por su amistad y apoyo total en la estancia que realicé en Pachuca, Hidalgo. Les agradezco sus grandes atenciones y hospitalidad.

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecida a todos mis compañeros de trabajo, al M. en C. Gerardo Teniente, a la M. en C. Jocelyn Hernández, a la Ing. Iraida, y a las personas de servicio social que me apoyaron bastante. Para mí, son los mejores compañeros que se pueden tener. El ambiente de trabajo creado fue simplemente perfecto, y su visión, motivación y optimismo me ayudaron en momentos muy críticos de la tesis.

Para ellos,  
muchas gracias por todo.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Importancia de los agaves en México .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Especie <i>Agave salmiana</i> .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Taxonomía .....	7
1.2.2 Distribución geográfica.....	7
1.2.3 Importancia socioeconómica.....	8
1.2.4 Morfología .....	9
1.2.5 Sistemas de reproducción.....	10
1.2.6 Crecimiento y maduración.....	11
<b>1.3 Escapo floral.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Escapo floral en el género <i>Agave</i> .....	14
<b>1.4 Compuestos bioactivos a partir de fuentes vegetales .....</b>	<b>17</b>
1.4.1 Compuestos bioactivos en el género <i>Agave</i> .....	19
<b>1.5 Compuestos con actividad antioxidante y compuestos fenólicos en plantas .....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Compuestos con actividad antioxidante y compuestos fenólicos en el género <i>Agave</i> .....	25
<b>1.6 Compuestos con actividad antimicrobiana en plantas.....</b>	<b>26</b>
1.6.1 Compuestos con actividad antimicrobiana en el género <i>Agave</i> .....	30
<b>1.7 Procesos de extracción de compuestos con actividad biológica.....</b>	<b>31</b>
1.7.1 Efecto del uso de disolventes en la obtención de extractos con actividad biológica	35
1.7.2 Tipos de interacción entre el disolvente extractor y materia prima vegetal.....	40
1.7.2.1 Interacción individual .....	40
1.7.2.2 Interacción dual .....	41

1.7.2.3 Interacción secuencial.....	41
<b>1.8 Microorganismos patógenos de interés en la industria alimentaria .....</b>	<b>42</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>46</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1 Material vegetal .....</b>	<b>48</b>
<b>2.2 Obtención de extractos y rendimiento .....</b>	<b>48</b>
2.2.1 Extracto crudo .....	48
2.2.2 Extracción individual (etanol o agua) .....	49
2.2.3 Extracción dual (etanol-agua) .....	49
2.2.4 Extracción dual-secuencial .....	49
2.2.5 Extracción secuencial.....	50
<b>2.3 Determinación de la actividad antioxidante.....</b>	<b>50</b>
2.3.1 DPPH .....	50
2.3.2 FRAP.....	51
2.3.3 ABTS <sup>+</sup> .....	51
<b>2.4 Identificación y extracción de grupos de compuestos bioactivos .....</b>	<b>52</b>
2.4.1 Determinación de contenido de fenoles totales .....	52
2.4.2 Fenoles simples .....	52
2.4.3 Flavonoides .....	53
2.4.4 Taninos.....	53
2.4.5 Alcaloides.....	54
2.4.6 Saponinas .....	55
2.4.7 Determinación de proteína .....	56
2.4.8 Precipitación de proteína.....	56
<b>2.5 Actividad antimicrobiana .....</b>	<b>57</b>
2.5.1 Cepas bacterianas.....	57
2.5.2 Preparación del inóculo.....	57

2.5.3 Técnica de difusión en placa .....	57
2.5.4 Concentración mínima inhibitoria .....	58
<b>2.6 Desarrollo experimental.....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre el rendimiento de extracción.....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antioxidante en los extractos .....</b>	<b>64</b>
<b>3.3 Identificación de los principales grupos de compuestos bioactivos presentes en los extractos.....</b>	<b>68</b>
<b>3.4 Cuantificación de los principales grupos de compuestos presentes en los extractos.....</b>	<b>72</b>
<b>3.5 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de Agave salmiana .....</b>	<b>82</b>
<b>3.6 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antimicrobiana en los extractos.....</b>	<b>97</b>
<b>3.7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos.....</b>	<b>99</b>
<b>3.8 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antimicrobiana en los compuestos bioactivos .....</b>	<b>102</b>
<b>3.9 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos bioactivos .....</b>	<b>106</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>116</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Principales usos del género <i>Agave</i> .....	4
<b>Tabla 1.2</b> Especies de <i>Agave</i> estudiadas por sus propiedades biológicas .....	6
<b>Tabla 1.3</b> Clasificación taxonómica del <i>Agave salmiana</i> .....	7
<b>Tabla 1.4</b> Composición porcentual de escapo de <i>Agave salmiana</i> .....	16
<b>Tabla 1.5</b> Determinación de la actividad antioxidante promedio de escapos florales de <i>Agave salmiana</i> .....	16
<b>Tabla 1.6</b> Comparación de CMI de diferentes plantas y escapos de <i>Agave salmiana</i> .....	17
<b>Tabla 1.7</b> Principales compuestos bioactivos presentes en plantas .....	18
<b>Tabla 1.8</b> Compuestos aislados de plantas del género <i>Agave</i> y sus actividades biológicas.....	22
<b>Tabla 1.9</b> Mecanismo de acción de los principales grupos de compuestos con actividad antioxidante aislados de plantas .....	24
<b>Tabla 1.10</b> Mecanismo de acción de los principales grupos de compuestos con actividad antimicrobiana aislados de plantas .....	29
<b>Tabla 1.11</b> Principales parámetros de solubilidad de algunos disolventes.....	38
<b>Tabla 1.12</b> Disolventes utilizados para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas.....	39
<b>Tabla 1.13</b> Características generales de los principales microorganismos patógenos de interés en la industria alimentaria .....	44
<b>Tabla 1.14</b> Preparación de reactivos para la cuantificación de taninos .....	54
<b>Tabla 1.15</b> Capacidad de extracción de los disolventes sobre compuestos de los escapos florales de <i>Agave salmiana</i> .....	63
<b>Tabla 1.16</b> Determinación de la actividad antioxidante y fenoles totales de extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	66
<b>Tabla 1.17</b> Contribución porcentual de los compuestos bioactivos presentes en el escapo de <i>Agave salmiana</i> .....	67
<b>Tabla 1.18</b> Identificación de los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	71
<b>Tabla 1.19</b> Determinación de actividad antioxidante de compuestos bioactivos de extractos de escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	94
<b>Tabla 1.20</b> Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	99
<b>Tabla 1.21</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	102
<b>Tabla 1.22</b> Determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos presentes en los extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	105
<b>Tabla 1.23</b> Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos bioactivos presentes en los extractos del escapo floral de <i>Agave salmiana</i> .....	109
<b>Tabla 1.24</b> Comparación de CMI de diferentes plantas .....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Distribución en México de <i>Agave salmiana</i> .....	8
<b>Figura 1.2</b> Morfología de los dos tipos de escapo del género <i>Agave</i> A) tipo paniculado, B) tipo espigado. ....	9
<b>Figura 1.3</b> Componentes de <i>Agave salmiana</i> A) Flores, B) Escapo, C) Fruto y D) Semilla ...	10
<b>Figura 1.4</b> Agentes polinizadores de género <i>Agave</i> . A) Murciélago, B) Colibrí .....	11
<b>Figura 1.5</b> Desarrollo en <i>Agave salmiana</i> A) Yemas auxiliares, B) Hijuelos por enraizamiento. ....	11
<b>Figura 1.6</b> Marcas desarrolladas durante el proceso de crecimiento de la hoja de <i>Agave salmiana</i> .....	12
<b>Figura 1.7</b> A) Inflorescencia de <i>Agave salmiana</i> , B) Flores de <i>Agave salmiana</i> .....	13
<b>Figura 1.8</b> Proceso de extracción vegetal por el método de maceración. 1.- Maceración, 2.- Filtración y 3.-Recolección .....	32
<b>Figura 1.9</b> Equipo de extracción tipo percolador A) Partes principales, B) Montaje en laboratorio .....	33
<b>Figura 1.10</b> Tipos de equipo para los métodos de destilación por arrastre de vapor A) Método directo, B) Método de vapor vivo .....	35
<b>Figura 2.1</b> Escapo floral de mediana madurez (250 cm) de <i>Agave salmiana</i> y sus secciones.	48
<b>Figura 2.2</b> Secuencia para determinar la inhibición microbiana de los extractos, A) distribución de los sitios de aplicación de los extractos, B) superficie de acción de los extractos colocados en el agar, C) halos de inhibición producidas por extractos contra <i>E. coli</i> (círculos rojos).....	57
<b>Figura 2.3</b> Procedimiento de diluciones de muestras en la técnica de CMI.....	58
<b>Figura 2.4</b> Esquema general del proceso del proyecto. ....	60

## RESUMEN

*Agave salmiana* ha tomado gran importancia en el área de investigación, debido a las aplicaciones nutraceuticas, que muchos de sus compuestos han mostrado, sin embargo los análisis realizados hasta el momento, se han enfocado únicamente a sus flores, raíces y hojas, sin considerar la estructura floral, la cual en un estudio reciente se logró demostrar que tanto la longitud del escapo floral como la sección analizada, son parámetros que influyen sobre la composición química proximal, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana, siendo los escapos de 250 cm y la sección media, las estructuras que mostraron mayor concentración de compuestos bioactivos, los cuales, podrían tener impacto en la industria alimentaria, sin embargo, hasta el momento se desconoce que compuesto o grupo de compuestos son los responsables de dichas actividades, lo cual es parte fundamental en el proceso de caracterización y aplicación de compuestos de interés industrial, es por ello que el objetivo del presente trabajo consistió en, identificar los principales grupos de compuestos responsables de la actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto obtenido del escapo floral de *Agave salmiana*, así como evaluar el efecto de los disolventes y tipo de extracción sobre la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos obtenidos. Para lo cual, se utilizó la sección media del escapo floral con altura aproximada de 250 cm, a partir de la cual se realizaron 15 extracciones usando técnicas de interacción de tipo dual y secuencial entre disolventes, utilizando 5 disolventes de diferente polaridad. Se determinó la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos, se seleccionó aquellos que obtuvieron los mejores resultados en ambas determinaciones y se identificó en fresco los principales grupos de compuestos responsables de dichas propiedades bioactivas, clasificadas como compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y taninos), compuestos que contienen nitrógeno (alcaloides y proteínas) y saponinas (terpenos y otros). Los resultados indican que tanto el tipo de extracción como la polaridad de los disolventes utilizados influyen en la extracción, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de los metabolitos analizados, donde la estructura del compuesto, tipo, posición y cantidad de grupos secundarios unidos a los compuestos y polaridad de los compuestos fueron factores importantes en la variabilidad de los resultados.

## ABSTRACT

*Agave Salmiana* it is a plant with great importance in the research area, due to the various nutraceutical applications of their isolated compounds, however the analyzes carried out so far, have focused only on its flowers, roots and leaves, without considering the floral structure, which in a recent study it was demonstrated that both the length of the floral scape and the section analyzed, are parameters that influence the proximal chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity, being the escapes of 250 cm and the middle section, the structures that showed a higher concentration of bioactive compounds, which could have an impact on the food industry, however, until now it is unknown which compound or group of compounds are responsible for these activities, which is a fundamental part in the process of characterization and application of compounds of industrial interest, that is why the objective of the present work consisted in identifying the main groups of compounds responsible for the antimicrobial and antioxidant activity of the extract obtained from the *Agave salmiana* floral scape, as well as evaluating the effect of the solvents and type of extraction on the antioxidant and antimicrobial capacity of the extracts. obtained. For this, the middle section of the floral scape with an approximate height of 250 cm was used, from which 15 extractions were made using dual and sequential type interaction techniques between solvents, using 5 solvents of different polarity. The antioxidant and antimicrobial activity of the extracts was determined, the extracts with the best results in both determinations were selected and the main groups of compounds responsible for these bioactive properties were identified in fresh, classified as phenolic compounds (simple phenols, flavonoids and tannins), compounds that contain nitrogen (alkaloids and proteins) and saponins (terpenes and others). The results indicate that the type of extraction and the polarity of the solvents used influence the yield extraction, antioxidant activity and antimicrobial activity of the analyzed metabolites, where the structure of the compound, type, position and number of secondary groups bound to the compounds and polarity of the compounds were important factors in the variability of the results.

## INTRODUCCIÓN

El escapo floral es un tallo, que emerge del rizoma de una planta, no presenta hojas, sin embargo, puede desarrollar inflorescencias en el ápice. Sus características morfológicas como altura, grosor, coloración, incluso desarrollo de la inflorescencia dependerán de la familia a la que pertenezca la planta, siendo las principales en presentar esta estructura las Violaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Agavaceae, Papaveraceae, Droseraceae, y Bromeliaceae (Lira *et al.*, 2016). En la planta, el desarrollo del escapo floral indica madurez vegetativa, debido a que una vez que inicia su desarrollo comienza la etapa de floración, por lo cual en diversos estudios han empleado parámetros de crecimiento de esta estructura como indicativos de producción vegetal (Proença *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2013). En el género *Agave* el escapo, nace de la parte media del meristemo central (“piña o cabeza”) como una larga porción terminal recta que puede alcanzar hasta 18 m de largo dependiendo la especie (Nava-Cruz *et al.*, 2015). Debido a su estructura fibrosa, es utilizado principalmente como material de construcción, sus flores son utilizadas como ingrediente para la elaboración de platillos tradicionales en diferentes regiones del país y en algunos lugares se utiliza tradicionalmente como desparasitante para rumiantes (Escamilla-Treviño, 2012), aun cuando el escapo presenta algunas aplicaciones, son pocos los estudios realizados para el análisis de esta estructura, quizá debido a que es poco conocida y porque sus usos principales no representan beneficios económicos importantes. Estos estudios en su mayoría, han sido de tipo exploratorios iniciando en 1953 y 1954 Srinivasan y Bhatia analizaron la naturaleza y distribución de los carbohidratos presentes en el escapo de *Agave vera cruz*, seguido de un estudio realizado por Bhatia *et al.* (1955), en el cual se aisló y examinaron las propiedades de la enzima trans-fructosidasa, la cual interviene en la síntesis de glucofructanos a partir de sacarosa, Figueredo en 2011 se enfocó a la fenología de floración y fructificación del escapo de *Agave cocui*, Brena-Bustamante 2013, analizaron el escapo de *Agave kerchovei*, para establecer el uso tradicional. En *Agave salmiana* no se tienen reportes sobre estudios realizados al escapo, sin embargo, García-Herrera *et al.* (2010) mencionan que esta estructura se ha utilizado tradicionalmente como agente desparasitante de rumiantes lo cual es un indicio de la posible presencia de compuestos con actividad biológica, que podrían ser aprovechados en el área de alimentos. Estudios efectuados a hojas y flores de *Agave salmiana* indican la presencia de diversos compuestos bioactivos como saponinas (triterpenos),

alcaloides, taninos, triterpenos glicosilados (Fernández, 2008; Calange, 2011) y flavonoides que poseen propiedades antioxidantes, antifúngicas y antimicrobianas (Castillo *et al.*, 2007), lo cual sugiere que posiblemente durante el desarrollo de la planta estos compuestos también se encuentren en el escapo floral.

Cuando se realiza la obtención de compuestos nutraceuticos, a partir de fuentes vegetales existen factores que pueden afectar la actividad biológica de los compuestos extraídos, tales como; naturaleza química del disolvente, relación sólido/líquido, temperatura, tiempo y tipo de extracción y tratamiento posterior a la extracción, los cuales influyen directamente en la concentración y composición de los compuestos obtenidos (Háuad-Marroquín *et al.*, 2010; Złotek *et al.*, 2013) provocando cambios en sus actividades biológicas. Considerando lo anteriormente mencionado, la selección adecuada del método de extracción así como el disolvente utilizado, se tornan dos de los factores determinantes para la obtención de compuestos con una actividad biológica específica, por lo que el objetivo del presente trabajo, fue seleccionar el método y disolvente para la obtención de extractos con actividad antioxidante y antimicrobiana a partir del escapo floral de *Agave salmiana*.

## CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

### 1.1 Importancia de los agaves en México

En México, el género *Agave* tiene gran importancia cultural, sin dejar de lado su impacto social, económico, agrícola y ecológico, debido a sus múltiples usos. Su aprovechamiento se remonta a la época prehispánica, cuando los pueblos indígenas y mestizos del centro y norte del país lo utilizaban como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de la hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros (**Tabla 1.1**) (García, 2007).

De la planta se utilizan; las hojas y la cabeza (piña) para potencializar el contenido nutrimental, al proporcionar las cantidades necesarias de azúcares, fibra cruda y minerales (Ca, Mg, Zn, Fe y Cu), que satisfacen los requerimientos diarios del ganado; por otro lado se ha reportado que la adición de las partes aéreas como la inflorescencia (sistema de ramificación que produce flores) y la flor, en la dieta, mejoran la digestibilidad del rumiante (García-Herrera *et al.*, 2010, Santos-Zea *et al.*, 2012).

Ciertas partes del *Agave*, han sido utilizadas en la obtención de productos específicos, tal es el caso de las hojas o pencas, las cuales se usan para la obtención de fibra, dirigida a la confección de cuerdas, telas, redes y bolsas; el escapo ha sido utilizado como material de construcción; y la planta entera se ha manejado como barrera natural que alcanza una altura de hasta 6 m, actuando como rompe vientos y barreras contra la arena del desierto (Vargas, 2009).

Los agaves, son utilizados como hospederos o sustratos para la producción de insectos comestibles, entre los cuales se encuentran los escamoles, que son larvas de la hormiga *Liometopun apiculatum* y *Liometopun occidentale*; el gusano blanco (*Acentrocneme hesperiaris*), el cual posee un elevado valor nutrimental y socioeconómico para las familias que se dedican a su recolección; y el gusano rojo (*Hypopta agavis B.*), también llamado chinicuil, que se consume frito o molido para la elaboración de salsas (García-Herrera *et al.*, 2010).

**Tabla 1.1** Principales usos del género *Agave*

Usos	Producto	Parte de la planta
Alimentario	Azúcar	Tallo (cabeza de agave o piña)
	Guisos	Flores y frutos
	Dulce	Flores y frutos
	Envoltura (barbacoa)	Hojas
	Mixiotes	Cutícula de las hojas
	Gusanos blancos	Cutícula de cogollo
	Gusanos rojos	Hojas
	Pan de pulque	Tallo (cabeza de agave o piña)
	Tortillas	Perianto (envoltura que rodea a los órganos sexuales) de flores
Bebidas	Aguamiel, miel, atole de aguamiel, pulque, mezcal, tequila, sotol, bacanora, vinagre y jarabe.	Tallo (cabeza de agave o piña)
	Cerca viva	Planta completa
Agrícola	Evita erosión como formadora de suelo fértil.	Planta completa
	Abono orgánico (fertilizante)	Composta de hojas
	Planta líder de ecosistemas	Planta completa
Forrajero	Bovinos, caprinos y porcinos.	Hojas, escapo floral, flores y bagazo.
Medicinal	Diuréticos, antisifilítico, laxante, antiescorbútico, anticancerígeno y producción de esteroides.	Hojas y escapo.
	Desparasitante de rumiantes	Escapo
Construcción	Cercas, casas, corrales.	Escapo y hojas.
	Canales para colectar agua de lluvia.	Hojas
	Aditivo para mezcla.	Extracto de hojas.
Fibras	Escobetillas y cepillos para limpieza.	Fibras de hojas

García-Herrera *et al.*, 2010.

La importancia socioeconómica del *Agave* es evidente por el uso que se le da para producir bebidas alcohólicas como el Mezcal (*Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave salmiana*), Sotol (*Agave dasylirion*, *Agave dasylirion* ssp.), Bacanora (*Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave pacifica*), Pulque (*Agave salmiana*) y Tequila (*Agave tequilana*) (Santos-Zea

*et al.*, 2012). Los desechos fibrosos del *Agave* también pueden ser utilizados como una excelente opción forrajera, sobre todo en las zonas semidesérticas (García-Herrera *et al.*, 2010).

Además de los usos tradicionales que se les da a los agaves, recientemente se han realizado estudios a diversas especies de este género indicando la presencia de compuestos biológicamente activos, que por su amplio espectro de acción en áreas como la medicina y la alimentaria se propone como uno de los géneros más prometedores en el área de investigación. En la **tabla 1.2** se presenta un resumen de las diversas especies de *Agave* estudiadas por su composición de compuestos fenólicos, así como su concentración, además de otros compuestos bioactivos y su propiedad biológica.

Algunos de estos estudios incluyen el análisis de los subproductos del género *Agave*, como lo indican Uribe *et al* (2017), quienes al utilizar la savia de *Agave* spp. (*Agave atrovirens*, *Agave salmiana* y *Agave lehmanni*) almacenada por al menos 8 semanas, mencionan que tiene compuestos bioactivos del grupo de flavonoides, policosanoles y sapogeninas, que pueden servir para tratar el cáncer en humanos, reduciendo el crecimiento de estas células en colon, por la inhibición mostrada en células Caco-2 del colon (84.8%) y en células HepG2 de hígado (67.9%). Otro estudio realizado con la savia de *Agave atrovirens* mostró que los extractos metanólicos de la savia de esta planta presentaron actividad antidiabética al promover la secreción de insulina en células pancreáticas (línea celular RIN-5F) (Cerdeña-De los Santos, 2011).

Por otro lado, algunos estudios mostraron que productos derivados del agave como el mezcal, tienen propiedades antioxidantes, en diferentes etapas de maduración de la bebida, indicando los resultados que los mezcales en todo el proceso de maduración presentaron elevada capacidad antioxidante y los compuestos reportados fueron principalmente ácidos fenólicos y flavonoides (Ávila-Reyes *et al.*, 2010); Por otra parte, el aguamiel y el pulque (*Agave salmiana*), mostraron que son bebidas inocuas para alimentar a los animales, que le confieren algunas propiedades benéficas y que podrían considerarse como productos nutraceuticos, los estudios se enfocaron a evaluar el efecto de estas bebidas sobre la biometría hemática en conejos y su actividad antioxidante (Tovar-Robles *et al.*, 2011).

Algunas otras propiedades biológicas observadas en el género *Agave* son, la capacidad antimicrobiana, observada en los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de *Agave sisalana* contra *Shigella dysenteriae* (Ade-Ajayi *et al.*, 2011) y en extractos metanólicos de las hojas de *Agave attenuata* contra microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* (Rizwan *et al.*, 2012); la capacidad antiparasitaria, la cual presentaron los extractos acuosos y extractos de acetato de etilo obtenidas de residuos de *Agave sisalana* contra nematodos gastrointestinales de cabras (Botura *et al.*, 2013); y capacidad inmunomoduladora observada en 3 homoisflavonoides aislados a partir del extracto metanólico de las hojas de *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, los cuales inhibieron significativamente la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  (citoquininas que promueven la división y la diferenciación celular) en PBMC (Preparación de células mononucleares de sangre periférica humana) activadas de una manera dependiente de la concentración (Chen *et al.*, 2009).

**Tabla 1.2** Especies de *Agave* estudiadas por sus propiedades biológicas

Propiedad biológica	Especie	Tipo de tejido o producto analizado	Referencia
Anticancerígeno	<i>Agave</i> spp.	Savia	Uribe <i>et al.</i> , 2017
	<i>A. schotti</i>	Inflorescencias	Bianchi <i>et al.</i> , 1969
	<i>A. intermixta</i>	Hojas	Sáenz <i>et al.</i> , 2000
	<i>A. duranguensis</i>	Mezcal	Ávila-Reyes <i>et al.</i> , 2010
Antioxidante	<i>A. salmiana</i>	Aguamiel y pulque	Tovar-Robles <i>et al.</i> , 2011
	<i>A. atrovirens</i>	Aguamiel	Cerda-De los Santos, 2011
	<i>A. americana</i>	Flores	Subramanian y Nair, 1970
Quelante	<i>A. salmiana</i>	Aguamiel	Tovar-Robles <i>et al.</i> , 2011
	<i>A. salmiana</i>	Jugo de agave	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2009
Antidiabético	<i>A. atrovirens</i>	Savia	Cerda-De los Santos, 2011
	<i>A. angustifolia</i>	Fructanos de agave	Rendón-Huerta <i>et al.</i> , 2012
	<i>A. lechuguilla</i>	Escapo macerado	Andrade-Cetto y Heinrich, 2005
Antimicrobiano	<i>A. sisalana</i>	Hojas	Ade-Ajayi <i>et al.</i> , 2011
	<i>A. attenuata</i>	Hojas	Rizwan <i>et al.</i> , 2012
	<i>A. picta</i>	Hojas y escapo	Verástegui <i>et al.</i> , 2008
Antiparasitario	<i>A. sisalana</i>	Hojas	Botura <i>et al.</i> , 2013
	<i>A. salmiana</i>	Escapo	García-Herrera <i>et al.</i> , 2010
Inmunomodulador	<i>A. sisalana</i>	Hojas	Chen <i>et al.</i> , 2009

## 1.2 Especie *Agave salmiana*

### 1.2.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica de la especie *salmiana* ha sido objeto de controversias debido a su gran variación fenotípica y genotípica incluso dentro de una misma población, sin embargo Gentry en 1982 logró hacer concurrir en su libro “Agaves of Continental North America” (Los Agaves de Norteamérica Continental) la mayor cantidad de elementos biológicos, correlacionando caracteres anatómicos muy detallados, logrando relacionar aspectos del desarrollo y distribución geográfica del *Agave salmiana*, actualmente considerados como la mejor forma para identificar a esta especie. Según la clasificación taxonómica (**Tabla 1.3**) el *Agave salmiana* pertenece a la división *Magnoliophyta*, a la cual pertenecen las plantas con estructura de cormo (raíz, tallo y hojas); de la clase *Liliopsida*; orden *Liliales*, las cuales poseen características de ser plantas generalmente herbáceas y perennes (Muñiz-Márquez *et al.*, 2013).

**Tabla 1.3** Clasificación taxonómica del *Agave salmiana*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Orden</b>	Liliales
<b>Familia</b>	Agavaceae
<b>Género</b>	<i>Agave</i>
<b>Especie</b>	<i>A. salmiana</i>
<b>Subespecie</b>	<i>A. salmiana</i>

UNIBIO, 2010.

### 1.2.2 Distribución geográfica

El *Agave salmiana* se puede encontrar en el área central de México, crece como planta silvestre en los estados de Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí; como planta cultivada su distribución es más amplia, en Coahuila, Zacatecas y Nuevo León (Reynoso *et al.*, 2012) (**Figura 1.1**). Prospera con éxito entre los 1000 y los 2250 m sobre el nivel del mar, en climas que van de semiseco a seco y con una precipitación pluvial de 320 a 720 mm anuales; del 90 al 95% incide en verano y el resto en invierno (Gentry, 1982). El régimen térmico puede ser templado a semicálido extremo y la temperatura promedio anual puede ser de 16 a 22°C, las temperaturas mínimas hasta -12°C (pueden dañar las puntas de las hojas); en primavera y verano tolera temperaturas promedio de 26°C o extremas diarias de hasta 35°C. Pueden crecer en pisos

de valles rocosos, laderas de cerro, bajadas o abanicos aluviales, excepto en lugares propensos a inundaciones o con problemas de sales de sodio en el suelo (Vargas, 2009).



**Figura 1.1** Distribución en México de *Agave salmiana* (modificada de CONABIO, 2008)

### 1.2.3 Importancia socioeconómica

Uno de los usos de mayor importancia socioeconómica que tiene el *Agave salmiana*, es la elaboración de mezcal, generando ganancias en Oaxaca, de aproximadamente 8008 millones de pesos anuales, abarcando el 69% del mercado de bebidas alcohólicas (SIAP, 2015); otro uso importante es la producción de aguamiel, a partir de cuya fermentación se elabora el pulque, que además de emplearse como bebida alcohólica, también es utilizado en la elaboración de pan de pulque principalmente en el estado de Hidalgo. Entre otros usos vigentes se encuentra el empleo de la cutícula de la hoja (penca), en la elaboración de algunos platillos culinarios regionales como el mixiote; así mismo la piña o cabeza es utilizada para la elaboración de dulces, debido a que esta sección de la planta posee cantidades elevadas de azúcares (García-Herrera *et al.*, 2010).

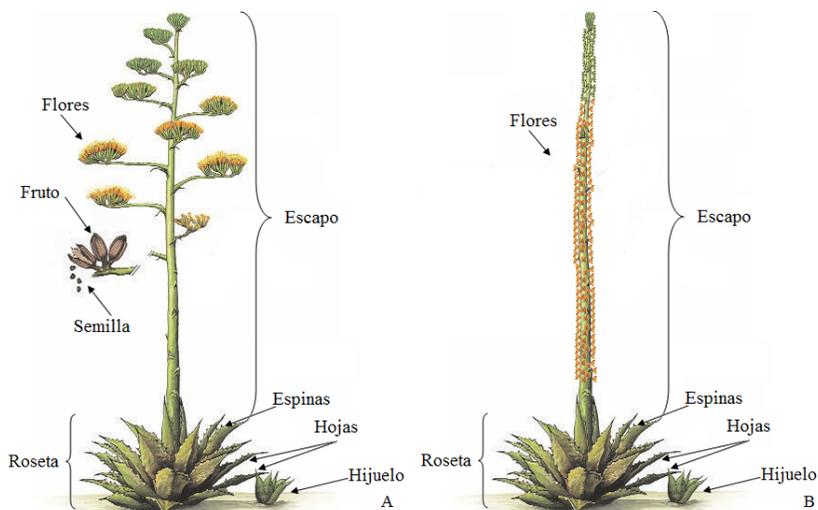
Por otro lado, en el estado de Oaxaca, el *Agave salmiana* es utilizado como cobertura vegetal para la reducción de la erosión, para la conservación de la humedad, así como barreras vivas a diferentes altitudes. Actualmente, es utilizado como modelo de estudio, para determinar los

mecanismos de tolerancia al déficit prolongado de agua, siendo las plántulas de 6 meses de edad, las que toleran la sequía discontinua hasta por más de 100 días (Verduzco *et al.*, 2008).

#### 1.2.4 Morfología

Las plantas de *Agave salmiana* son perennes, robustas, clasificadas como monocotiledóneas, poseen raíces duras y fibrosas. La superficie de la hoja puede ser muy áspera al tacto, de 1 a 2.2 m de largo por 20 a 35 cm de ancho, ampliamente lanceoladas, color verde claro a verde amarillento y se encuentran dispuestas en rosetas basales de 1.5 a 2.8 m de alto, con espinas laterales y en las puntas. La espina terminal puede llegar a medir hasta a 9 cm de largo, acanalada con sección transversal, aplanada y generalmente de color negro con perímetro rojizo (Flores *et al.*, 2010).

Al madurar (8 a 10 años), el *Agave* desarrolla una inflorescencia de hasta 9 m de altura, contorno generalmente piramidal, con capacidad de floración en el tercio o cuarto superior de la estructura (Fernández, 2008). Esta inflorescencia en la subespecie *Agave*, presenta forma paniculada, a diferencia de los *Agaves* del subgénero *Littaea* que desarrollan una inflorescencia espigada (**Figura 1.2**) (Muñiz-Márquez *et al.*, 2013).

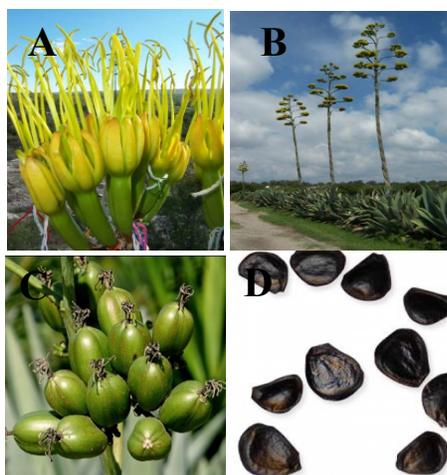


**Figura 1.2** Morfología de los dos tipos de escapo del género *Agave* A) tipo paniculado, B) tipo espigado.  
(modificado de CONABIO, 2008).

Las flores poseen un largo de 6 a 9 cm, generalmente de color amarillo intenso (**Figura 1.3A**), son protándricas, hermafroditas, autocompatibles con poca fertilización, actinomorfas, tienen seis tépalos (a diferencia de los pétalos poseen forma puntiaguda), imbricadas y asimétricas,

presentan seis estambres, filamentos insertados en el tubo o en las bases, el tubo del perianto corto, ovario trilobular, pistilo alargado y estigma trilobular. Los frutos del *Agave salmiana* (**Figura 1.3C**) al madurar producen numerosas semillas (hasta 30000) en forma de disco, negras y brillantes cuando son fértiles y blancas cuando son estériles (**Figura 1.3D**) (Flores *et al.*, 2010).

Su propagación asexual a través de hijuelos, suele ser la más común, debido a que la reproducción por semilla requiere más cuidados y alarga el periodo de maduración de la planta (Fernández, 2008).

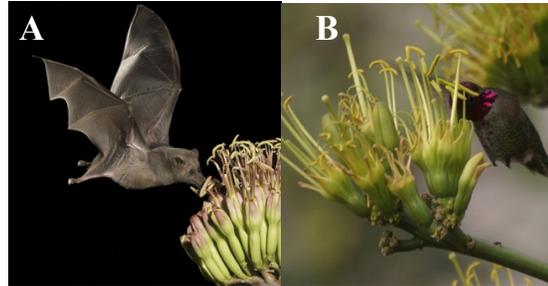


**Figura 1.3** Componentes de *Agave salmiana* A) Flores, B) Escapo, C) Fruto y D) Semilla (Cortés *et al.*, 2009).

### 1.2.5 Sistemas de reproducción

La reproducción de *Agave salmiana* puede ser por dos vías, sexual o asexual, cuando se lleva a cabo por la vía sexual, la fecundación se realiza por medio de la polinización que realizan algunos animales, principalmente murciélagos (*Leptonycteris curasoae*, *L. nivalis*, *Choeronycteris mexicana* y *Glossophaga sp.*) y en menor grado insectos, que pueden ser diurnos o nocturnos (palomillas, abejas, abejorros) además de aves (colibríes) (**Figura 1.4**) (Muñiz-Márquez *et al.*, 2013). Una vez realizada la polinización, el desarrollo de la semilla es modulada por factores involucrados en el éxito de la germinación, como son la temperatura, la especie, contenido de humedad, tipo de sustrato y el ambiente de origen (ráfagas de aire, frecuencia de las precipitaciones, etcétera). Sin embargo, la baja disponibilidad de humedad y las elevadas

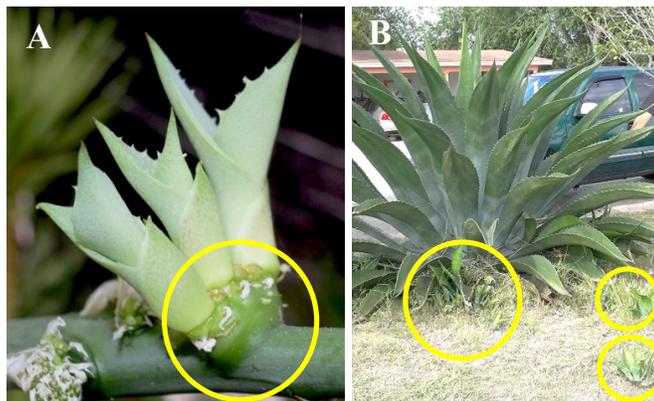
temperaturas en las zonas áridas y semiáridas en que se encuentran las plantas de *Agave*, hacen que el proceso de germinación sea esporádico, con rendimientos entre 25 a 32% (García, 2007).



**Figura 1.4** Agentes polinizadores de género *Agave*. A) Murciélago, B) Colibrí (Melton, 2008).

Por otra parte, la reproducción asexual implica el enraizamiento y la separación de una parte de la planta original, de ésta manera, las células, tejidos u órganos desprendidos se desarrollan directamente en nuevos individuos conocidos como hijuelos (**Figura 1.5**).

Las estructuras a partir de las cuales puede ocurrir la separación pueden ser, los bulbillos (yemas auxiliares de consistencia carnosa que almacenan reservas) de la planta, o puede darse la fragmentación de una planta debida al deterioro y muerte del individuo parental o bien de los tejidos de interconexión, como en el caso de los brotes de las raíces (García, 2007).



**Figura 1.5** Desarrollo en *Agave salmiana* A) Yemas auxiliares, B) Hijuelos por enraizamiento. (Hernández, 2011)

### 1.2.6 Crecimiento y maduración

Durante el crecimiento y maduración de *Agave salmiana*, se generan cambios en cada estructura de la planta, de esta manera las hojas, en las primeras etapas de su crecimiento, se caracterizan por poseer forma lanceolada, entre 5 a 10 cm de largo y 3 a 7 cm de ancho, la aparición de las

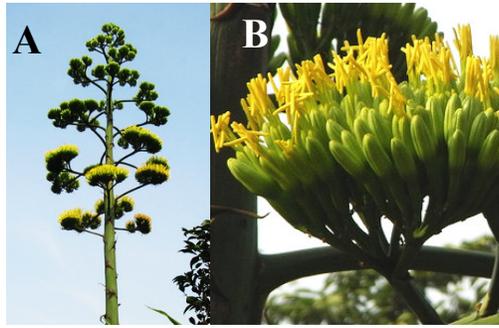
espinas sucede de manera gradual, siendo al comienzo muy cortas y delgadas de hasta 1 cm de largo, su coloración es grisácea tornándose a café-rojizo con la maduración y se disponen en el perímetro de la hoja de forma acanalada, al llegar a la madurez la hoja desarrolla una textura áspera al tacto, cambiando su coloración verde claro característico por tonalidades verdes oscuros inclusive grisáceas dependiendo la variedad y tamaño llegando a alcanzar hasta 1.5 m de largo y de 25 a 47 cm de ancho (Fernández, 2008).

La disposición de las hojas comienza con la formación del cono central o cogollo, formado por hojas tiernas centrales las cuales posteriormente se organizan en forma de empalme para formar la roseta, este proceso requiere entre 8 y 10 años aproximadamente, tiempo suficiente para su maduración y desenvolvimiento sucesivo, dejando en las hojas externas una marca o impresión sobre el envés de la hoja con la que tiene contacto directo, dándole un aspecto particular a la roseta, marca que perdura hasta que la planta muere (**Figura 1.6**) (Muñiz-Márquez *et al.*, 2013).



**Figura 1.6** Marcas desarrolladas durante el proceso de crecimiento de la hoja de *Agave salmiana* (Martínez, 2012)

Antes de iniciar la etapa de floración, las hojas de la parte terminal de la roseta cambian, se hacen más delgadas, pierden las espinas laterales y posteriormente se transforman en brácteas (hojas originadas sobre el tallo floral), las cuales disminuyen gradualmente su tamaño conforme se localizan hacia la parte apical del pedúnculo floral (Cortés *et al.*, 2009). Después de la etapa de adelgazamiento y formación de brácteas, comienza la formación del escapo floral, justo en la parte central de la planta y en el extremo del escapo se origina la inflorescencia que se desarrolla en forma paniculada (**Figura 1.7**) (Coleman-Derr *et al.*, 2016).



**Figura 1.7** A) Inflorescencia de *Agave salmiana*, B) Flores de *Agave salmiana* (Herrera, 2014).

La coloración junto con la producción del polen de las flores de la planta de *Agave salmiana*, representan los factores principales de atracción de los agentes polinizadores (murciélagos y aves), éstos inician el proceso de polinización, al transportar el polen a los órganos sexuales femeninos de la planta, localizados en la parte aérea de la misma; una vez fecundados los óvulos, se desarrolla el fruto, que al llegar a la madurez produce las semillas que servirán luego para el desarrollo de una planta nueva (Fernández, 2008).

### 1.3 Escapo floral

En botánica el escapo floral es el tallo que nace del bulbo o rizoma de una planta, no presenta hojas y desarrolla flores o inflorescencias en el ápice. Sus características morfológicas como altura, grosor, coloración, incluso desarrollo de su inflorescencia dependerán de la familia a la que pertenezca la planta, siendo las principales en presentar esta estructura las Violaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Balsaminaceae, Agavaceae, Papaveraceae, Droseraceae, y Bromeliaceae (Lira *et al.*, 2016).

Por otro lado en la planta, el desarrollo del escapo floral indica madurez vegetativa, debido a que una vez que inicia su desarrollo comienza la etapa de floración y por consiguiente de reproducción. Por lo anterior en diversos estudios realizados a esta parte de la planta utilizaron sus parámetros de crecimiento como indicativos de fertilidad o de producción vegetal. (Puri *et al.*, 2016)

Ejemplo de ello es un análisis realizado a las flores de *Gerbera jamesonii*, en el cual se evaluaron distintas dosis de dos hormonas de crecimiento (ácido giberélico y salicílico) aplicadas al follaje y sustrato con la finalidad de aumentar la producción de flores en la planta. Para ello se tomaron como parámetros principales la longitud y diámetro del escapo, así como el número de escapos

florales por planta, indicando los resultados que la aplicación al follaje favoreció el número de escapos florales por planta, mientras que, la aplicación al sustrato aumentó, la longitud y diámetro del escapo, favoreciendo ambos el aumento en el rendimiento de flores por planta (Morales-Pérez *et al.*, 2014).

En el 2008 Cruz-Castillo *et al* también consideraron parámetros como elongación y grosor del escapo como indicadores de crecimiento vegetal. En este estudio se analizó el efecto del uso de varios tipos de lombricomposta sobre el desarrollo de la planta alcatraz “Green Goddess” (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng), concluyendo que el uso de la lombricomposta propuesta favoreció la elongación del escapo floral en comparación a las plantas tratadas con fertilizantes comerciales.

En otro estudio realizado a *Encyclia adenocaula*, planta perteneciente a la familia de las Orquidáceas, se muestra que, características principales como longitud y grosor del escapo, coloración de las antocianinas del escapo, intensidad de esta coloración, número de ramas, número de flores y consistencia (verrugosidad) del escapo permiten eficazmente la identificación de las propiedades reproductivas de la planta (Laguna *et al.*, 2012).

Otro ejemplo es el estudio realizado a los escapos de la planta de cebolla *Allium cepa* L, en el cual uno de los objetivos fue identificar la etapa de mayor producción de semilla en la planta bajo condiciones mínimas de insumo, tomando como referencia principal la longitud del vástago. Los resultados mostraron que es posible utilizar la altura del escapo de la planta como parámetro para identificar su periodo más reproductivo (De la Fé *et al.*, 2014).

### **1.3.1 Escapo floral en el género *Agave***

En el género *Agave* el escapo también es nombrado como quiote, nace de la parte media del meristemo central (“piña” del *Agave*), como una larga porción terminal recta de hasta 12 m de largo, en el cual se desarrollan los capullos indicando el inicio de la etapa de floración de la planta (Coleman-Derr *et al.*, 2016). Debido a su estructura fibrosa es utilizado como material de construcción u ornamental, también se ha empleado como ingrediente para la elaboración de platillos tradicionales (Vargas, 2009), sin embargo son pocos los estudios realizados a esta estructura, quizá debido a que es poco conocida y porque sus usos principales no representan beneficios económicos importantes.

La mayoría de estos estudios efectuados al escapo floral del género *Agave* han sido de tipo exploratorios como el realizado al escapo de *Agave kerchovei*, localizado en Puebla y Oaxaca principalmente, en el cual el objetivo principal fue obtener información acerca del conocimiento y uso tradicional de los recursos derivados de esta estructura, así como de los botones florales de la planta. El estudio se basó en varias entrevistas realizadas a hombres y mujeres del lugar, relacionados con las actividades del hogar y del campo, a quienes se les aplicó un cuestionario estructurado en función al desarrollo y usos principales del *Agave* (Brena-Bustamante, 2013).

Otro ejemplo, es el estudio realizado al escapo de *Agave lechuguilla*, en el cual el objetivo del trabajo fue investigar las propiedades nutricionales de esta estructura, para proponer su consumo como una fuente más de nutrimentos y difundir entre la población su valor nutricional. Para ello se realizó una colecta de 300 g de escapo del maguey en el municipio de Tolcayuca, Hidalgo realizando la identificación taxonómica y análisis químico proximal de macro y micronutrientes en base seca de acuerdo a las técnicas de la AOAC de 1995 (Santos *et al.*, 2006).

En otro estudio se determinó el desarrollo reproductivo del *Agave cocui*, enfocado en la fenología de floración y fructificación de la estructura del escapo. Este estudio se realizó en ocho localidades de Venezuela. En cada una de las localidades se seleccionó un área con presencia de *Agave cocui* en la que al menos algunos de los individuos presentaran escapo en su fase inicial y se le dio seguimiento a su desarrollo a lo largo de un año (Figueredo, 2011).

Por otro lado, además de los usos tradicionales del escapo, esta parte de la planta también se ha utilizado como agente desparasitante de rumiantes (García-Herrera *et al.*, 2010), lo cual ha despertado interés en la investigación por la presencia potencial de compuestos con posibles actividades biológicas, convirtiéndolo en una nueva vertiente de estudio vegetal dentro del área de alimentos. Ejemplo de ello es el estudio fitoquímico realizado al escapo floral de la especie *A. salmiana*, en el que se determinó la composición química proximal del vástago y se evaluó el efecto producido por la etapa de desarrollo del escapo sobre el contenido de los compuestos químicos presentes en la estructura, para lo cual se consideraron tres diferentes alturas de escapo y tres diferentes secciones de los mismos (**Tabla 1.4**) (Medina, 2016).

**Tabla 1.4** Composición porcentual de escapo de *Agave salmiana*

Contenido	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
Proteína	1.18 <sup>a</sup> ± 0.68	1.48 <sup>a</sup> ± 0.72	2.16 <sup>a</sup> ± 1.03
Fibra	19.73 <sup>a</sup> ± 4.95	16.87 <sup>a</sup> ± 4.34	12.32 <sup>a</sup> ± 3.60
Humedad	63.11 <sup>a</sup> ± 3.16	67.71 <sup>a,b</sup> ± 3.20	74.00 <sup>b</sup> ± 1.38
Extracto etéreo	4.52 <sup>a</sup> ± 0.83	5.30 <sup>a</sup> ± 0.65	6.03 <sup>a</sup> ± 0.60
Cenizas	3.43 <sup>a</sup> ± 1.46	4.33 <sup>a</sup> ± 1.13	2.29 <sup>a</sup> ± 0.81
Carbohidratos	8.01 <sup>a</sup> ± 1.18	4.31 <sup>b</sup> ± 1.35	3.20 <sup>b</sup> ± 0.17

Prueba de Tukey. Columnas con la misma letra no tienen diferencia significativa a un p=0.05.

Los valores se expresan como la media ± D.S de nueve repeticiones. El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia. E<sub>1</sub>=escapo de 300 cm, E<sub>2</sub>= escapo de 250 cm, E<sub>3</sub>= escapo de 200 cm.

Otro de los resultados obtenidos en el estudio realizado al escapo floral de *Agave salmiana* indicó que esta parte de la planta es una fuente importante de compuestos antioxidantes (**Tabla 1.5**) y fenólicos. Los cuales en su mayoría se concentran en la parte media del vástago y son extraídos con facilidad por medio de disolventes polares como el agua y el etanol (Medina, 2016).

**Tabla 1.5** Determinación de la actividad antioxidante promedio de escapos florales de *Agave salmiana*

Extracto	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
<b>CRUDO</b>	47.75 <sup>a,B,C</sup> ± 18.42	57.51 <sup>b,A,B</sup> ± 15.41	58.35 <sup>c,A,B</sup> ± 15.32
<b>HEXANO</b>	22.67 <sup>a,D</sup> ± 10.21	29.78 <sup>b,C</sup> ± 13.99	31.25 <sup>c,C</sup> ± 13.45
<b>ACETONA</b>	28.53 <sup>a,D</sup> ± 13.04	34.21 <sup>b,C</sup> ± 10.88	37.38 <sup>c,C</sup> ± 9.64
<b>ETANOL</b>	62.26 <sup>a,B</sup> ± 8.36	60.56 <sup>b,B</sup> ± 14.09	62.97 <sup>a,A</sup> ± 13.36
<b>METANOL</b>	42.26 <sup>a,C</sup> ± 14.12	49.97 <sup>b,B</sup> ± 13.52	52.03 <sup>c,B</sup> ± 14.07
<b>AGUA</b>	57.22 <sup>a,A,B</sup> ± 17.97	61.40 <sup>b,A</sup> ± 16.94	63.01 <sup>c,A</sup> ± 16.15

Los datos son en porcentaje.

Prueba de Tukey. Los valores se expresan como la media ± D.S de nueve repeticiones. Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna son significativamente diferentes a un p=0.05. Valores con diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un p=0.05

También se determinó que el escapo de *Agave salmiana* posee compuestos antimicrobianos que exhiben un amplio espectro de acción contra microorganismos como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium* (Medina, 2016). En la **tabla 1.6** se reúnen los valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) de diversos géneros de plantas, donde se puede observar que el género agave presenta CMI muy bajas en comparación a las otras plantas, lo cual hace que esta estructura tenga potencial para ser utilizada dentro del área de alimentos.

**Tabla 1.6** Comparación de CMI de diferentes plantas y escapos de *Agave salmiana*

Especie vegetal	Parte de la planta	Tipo de extracto	Microorganismo que afecta	CMI (mg*mL <sup>-1</sup> )	
<i>Agave salmiana</i>	Escapo	E <sub>1</sub> y E <sub>3</sub>	Acuoso	<i>Escherichia coli</i>	7.81
		E <sub>1</sub>	Etanólico	<i>Shigella sonnei</i>	7.81
		E <sub>2</sub> y E <sub>3</sub>	Metanólicos	<i>Salmonella typhi</i>	10.42
			Hexanólicos	<i>Listeria monocytogenes</i>	10.42
<i>Agave lechuguilla</i> <sup>1</sup>	Hojas	Metanólicos	<i>Bacillus cereus</i>	14.2	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	28.5	
<i>Aloe vera</i> <sup>3</sup>	Hojas	Acuoso	<i>Listeria monocytogenes</i>	100	
<i>Azadirachta indica</i> <sup>4</sup>	Hojas	Acuoso	<i>Escherichia coli</i>	150	
<i>Larrea tridentata</i> <sup>1</sup>	Hojas	Metanólicos	<i>Escherichia coli</i>	7.1	
<i>Centaurea calcitrapa</i> <sup>5</sup>	Hojas	Metanólicos	<i>Salmonella typhi</i>	612	
Perejil <sup>2</sup> ( <i>Petroselinum sativum</i> )	Hojas y raíz	Agua-Etanol (50:50, v/v)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.77	
<i>Amaranthus hybridus</i> <sup>7</sup>	Hojas	Hexanólico	<i>Listeria monocytogenes</i>	35.5	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. <sup>6</sup>	Hojas	Etanólico	<i>Shigella sonnei</i>	1.02	

1) Castro-Franco, *et al.*, 2001, 2) García *et al.*, 2009, 3) Guillermo *et al.*, 2012, 4) Yumar *et al.*, 2012, 5) Toribio *et al.*, 2004, 6) Castaño *et al.*, 2010, 7) Orozco *et al.*, 2011. E<sub>1</sub>= escapo de 300 cm, E<sub>2</sub>= escapo de 250 cm, E<sub>3</sub>= escapo de 200 cm.

#### 1.4 Compuestos bioactivos a partir de fuentes vegetales

En el área de la alimentación y específicamente, en alimentos funcionales, los compuestos bioactivos se definen como, aquellos compuestos químicos que ejercen un efecto benéfico para alguna función corporal de la persona, produciendo una mejora en la salud o reduciendo un riesgo de enfermedad, exhibiendo también propiedades farmacológicas. Este tipo de compuestos al ser extraídas de vegetales se les denomina fitoquímicos (Leonov *et al.*, 2015) y el estudio de estas sustancias se le conoce como fitoquímica.

Debido al impacto de estas sustancias en la mejora de la calidad de vida, actualmente existen diversos estudios fitoquímicos enfocados en la búsqueda de nuevas fuentes naturales que provean de este tipo de sustancias con propiedades de importancia biológica, como actividad antimicrobiana, antioxidante, efecto antifúngico, efecto antiviral y anticancerígeno (**Tabla 1.7**), entre los principales, que finalmente benefician a diversas áreas como la medicina, la cosmetología y la industria alimentaria (Sharapin, 2010).

Tabla 1.7 Principales compuestos bioactivos presentes en plantas

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
<b>Fenoles simples</b>	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	Antimicrobiana contra <i>Salmonella</i>
<b>Quinonas</b>	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	Antiviral contra VIH
<b>Taninos</b>		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Antioxidante, antimicrobiana y antiviral
<b>Flavonas</b>	Catequina	<i>Camelia sinensis</i>	Antimicrobiana contra <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	Antioxidante, antiinflamatorio
<b>Alcaloides</b>	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Antioxidante, antimicrobiana contra Cocos Gram positivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Antifúngica
<b>Aldehído</b>	Hexanal	<i>Olea europea</i> (olivo)	Antimicrobiana contra <i>Shigella</i>
<b>Saponinas</b>		<i>Panax ginseng</i>	Antimicrobiana contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> . Antifúngica
	Esmilagenina y gitogenina	<i>Agave lechuguilla</i>	Antioxidante y antiinflamatorio
<b>Sulfóxidos</b>	Alicina	<i>Allium sativum</i> (ajo)	Antimicrobiana contra <i>H. pylori</i>
<b>Mezcla compleja</b>	Látex	<i>Aloe vera</i> (aloe)	Antimicrobiana contra <i>Corynebacterium</i> , <i>Salmonella</i>
<b>Alcanos</b>	Poliacetileno	<i>Bupleurum salicifolium</i>	Antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>

Domingo *et al.*, 2003

Globalmente las plantas producen más de 100,000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios, sin embargo hasta ahora se han aislado alrededor de 12,000, por lo que varias investigaciones han optado por la utilización de metodologías de extracción más complejas, además de la selección de disolventes que permitan al mismo tiempo, un mayor rendimiento de obtención y el aislamiento de una molécula biológicamente viable (Franco *et al.*, 2013).

Dentro de estos estudios se encuentra el realizado en los extractos etanólico y hexánico de hoja y corteza de las plantas guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* L.), palo de sangre (*Pterocarpus hayesii* L.), chichimecate (*Tynanthus guatemalensis* L.) y ciruela (*Spondias purpurea* L.) contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus* mediante el método de difusión en agar. Los resultados indican que el extracto hexánico de cada una de las plantas presentaron actividad antimicrobiana al menos en uno de los microorganismos

evaluados (Miranda *et al.*, 2012).

Por otro lado Salinas *et al* (2009) determinaron la actividad antimicrobiana de veintidós extractos orgánicos de nueve especies vegetales medicinales, que son comúnmente empleadas por los habitantes de las comunidades de Morelos, para tratar diferentes padecimientos infecciosos. Los microorganismos empleados fueron: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* y la levadura *Candida albicans*, siendo los extractos hexánicos y acetónicos los que mostraron las menores concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a los microorganismos utilizados.

Además del estudio antimicrobiano también se han analizado las propiedades antifúngicas de los compuestos extraídos de plantas, como la investigación realizada por Ruíz *et al* en el 2009, donde probaron extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de cuatro plantas peruanas contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*; y los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporium canis*. Los resultados mostraron que los extractos hidroalcohólicos presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Microsporium canis* (Ruíz *et al.*, 2009).

#### **1.4.1 Compuestos bioactivos en el género *Agave***

En México existe la mayor diversidad de especies de *Agave* en el mundo y considerando sus usos en la medicina tradicional, estas plantas podrían ser una fuente importante de compuestos bioactivos, como fenoles, alcaloides, saponinas, terpenos y flavonoides, los cuales poseen diferentes efectos biológicos como lo demuestran estudios realizados en in vitro y en vivo como puede ser: efecto antimicrobiano, antimicóticos, antioxidantes, antiinflamatorios, antihipertensivos, inmunomodulador, antiparasitario, antiviral y anticancerígeno (**Tabla 1.8**) (Santos-Zea *et al.*, 2012, López-Romero *et al.*, 2018).

Los diferentes grupos de compuestos identificados en las especies de *Agave* poseen un mecanismo de acción específico, sin embargo dentro de cada grupo, se han aislado compuestos que ejercen diversos efectos biológicos debido a cambios en la configuración de su estructura química o incluso debido solo a fracciones del mismo. Un ejemplo son las saponinas aisladas de *Agave sisalana*, estos compuestos son derivados glicosilados de esteroides de plantas tales

como tigogenina, smilagenina, gitogenina, clorogenina, hecogenina, sarsapogenina, neotigogenina y honguangenina. En este caso la fracción de azúcar ejerce un papel importante en las actividades anticancerígenas, antimicrobianas y antiinflamatorias de las saponinas. La aglicona hecogenina, por ejemplo, no mostró actividad contra la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H460, la línea celular de cáncer de mama MCF-7 o la línea celular de glioblastoma SF268, a diferencia de la citotoxicidad observada de sus glucósidos: hecogenina 3-O- $\beta$ -D-glu-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glu-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-gal y hecogenina 3-O- $\alpha$ -L-rha-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-xyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glu-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glu-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-gal (Chen *et al.*, 2011).

Otro ejemplo sobre la diferencia en bioactividad debido a la fracción de azúcar se observó con Agamenósidos D, E y F aislados de *Agave americana*. Mientras que los tres tienen propiedades antifúngicas, cinco azúcares Agamenósidos (E y F) mostraron un efecto más elevado en comparación con la cadena de azúcar Agamenósido D (Jin *et al.*, 2003). En otro caso observado en *Agave utahensis*, incluso la misma aglicona con el mismo resto de azúcar puede tener diferente actividad dependiendo de la unión entre azúcares del glucósido de smilagenina donde (25R)-5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -yl O- $\beta$ -D-glu-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-gal y (25R)-5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -yl O- $\beta$ -D-glu-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-gal tuvieron actividad citotóxica contra las células HeLa con IC50 de 4.9 y 7 g\*mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Yokosuka *et al.*, 2009).

Otro estudio sobre las saponinas fue realizado en las hojas de *Agave brittoniana*, donde se observó que las saponinas esteroidales extraídas (clorogenina, hecogenina, tigogenina, rockogenina,  $\beta$ -sitosterol, diosgenina y yucagenina) actúan como antiparasitarios en contra de *Trichomona vaginalis*, un protozoo patógeno flagelado, que provoca la enfermedad conocida como trichomonosis o tricomoniasis, que es una infección de los genitales (Orestes *et al.*, 2008).

En las hojas y flores de *Agave lechuguilla* también se han aislado saponinas esteroidales como esmilagenina y gitogenina, los cuales son utilizados como precursores esteroidales, antiinflamatorios o bien como suplemento alimenticio en la engorda de borregos (Soto *et al.*, 2005).

Por otro lado, también se han realizado estudios a los grupos fenólicos presentes en la planta de *Agave*. Chen *et al* (2009) encontraron que las flavonas y homoisoflavonas aisladas de *Agave sisalana* afectaron la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

donde el efecto podría estar relacionado con la inhibición de la producción de citocinas ya que IL-2 e IFN se inhibieron mediante la adición de estos compuestos, indicando que un grupo C-4 metoxilo y un grupo hidroxilo C-5 fueron necesarios para ejercer actividad inmunomoduladora. Otro de los efectos observados en las flavonas y homoisoflavonas obtenidas del *Agave* son su elevada capacidad antioxidante que podría deberse al grupo hidroxilo C-5 en su estructura (Masaoud *et al.*, 1995).

También se ha encontrado que varios glucósidos como el Kaempferol y Kaempferol-3-O-glucósido aislados de *Agave duranguensis* son los principales compuestos responsables de ejercer propiedades antiinflamatorias y analgésicas con resultados satisfactorios (Almaraz-Abarca *et al.*, 2009; Parveen *et al.*, 2009). En el caso de *Agave intermixta* el efecto antiinflamatorio se debió a los esteroides, quinonas y compuestos fenólicos presentes en la infusión de las hojas de la planta, el estudio analizó in vivo dos modelos de ratones albinos, donde en el primer modelo una dosis de 300 mg\*kg<sup>-1</sup> fue tan efectiva como el fármaco (dexametasona) en su dosis recomendada (0,8 mg\*kg<sup>-1</sup>) y en el segundo modelo se obtuvo un efecto del extracto aplicado tópicamente sobre el edema inducido de la oreja de ratón a dosis de 3.0 y 5.0 mg\*oreja<sup>-1</sup> (Almaraz-Abarca *et al.*, 2009)

En la planta de *Agave salmiana*, los estudios se han realizado principalmente, en raíz, hojas, y flores, de las cuales se han identificado varias saponinas, relacionadas con hormonas esteroideas, esteroides diuréticos y con la vitamina D, por lo que tiene efectos sobre el crecimiento y salud, en seres humanos y cerdos (Ventura *et al.*, 2010); algunos triterpenos que han sido utilizados como antileucémicos, antiinflamatorios y en tratamientos contra la disenteria (es un trastorno inflamatorio del intestino, especialmente del colon, que produce diarrea) (Calange, 2011); la identificación de taninos catéquicos, utilizados como antidiarreicos y para el tratamiento de intoxicación por metales pesados, principalmente aquellos que poseen mayor unidades de catequinas, lo que brinda una mayor resistencia a la hidrólisis ácida en el aparato digestivo (Castillo *et al.*, 2007); mientras que algunos estudios también sugieren su uso como antioxidante, antitumoral e inhibidor de enzimas (Hipólito, 2007); y algunos flavonoides que poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena (especialmente el cáncer de mamá y de próstata) y antiviral (Perricone, 2004 y Causse, 2010).

**Tabla 1.8** Compuestos aislados de plantas del género *Agave* y sus actividades biológicas

Grupo del compuesto	Actividad	Especie	Referencia
Saponinas	Anticancerígeno	<i>A. fourcroydes</i>	Ohtsuki <i>et al.</i> , 2004
Saponinas	Antifúngico	<i>A. americana</i>	Yang <i>et al.</i> , 2006
Saponinas	Anticancerígeno	<i>A. americana</i> y <i>A. cantala</i>	Yang <i>et al.</i> , 2006; Sati <i>et al.</i> , 1985.
Saponinas	Anticancerígeno	<i>A. utahensis</i>	Yokosuka <i>et al.</i> , 2009
Saponinas	Anticancerígeno	<i>A. sisalana</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
Saponinas	Antiinflamatorio	<i>A. lechuguilla</i>	Soto <i>et al.</i> , 2005
Saponinas	Antiinflamatorio	<i>A. attenuata</i>	da Silva <i>et al.</i> , 2002
Saponinas	Antiparasitario	<i>A. brittoniana</i>	Orestes <i>et al.</i> , 2008
Saponinas	Antiparasitario	<i>A. salmiana</i>	Wina <i>et al.</i> , 2005
Saponinas y alcaloides	Antifúngico	<i>A. asperrima</i>	Lozano <i>et al.</i> , 2011
Saponinas y esteroides	Antihipertensivo	<i>A. americana</i> L.	Semenya <i>et al.</i> , 2012
Flavonoles	Antiinflamatorio y antioxidante	<i>A. duranguensis</i>	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> , 2009; Parveen <i>et al.</i> , 2009
Flavonoles	Inmunomodulatorio	<i>A. sisalana</i>	Chen <i>et al.</i> , 2009
Fenoles	Antiparasitario	<i>A. sisalana</i>	Botura <i>et al.</i> , 2013
Fenoles y flavonoides	Antioxidante	<i>A. americana</i>	Hamissa <i>et al.</i> , 2012
Fenoles y flavonoides	Antioxidante y antimicrobiano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> , 2012
Flavonoides	Antioxidante	<i>A. durangensis</i>	Barriada-Bernal <i>et al.</i> , 2014
Flavonoides	Antimicrobiano Antioxidante y	<i>A. salmiana</i>	Castillo <i>et al.</i> , 2007
Flavonoides	Antiinflamatorio	<i>A. salmiana</i>	Perricone, 2004 y Causse, 2010
Alcaloides	Antifúngico	<i>A. americana</i>	Rosas <i>et al.</i> , 2011
Taninos	Antimicrobiano y antiviral	<i>A. salmiana</i>	Hipólito, 2007
Polisacáridos	Antioxidante	<i>A. sisalana</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Terpenos	Antiinflamatorio	<i>A. salmiana</i>	Calange, 2011

### 1.5 Compuestos con actividad antioxidante y compuestos fenólicos en plantas

Los antioxidantes se definen como aquellos compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo el inicio y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los beneficios que ofrecen este tipo de compuestos dentro de la salud

humana se conocen desde la antigüedad en conjunto con el nacimiento de disciplinas como la farmacopea y la fitoterapia en el siglo XV, atendiendo padecimientos como hipertensión, problemas renales, problemas inflamatorios, patologías cardiovasculares, enfermedades tumorales entre otros, por ello su importancia dentro de la investigación. Los estudios realizados a diversas plantas de tipo medicinal y alimentaria indican que los compuestos antioxidantes más representativos son los polifenoles con un gran potencial antioxidante, ya que engloban un gran grupo de compuestos como flavonoides, quinonas, ácidos fenólicos, flavonoles, flavonas y taninos, también se han aislado compuestos como aceites esenciales, terpenos, saponinas, alcaloides, proteínas y polipéptidos que ejercen la misma actividad bajo mecanismos de acción diferentes (**Tabla 1.9**) (Coronado *et al.*, 2014).

Por ejemplo en un estudio se demostró que los flavonoides catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina-galato y epigalo-catequina ejercen su actividad antioxidante mediante una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de especies reactivas del oxígeno (ERO), además de la inhibición de enzimas, tales como: lipoxigenasa, ciclo-oxigenasa, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa (Garrido *et al.*, 2013), así mismo y por pertenecer al mismo grupo de los fenoles, las quinonas ejercen su acción de manera muy similar que los flavonoides con una unión específica en los aniones superóxidos (Mansour *et al.*, 2002). Por otro lado dentro de este mismo grupo también se ha encontrado que los ácidos fenólicos, los flavonoles, las flavonas y los taninos ejercen su acción antioxidante donando su ion de H disponible en tanto su estructura química lo permita, es así que las flavonoles (galangina, kaempferol, quercetina miricetina) lo realizan por sustitución del ion H del anillo B de su estructura (Brewer, 2011).

Por su parte los alcaloides, terpenos, aceites esenciales, deben su actividad antioxidante a la inhibición por uniones específicas a ciertas enzimas oxidantes (lipoxigenasa) (Yanishlieva *et al.*, 1999; Mišík *et al.*, 1995; Rackova *et al.*, 2007).

**Tabla 1.9.** Mecanismo de acción de los principales grupos de compuestos con actividad antioxidante aislados de plantas

Clase	Subclase	Ejemplo	Mecanismo
Fenoles	Flavonoides	Catequina, Epicatequina Epiga-locatequina, Epicatequina-galato Epigalo-catequina	Propiedades quelantes de hierro e inhibición de enzimas <sup>1,2</sup>
	Quinonas	Timoquinona	Unión específica para anión superóxido y quelante general de radicales libres <sup>4</sup>
	Ácidos fenólicos	Ácido gálico Ácido protocatecúico, Ácido cafeico Ácido rosmarínico	Donación del ion H <sup>5</sup> .
	Flavonoles	Galangina, Kaempferol, Quercetina Miricetina	Captación de radicales libres por sustitución del anillo B de su estructura <sup>5</sup> .
	Flavonas	Naringenina	Unión preferentemente a metales en los grupos 5-hidroxilo y 4-oxo <sup>5</sup> .
	Taninos	Ácido tánico	Oxidación de lípidos, captación de oxígeno y radicales derivados del oxígeno por los radicales OH expuestos <sup>6</sup> .
Alcaloides		Berberina Oxyberberina Jatrorrhizina Columbamina	Inhibición de enzimas oxidantes como la lipoxigenasa por unión específica con el átomo de hierro en el centro catalítico de la enzima <sup>7,8</sup> .
Terpeno, aceites esenciales		Timol Carvacrol	Inhiben la peroxidación de los fosfolípidos liposómicos en función a la concentración <sup>3</sup>
Saponinas		Soyasaponinas	La fracción glucosídica elimina superóxidos formando compuestos intermedios de hidroperóxido <sup>9</sup> .
Proteínas y polipéptidos		Secuencias de polipéptidos: Pro-Tir-Ser-F-Lis, Gli-F-Gli-Pro-Glu-Leu y Val-Gli-Gli-Arg-Pro	Oxidación de lípidos mediante inactivación de especies reactivas de oxígeno, eliminación de radicales libres, quelación de metales de transición prooxidativos y reducción de hidroperóxidos <sup>10,11</sup> .

1) Garrido *et al.*, 2013, 2) Pérez, 2003, 3) Yanishlieva *et al.*, 1999, 4) Mansour *et al.*, 2002, 5) Brewer, 2011, 6) Kim *et al.*, 2010, 7) Mišik *et al.*, 1995, 8) Rackova *et al.*, 2007, 9) Francis *et al.*, 2002, 10) Elias *et al.*, 2008, 11) Zou *et al.*, 2016.

Actualmente el aumento de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas vinculadas a la necesidad del ser humano de optar por una alimentación más saludable, ha despertado interés en las fuentes naturales de compuestos nutracéuticos como los antioxidantes. Tan solo en México, durante los últimos años se ha incrementado el consumo de hierbas aromáticas, tanto en la condimentación de comidas como en forma de infusiones o bebidas con fines terapéuticos, identificadas como una valiosa fuente de diversos fitoquímicos (González-Jiménez *et al.*, 2015).

Por lo anterior, existen recientemente diversos estudios enfocados en la búsqueda de nuevas fuentes naturales que provean de este tipo de compuestos y en la búsqueda de compuestos nuevos con mejores propiedades antioxidantes.

### **1.5.1 Compuestos con actividad antioxidante y compuestos fenólicos en el género *Agave***

El género *Agave*, ha tomado importancia en el área de la fitoquímica debido a los compuestos antioxidantes aislados de las distintas partes de la planta y de sus productos. Por ejemplo, Reyes-Munguía *et al* (2009) evaluaron el potencial redox de la capacidad antioxidante de los fenoles totales presentes en los extractos acuosos obtenidos a partir de hojas frescas y de hojas secas de maguey morado (*Rhoeo discolor*), esto con el fin de determinar el tratamiento con mayor actividad antioxidante. Los resultados mostraron que el extracto de hojas frescas obtuvo un alto contenido de antioxidantes significativamente mayores que en el extracto de hojas secas.

En otro estudio se analizaron las flores comestibles de *Agave durangensis* evaluando las propiedades antioxidantes y composición de flavonoides de extractos de diferente hidrofobicidad. El análisis cromatográfico reveló la presencia de ocho flavonoles (cinco glicósidos de quercetina y tres glicósidos de canferol), que variaron en número y concentración en los extractos, siendo los extractos de las flores los que tuvieron el contenido más alto de flavonoides (1210.4 µg/g extracto seco) en comparación a los extractos blanco (crudo) (Barriada-Bernal *et al.*, 2014).

Por otra parte, también se han analizado las propiedades antioxidantes de productos populares obtenidos del *Agave* como el mezcal, el aguamiel y el pulque. Como muestra un análisis realizado al aguamiel obtenido del *Agave atrovirens*, en el cual se indica la presencia de

saponinas y compuestos fenólicos los cuales mostraron elevada actividad antioxidante (Romero-López-Romero *et al.*, 2015).

En otro estudio también se analizó el mezcal obtenido a partir de *Agave duranguensis*, en este caso se evaluó la actividad antioxidante, la concentración de fenoles totales y los principales componentes fenólicos con respecto al tiempo de maduración de la bebida en barricas de roble americano. Los resultados mostraron incremento en todas las determinaciones, siendo mayoritarios en las bebidas que permanecieron por más tiempo en las barricas (207 días) y se observó una mayor complejidad de los compuestos fenólicos (11 ácidos fenólicos y 3 flavonoides) en el mezcal añejado (Ávila-Reyes *et al.*, 2010).

Por otro lado en el aguamiel se han realizado estudios de actividad antioxidante en las especies *A. salmiana* y *A. atrovirens*. En *A. salmiana* se determinó tanto la actividad antioxidante como el contenido de fenoles totales, encontrándose un valor de 1096.8  $\mu\text{mol TE}$  y 904.8  $\mu\text{M GAE}$ , respetivamente (Tovar-Robles *et al.*, 2011). Y en *A. atrovirens*, a la bebida se le realizaron extracciones con metanol y acetona, evaluando luego su actividad antioxidante y contenido de fenoles totales. En este caso ambos resultados fueron mayores en el extracto acetónico (182.10  $\mu\text{M TE/g}$  de extracto y 19.26 mg GAE/g de extracto, respectivamente) (Santos-Zea *et al.*, 2012).

Otra de las bebidas populares del *Agave* a la que también se le han evaluado sus propiedades antioxidantes es el pulque. Tovar-Robles *et al* (2011) evaluaron la actividad antioxidante (técnica de DPPH) así como el contenido de fenoles totales de dicha bebida, obteniendo 567.2  $\mu\text{mol TE}$  y 452  $\mu\text{M GAE}$  respectivamente.

## **1.6 Compuestos con actividad antimicrobiana en plantas**

Las especies vegetales poseen de manera natural mecanismos de resistencia ante el ataque de patógenos los cuales pueden ser constitutivos (histológicas o químicas) o defensas inducidas por factores externos. Los constitutivos comprenden barreras físicas, procesos de lignificación, suberización y formación de calosa así como la formación de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas como parte de la estructura de los tejidos. Las defensas inducidas por su parte, son un proceso complejo que parte desde la señal química o elicitador que desencadena la producción de enzimas del metabolismo secundario, cuyo resultado final sería

la síntesis de compuestos antimicrobianos, los cuales afectan además de los patógenos, a los consumidores de las plantas y a sus enemigos naturales (Montes-Belmont, 2009).

La defensa mediante compuestos químicos tiene dos vertientes; aquellos compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, que están estructuralmente presentes en todas las etapas del desarrollo de la planta, en alguna fase de su ciclo biológico, o bien que son producidos después de una infección pero a partir de compuestos ya existentes y que algunos autores llaman “inhibitinas” o también “compuestos constitutivos”.

Los compuestos antimicrobianos constitutivos se pueden encontrar siempre en concentraciones suficientes para inhibir el desarrollo de patógenos o bien, pueden encontrarse en las plantas sanas en una forma inactiva y después de la infección son convertidas en productos antimicrobianos por medio de reacciones bioquímicas cortas y simples, como la hidrólisis enzimática (Pedras *et al.*, 2015). Dichos compuestos pertenecen a las principales clases de metabolitos secundarios, como son, terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno, los cuales se presume ejercen una función directa con el crecimiento y desarrollo de la planta, como la fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz *et al.*, 2010).

Los metabolitos procedentes de plantas que actúan como inhibidores de microorganismos lo realizan bajo mecanismos de acción dependiente de la estructura del compuesto (**Tabla 1.10**). Siendo en las plantas el grupo de los fenoles los que se encuentran en mayor proporción, existen diversos estudios sobre al respecto. Por ejemplo Gyawali R. e Ibrahim S. (2014) sugieren que el sitio y el número de grupos hidroxilo del grupo fenol están relacionados con su toxicidad relativa para los microorganismos, con evidencia de que el aumento de la hidroxilación da como resultado un aumento de la toxicidad. Por ello se cree que los mecanismos responsables de la toxicidad fenólica a los microorganismos incluyen la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilo o a través de interacciones más inespecíficas con las proteínas externas del microorganismo (Lima *et al.*, 2016).

Otro grupo de compuestos con elevada actividad antimicrobiana son los alcaloides, estos compuestos especialmente los alcaloides cuaternarios (berberina y harmina) ejercen su capacidad inhibitoria al intercalarse con el ADN del microorganismo (Upadhyay *et al.*, 2014).

El siguiente grupo de compuestos antimicrobianos son los terpenos, que pese a la falta de información que explique el mecanismo de acción, se tienen algunos estudios que sugieren su intervención en la disrupción de la membrana bacteriana por los compuestos lipófilos. Lo cual se corrobora en el estudio realizado por López-Romero *et al* (2015), donde aislaron carveol, carvona, citronelol y citronelal, los cuales ejercieron actividad antibacteriana al interactuar con los fosfolípidos de la membrana y los grupos fosfato del microorganismo (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) para después dañar las estructuras de la membrana celular, provocando muerte celular.

Por su parte las saponinas, también consideradas como parte metabolitos con elevada actividad antimicrobiana ejercen su acción inhibitoria al formar complejos con los esteroides de las membranas celulares del microorganismo a la cadena de azúcares unida al carbono-3 de la estructura del compuesto, generando grandes poros en las mismas, provocando cambios en su permeabilidad y lisis celular (Díaz, 2009).

Por otro lado están los compuestos que se encuentran en menor proporción en las plantas, las proteínas y polipéptidos, cuyo mecanismo de acción puede deberse a la formación de canales iónicos en la membrana microbiana (Nawrot *et al.*, 2014) o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas microbianas a los receptores de polisacáridos del hospedador (Mardirossian *et al.*, 2014).

Finalmente además de los compuestos ya mencionados, otros estudios sugieren que los poliacetilenos, también son un grupo de compuestos que si bien no se encuentran en todas las plantas, son metabolitos que cabe mencionar por sus efectos antimicrobianos de elevado espectro (Negri, 2015). Lo cual se corrobora con el estudio realizado a la esponja del Mar Rojo, *Xestospongia* sp (Ayyad *et al.*, 2015), del cual se aislaron 2 poliacetilenos: Acil-glicerolípido, R-galactopiranosilglicerol y xestospongiamida, que presentaron actividad inhibitoria frente diversas bacterias y hongos (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*).

**Tabla 1.10** Mecanismo de acción de los principales grupos de compuestos con actividad antimicrobiana aislados de plantas

Clase	Subclase	Ejemplo	Mecanismo
Fenoles	Fenoles simples	Catcol y epicatequina	Privación de sustrato y disrupción de la membrana
	Ácidos fenólicos	Ácido clorogénico	Aumenta la permeabilidad de la membrana externa y plasmática <sup>1</sup> . Se une a las adhesinas, complejo con la pared celular, inactiva las enzimas
	Flavonoides	Crisina	Inactiva las enzimas e inhibe la transcriptasa inversa del VIH
	Flavones	Abisinona	Alteración en la integridad y permeabilidad de las membranas celulares <sup>2</sup> .
	Flavonoles	Totarol	Enlace a las proteínas, unión a adhesinas, inhibición enzimática, privación de sustrato e interrupción de la membrana.
	Taninos	Eligitanina	Interacción con ADN eucariótico (actividad antiviral)
	Cumarinas	Warfarina	
Terpenos, aceites esenciales		Capsaicina	Disrupción de la membrana
Alcaloides		Berberina y piperina	Interacción en la pared celular y/o ADN
Saponinas		Tomatina	Forma complejos con los esteroides de las membranas celulares a la cadena de azúcares unida al carbono-3 <sup>3</sup> .
Proteínas y polipéptidos		Aglutinina	Impide la formación de puentes disulfuro
Poliacetilenos <sup>4</sup>		Acil-glicerolípido, 2'-O-(7E,17E-18-bromo-octaoctadeca-7,17-dien-5,15-dinoil)-3'-O-(9E,13E,17E)-18-bromo-octaoctadeca-9,13,17-dien-7,15-dinoil-1'-O-β-D-galactopiranosilglicerol y xestospongiamida.	¿?

Adaptado de Cowan, 1999. 1) Lou *et al.*, 2011, 2) Shi *et al.*, 2018, 3) Díaz, 2009, 4) Ayyad *et al.*, 2015

### 1.6.1 Compuestos con actividad antimicrobiana en el género *Agave*

Diversos metabolitos que ejercen actividad antimicrobiana, se han aislado de diversas fuentes vegetales con un especial atención al género de *Agave*, debido a que se han realizado diversos estudios a sus hojas, flores y raíz indicando que esta planta es una fuente importante de compuestos con acción biológica de índole fitoquímico y de sensibilidad antimicrobiana. Las técnicas más utilizadas para este propósito han sido las extracciones con disolventes orgánicos, mostrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) contra una gran variedad de microorganismos, que incluyen bacterias, hongos y algunas levaduras (Lozano *et al.*, 2011).

Por ejemplo, se ha reportado que los extractos metanólicos y etanólicos de las hojas y flores del *Agave aspérrima*, poseen elevadas concentraciones de saponinas y alcaloides, que inhiben el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) en *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*, dos hongos que se clasifican como potenciales hepatocarcinógenos (Lozano *et al.*, 2011). Mientras que los extractos metanólicos del *Agave americana*, poseen principalmente alcaloides que afectan de manera importante la producción de aflatoxinas del hongo *Aspergillus parasiticus* (Rosas *et al.*, 2011).

Otro estudio sugiere que el extracto metanólico de las hojas del *Agave attenuata* ejerce efectos inhibitorios moderados en bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Rizwon *et al.*, 2012); *Agave americana*, *Agave ferox*, *Agave montana*, *Agave marginata* y *Agave scabra*, mostraron hasta un 69.31% de inhibición en el crecimiento de hifas del hongo *Postia placenta* (Siddhapura *et al.*, 2011), finalmente extractos etanólicos de las hojas y el escapo del *Agave picta*, expresaron inhibición en bacterias como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* (Verástegui *et al.*, 2008).

En la planta *Agave salmiana*, los análisis realizados tanto en hojas como en flores indican la presencia de varias saponinas, como la hecogenina, manogenina, yuvagenina, agavogenina, sarsapogenina, texogenina, esmilagenina, gotogenina, tigogenina y clorogenina, las cuales presentan actividad para desparasitar animales, al generar una interacción con el colesterol localizado en la membrana plasmática del protozoo, provocando la disrupción celular (Wina *et al.*, 2005). En la misma estructura también se han identificado taninos, que han sido utilizados como agentes antibacterianos, en contra de *S. aureus*, y como coadyuvantes en el tratamiento contra el virus de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Hipólito, 2007). Por último, se han

aislado flavonoides de las hojas y flores de ésta planta presentado actividad antimicrobiana (abisinona I y V) frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Castillo *et al.*, 2007).

A pesar de sus resultados positivos en ensayos biológicos, los extractos de Agave no han sido ampliamente evaluados en sistemas de alimentos y áreas farmacéuticas, y estos campos representan una ruta potencial para mejorar el uso de plantas de Agave como aditivos alimentarios y agentes para el tratamiento de enfermedades médicas.

### **1.7 Procesos de extracción de compuestos con actividad biológica**

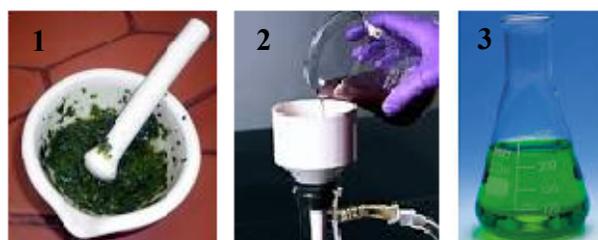
El proceso de extracción de compuestos funcionales procedentes de especies vegetales tiene sus inicios en la medicina antigua aproximadamente en el siglo XV, en el desarrollo de disciplinas farmacológicas como la farmacopea o fitoterapia, en las cuales era primordial la obtención principalmente de aceites esenciales a los cuales se les adjudicó diversas funciones benéficas para la salud (Castillo, 2007), sin embargo a través de los años los procedimientos extractivos se vieron modificados tanto por la especificidad de los compuestos bioactivos presentes en las plantas así como por las propiedades físicas de las fuentes vegetales, de tal manera que se aprovechan las propiedades químicas de diversos disolventes para extraer por afinidad química una mayor cantidad y variedad de compuestos bioactivos así como la aplicación de procedimientos más adecuados para aumentar la extractibilidad de dichos compuestos, siendo útil aplicar procedimientos mecánicos en las partes fibrosas de la plantas (raíces y tallos) y menos agresivas (percolación, decocción, arrastre de vapor o extracción con equipo Soxhlet), en las partes suculentas de las mismas (hojas, flores y fruto) (Gennaro, 2009).

Seguido se describen los principales procedimientos extractivos utilizados en plantas (maceración, percolación y arrastre de vapor) por su fácil aplicación, alto rendimiento y bajo costo:

**La maceración;** es un proceso extractivo en el cual la muestra vegetal puede utilizarse ya sea en estado seco o en fresco y es indispensable el uso de disolventes que logren solubilizar los compuestos activos de interés, permitiendo liberar los compuestos por fragmentación del tejido. En este proceso existe un equilibrio de concentración entre el tejido vegetal y el disolvente, que va a depender de factores relacionados al material vegetal como su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y cantidad, además de factores relacionados con el disolvente, como la selectividad, cantidad y concentración. La velocidad con que se obtiene este

equilibrio está en función del tamaño de partícula del tejido vegetal y de las propiedades del disolvente como su viscosidad y polaridad (Sharapin, 2010).

El proceso clásico de maceración consiste en dejar a temperatura ambiente la muestra triturada en contacto con el disolvente, sin renovación del líquido extractor por tiempos prolongados y en agitación ocasional por al menos 24 h, pudiéndose extender hasta 7 días, a excepción del disolvente del agua, ya que el tiempo debe ser corto de 24 a 36 horas, para evitar fermentación o formación de moho. Transcurrido ese tiempo, se obtiene el extracto filtrando la mezcla y se elimina el residuo vegetal (Sharapin, 2010) (**Figura 1.8**). Este proceso, también conocido como maceración simple o estática, es sumamente lento. Para acortar el tiempo de operación, el material vegetal y el disolvente deben mantenerse en movimiento constante, procedimiento que se describe como maceración dinámica (Castillo, 2007).

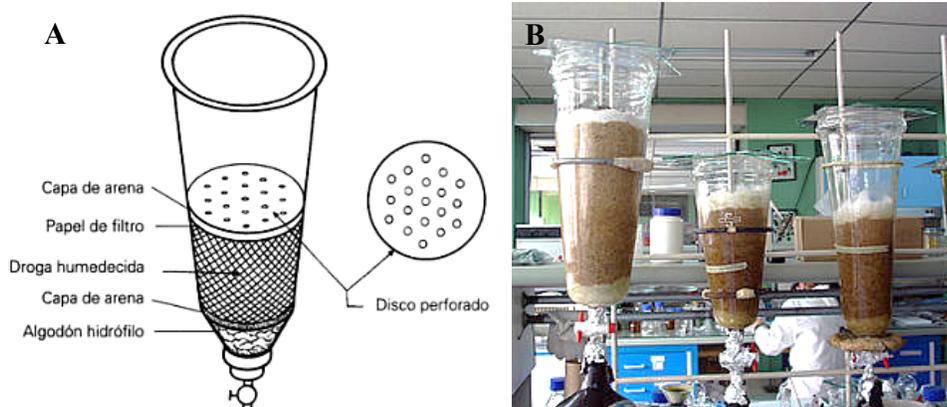


**Figura 1.8** Proceso de extracción vegetal por el método de maceración. 1.- Maceración, 2.- Filtración y 3.-Recolección

Las desventajas del proceso de maceración son; el tiempo y el rendimiento, ya que no es posible alcanzar la extracción completa del 100% de los principios activos, debido a la saturación del líquido extrayente y el establecimiento de un equilibrio difusional entre medio extractor y el interior de la célula, por lo que para eficientar la extracción la operación de maceración (estática o dinámica) puede repetirse varias veces, después de escurrido el disolvente de la extracción anterior (Bagué, 2012).

Los compuestos antimicrobianos que se pueden extraer por medio de la maceración son principalmente aquellos de naturaleza termolábil, como las proteínas y aminoácidos ya que el proceso se realiza a temperatura ambiente, sin embargo no resulta útil para la extracción de compuestos volátiles como los terpenos debido a que los tiempos de exposición del material vegetal y el disolvente son prolongados, favoreciendo la liberación de los mismos (Castillo, 2007).

**La percolación;** es un procedimiento de extracción que implica el uso de aparatos específicos de cuerpo cilíndrico o cónico, denominados percoladores, provistos de un grifo en la parte interior para regular el flujo del disolvente (**Figura 1.9**). El proceso consiste en hacer pasar el disolvente a través del material vegetal seco y molido colocado previamente en el percolador, hasta su extracción completa debido a que, constantemente se adiciona disolvente puro por la parte superior del aparato, de tal manera que se compensa la cantidad de disolvente que sale por la parte inferior (Gennaro, 2009) El material vegetal comprende una etapa preliminar en la que se humedece con el disolvente antes de colocarlo en el percolador. Lo cual tiene como objetivo aumentar la superficie de contacto, facilitando el paso del disolvente y evitando la formación de falsas vías, que finalmente perjudican la eficiencia del proceso. Es así que el humedecimiento del material vegetal aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células (Sharapin, 2010).



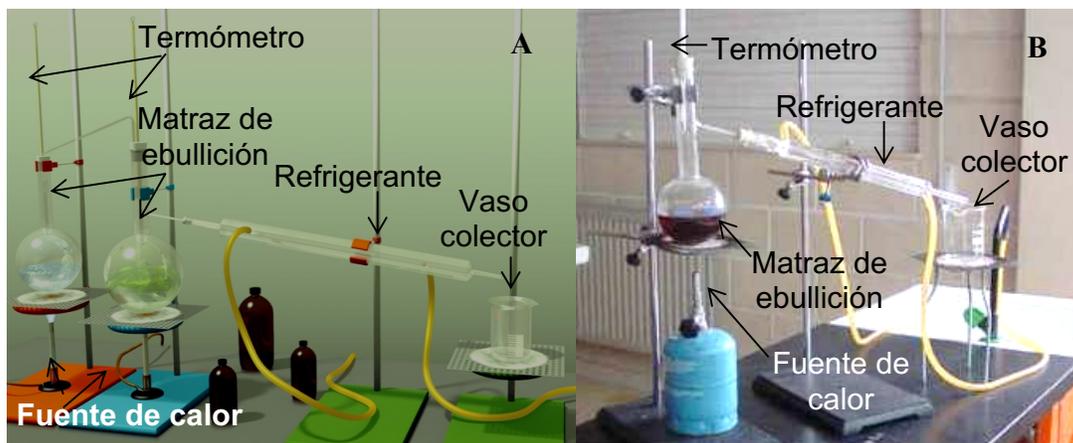
**Figura 1.9** Equipo de extracción tipo percolador A) Partes principales, B) Montaje en laboratorio (Sharapin, 2010 y Porroche, 2013)

De igual manera que el proceso de maceración, la percolación se realiza a temperatura ambiente facilitando la extracción de compuestos antimicrobianos termolábiles como proteínas, aminoácidos y algunas hormonas. Sin embargo en este proceso a diferencia de la maceración se favorece la separación de los compuestos funcionales, ya que eluirán primero los compuestos que tengan mayor solubilidad con el disolvente y se colectarán al inicio, representados en forma de fracciones del extracto, dejando al final a los compuestos que tienen menor solubilidad con el disolvente, permitiendo de esta manera ser analizados de manera individual (Sharapin, 2010).

La desventaja del proceso de percolación es el consumo elevado de disolvente. Por ello es aconsejable hacer recircular el mismo disolvente a través del material vegetal, varias veces, aumentando el tiempo de contacto del material vegetal con el disolvente así como la eficiencia de la operación. Este proceso de recirculación representa una variante de la percolación en el cual el aparato de extracción más utilizado es el Soxhlet (Lamarque, 2012).

Dentro de un mismo tejido vegetal existen compuestos antimicrobianos de diversa naturaleza, los principales son altamente solubles en agua como son; fenoles, carbohidratos, proteínas, aminoácidos, saponinas, taninos y glucósidos (Raaman, 2006), sin embargo también se encuentran compuestos como esteroides, terpenos y alcaloides que son fácilmente extraíbles con disolventes orgánicos poco polares, como hexano y acetona. Para este último caso, el procedimiento de extracción más utilizado es la **destilación por arrastre de vapor** (Ringuelet *et al.*, 2010).

El proceso de **destilación por arrastre de vapor** permite aislar compuestos antimicrobianos insolubles en agua de punto de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura (siempre inferior a 100°C). Para ello existen dos métodos, el método directo y el método de vapor vivo. En el primer método, el vapor se genera *in situ* (en el mismo matraz) por calentamiento del matraz de ebullición que contiene agua y el material vegetal. En el segundo método, el vapor se hace pasar dentro del matraz de ebullición usando un tubo de interconexión. (**Figura 1.10**). La técnica consiste básicamente en colocar el material vegetal seco y triturado en el matraz de ebullición con la cantidad suficiente de agua que lo cubra en su totalidad. Esta mezcla se somete a ebullición constante hasta que el vapor junto con los componentes volátiles de la muestra pasan a través del condensador y fluyen hacia el matraz colector, dejando en el matraz de ebullición los compuestos no volátiles y solubles en agua. Finalmente los compuestos insolubles en agua son fácilmente extraídos del agua condensada al decantar o filtrar (Ocampo, 2008).



**Figura 1.10** Tipos de equipo para los métodos de destilación por arrastre de vapor A) Método directo, B) Método de vapor vivo (Parra, 2013).

Es importante considerar que para hacer más eficiente la concentración de compuestos bioactivos es necesario determinar experimentalmente el número de extracciones, el tiempo de extracción, la concentración y selección del disolvente para cada tipo de extracción, debido a que estos requerimientos se modificarán en función a las características generales del material vegetal así como del compuesto de interés (Bagué, 2012).

### **1.7.1 Efecto del uso de disolventes en la obtención de extractos con actividad biológica**

En un proceso de extracción, la elección y concentración adecuada del disolvente extractor así como la forma en que interactúan entre sí varios disolventes, son factores importantes que influyen en la obtención de los principios activos contenidos en plantas así como en la posible modificación de estos durante el proceso extractivo, donde la selección del disolvente estará en función de la naturaleza química de las sustancias benéficas, por lo cual resulta importante conocer tanto las características químicas como las propiedades principales de disolución de los compuestos a extraer (Sharapin, 2010).

Una de las propiedades importantes que brindan características químicas de disolución a los diversos compuestos es, la solubilidad, la cual se define como la capacidad que tienen las sustancias de poder formar un sistema homogéneo con un disolvente. Algunos de los factores que afectan dicha propiedad son, superficie de contacto, grado de agitación, temperatura,

presión y naturaleza del disolvente. Los primeros cuatro son factores que se determinarán de acuerdo al proceso mecánico, químico o físico de la extracción, en cuanto a la naturaleza del disolvente, se trata de un análisis más profundo, en el cual se analiza la selección más adecuada del disolvente extractor en función a la posible interacción química entre los compuestos bioactivos y el disolvente, con base en sus propiedades químicas como la polaridad, constante dieléctrica y miscibilidad, principalmente (Autino *et al.*, 2013). A continuación se describe brevemente cada uno de ellos.

La polaridad se define como la capacidad de una molécula para ejercer interacciones intermoleculares de naturaleza electrostática, debidas a una distribución asimétrica de las cargas eléctricas entre sus átomos, lo cual confiere a la molécula propiedades de solubilización ante diferentes solutos. Y existen varios parámetros para medir la capacidad de la polaridad de una sustancia como son la diferencia de electronegatividad y el índice de polaridad principalmente (Ballesteros *et al.*, 2013).

El primer parámetro se refiere a la diferencia de electronegatividad, la cual se define como la capacidad de los átomos para atraer hacia sí los electrones de los enlaces de una molécula, que puede ser medida con la escala de Pauling, de esta manera, cuando existe una diferencia mínima o nula de electronegatividad entre los átomos enlazados ( $\Delta X < 4$ ) se considera que existe un enlace covalente puro o covalente apolar (como el  $\text{CH}_4$ , el  $\text{H}_2$  o el  $\text{Cl}_2$ ) y al no ejercer fuerzas intermoleculares eléctricas significativas las moléculas poseen bajos puntos de fusión y ebullición, por lo cual son volátiles además de ser insolubles en agua, dos características que resultan importantes a considerar durante el proceso extractivo. En cambio cuando la diferencia de electronegatividad es moderada ( $4 < \Delta X < 1.7$ ) (como el  $\text{NH}_3$  o el  $\text{H}_2\text{O}$ ) los enlaces covalentes tienen una distribución asimétrica de la densidad electrónica generando que los enlaces presenten polaridad y produciendo moléculas con propiedades hidrosolubles y menos volátiles (Autino *et al.*, 2013).

El segundo parámetro que permite cuantificar la polaridad de las moléculas se denomina índice de polaridad ( $P'$ ), desarrollada por Snyder en 1978, mide la atracción intermolecular entre un soluto y un disolvente y, se basa en las medidas de solubilidad para la sustancia en función de tres disolventes: dioxano (un aceptor de protones de dipolo débil), nitrometano (un aceptor de protones de dipolo intenso) y etanol (un donador de protones de dipolo intenso),  $P'$ , por tanto,

es una medida numérica de la polaridad relativa de varios disolventes (McMurry, 2012) (**Tabla 1.11**).

Por otro lado, existe un tercer parámetro llamado momento dipolar (medida de la intensidad de la fuerza de atracción entre dos átomos) el cual inicia en el proceso extractivo cuando el disolvente seleccionado penetra la célula vegetal y expulsa el aire contenido en el citoplasma, produciéndose cargas parciales positivas ( $\delta^+$ ) y negativas ( $\delta^-$ ) en el sistema, de esta manera las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del disolvente empleado y finalmente son obtenidas del material vegetal (Rivas-Morales *et al.*, 2016). La capacidad de asociación entre estas moléculas y las moléculas del disolvente, puede expresarse en términos de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), indicando que entre más polar sea un disolvente mayor será su constante dieléctrica, siendo aquellos compuestos ionizables y/o altamente polares extraíbles fácilmente con disolventes de elevada constante dieléctrica y los compuestos apolares por disolventes con bajo valor en este parámetro (Ballesteros *et al.*, 2013). En la **tabla 1.11** se muestra los valores de constante dieléctrica de algunos disolventes utilizados en extracciones vegetales.

Otro parámetro de los disolventes como el número de miscibilidad permitirá una selección adecuada de disolventes para obtener una mezcla de dos disolventes en la extracción. La miscibilidad de los disolventes es la propiedad que tienen estos para mezclarse con otro líquido en cualquier proporción, formando una solución homogénea y su medición está dada por diagramas de fases líquido-líquido, que se rigen por la regla de fases de Gibbs, que involucra variables como temperatura y presión específicas a las cuales los disolventes presentan miscibilidad entre sí, como se muestra en la siguiente ecuación (Atkins, 2008).

$$F = C - P + 2$$

donde F = número de grados de libertad, C = número de componentes, P = número de fases presentes y 2 = es el número de variables de estado del sistema (temperatura y presión).

Con base en lo anterior existen algunas consideraciones a tomar en cuenta para relacionar los datos de número de miscibilidad entre disolventes, tales como, restar inicialmente el valor del número M más pequeño del valor del número M más grande de los disolventes, si la diferencia entre los números M es de 15 o menos, los dos líquidos son miscibles en todas proporciones a 15 °C, en cambio si resulta una diferencia de 16 indica una temperatura de solución crítica de 25°C a 75 °C, con 50°C como temperatura óptima y al ser la diferencia de 17 o mayor, los

líquidos no son miscibles o su temperatura de solución crítica es superior a los 75 °C (Atkins, 2008) (Tabla 1.11).

**Tabla 1.11** Principales parámetros de solubilidad de algunos disolventes

Disolvente	Constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) a 25°C	Índice de polaridad (°P)	Número de miscibilidad (M)
Hexano	1.89	0.0	29
Ciclohexano	2.02	0.0	28
Benceno	2.28	3	21
Tolueno	2.38	2.3	23
Acetonitrilo	3.88	6.2	11
Acetato de etilo	6.02	4.3	19
Ácido acético	6.15	6.2	14
Tetrahidrofurano	7.58	4.2	17
Piridina	12.3	5.3	16
2-propanol	18.3	4.3	15
1-propanol	20.1	4.3	15
Acetona	20.7	5.4	17
Etanol	24.3	5.2	14
Metanol	33.6	6.6	12
Agua	78.3	9.0	-

Modificado de Sharapin, 2010.

Con base en las diversas propiedades químicas de los disolventes existen diversos estudios que han aprovechado estas características para la obtención de compuestos con actividad biológica, ya que estos compuestos presentes en la materia vegetal permiten ser extraídos por disolventes con propiedades químicas similares, tal es el caso de Azmir *et al* (2013), quienes indican que el agua es el mejor disolvente para extraer antocianinas, taninos, saponinas y terpenoides; por su parte otro estudio indica que el metanol debido a su polaridad media-alta (6.6) puede extraer compuestos como alcaloides, aminoácidos, proteínas y flavonoides, principalmente (Swathi, 2016; Chakrabort *et al.*, 2010) y disolventes menos polares como el hexano y cloroformo han sido utilizados para extraer alcaloides, terpenos y flavonoides como mayoritarios en plantas (Khanam *et al.*, 2015; Swathi, 2016; Naufalin *et al.*, 2017) (Tabla 1.12). En la tabla 1.12 se concentran los principales disolventes utilizados para extraer compuestos bioactivos de plantas, en la cual en primera instancia se puede observar que cada grupo de compuesto posee características muy diferenciadas entre sí sin embargo, estos pueden ser aislados de manera conjunta por medio de un disolvente en común debido principalmente a fracciones de la estructura similares como se ha mencionado en estudios previos realizados en las fracciones glucosídicas de las saponinas (Chen *et al.*, 2011).

**Tabla 1.12** Disolventes utilizados para la extracción de compuestos bioactivos a partir de plantas

Agua	Metanol	Etanol	Acetona	Acetato de etilo	Cloroformo	Hexano
Antocianinas <sup>1</sup>	Antocianinas <sup>1</sup>	Taninos <sup>1</sup>	Flavonoides <sup>1,2,4,5</sup>	Terpenos <sup>7</sup>	Alcaloides <sup>4</sup>	Esteroides <sup>7,8</sup>
Taninos <sup>1</sup>	Saponinas <sup>1</sup>	Polifenoles <sup>1</sup>	Alcaloides <sup>3,5,6</sup>	Alcaloides <sup>7</sup>	Fenoles <sup>4</sup>	Alcaloides <sup>5,7</sup>
Saponinas <sup>1</sup>	Taninos <sup>1</sup>	Terpenoides <sup>1</sup>	Proteínas <sup>4,5</sup>	Flavonoides <sup>7</sup>	Flavonoides <sup>4</sup>	Triterpenos <sup>7</sup>
Terpenoides <sup>1</sup>	Flavonas <sup>1</sup>	Saponinas <sup>3</sup>	Fenoles <sup>4,6</sup>	Saponinas <sup>5</sup>	Terpenos <sup>4</sup>	Glicósidos <sup>7</sup>
Almidón <sup>2</sup>	Polifenoles <sup>1</sup>	Flavonoides <sup>1,3,6</sup>	Carbohidratos <sup>s3,5</sup>	Taninos <sup>5</sup>		Saponinas <sup>5</sup>
Polipéptidos <sup>2</sup>	Terpenoides <sup>1,4,5</sup>	Alcaloides <sup>1,3,6</sup>	Saponinas <sup>3,5</sup>	Proteínas <sup>5</sup>		Taninos <sup>5</sup>
Lectinas <sup>2</sup>	Xantoxilinas <sup>2</sup>	Poliacetilenos <sup>2</sup>	Taninos <sup>3,5</sup>	Aminoácidos <sup>5</sup>		Aminoácidos <sup>5</sup>
Alcaloides <sup>3</sup>	Totarol <sup>2</sup>	Esteroles <sup>2</sup>		Flavonoides <sup>5</sup>		Proteínas <sup>5</sup>
Glucósidos <sup>3</sup>	Quasinoide <sup>2</sup>	Propóleos <sup>2</sup>				Flavonoides <sup>5</sup>
Aminoácidos <sup>3</sup>	(triterpenos)	Glucósidos <sup>2</sup>				Quinonas <sup>5</sup>
Proteínas <sup>3</sup>	Lactonas <sup>2</sup>	Cumarinas <sup>2</sup>				Terpenoides <sup>5</sup>
Fenoles <sup>3</sup>	Fenonas <sup>2</sup>	Aminoácidos <sup>3,6</sup>				
Flavonoides <sup>3</sup>	Alcaloides <sup>5,6</sup>	Proteínas <sup>3,6</sup>				
Cumarinas <sup>3</sup>	Aminoácidos <sup>5,6</sup>					
	Proteínas <sup>4,5,6</sup>					
	Flavonoides <sup>4,5,6</sup>					

1) Azmir *et al.*, 2013, 2) Cowan, 1999, 3) Elsie *et al.*, 2011, 4) Khanam *et al.*, 2015, 5) Swathi, 2016, 6) Chakrabort *et al.*, 2010, 7) Naufalin *et al.*, 2017, 8) Ahmed *et al.*, 2013

Por otro lado considerando lo anteriormente mencionado, algunos estudios muestran los grandes cambios que pueden ocurrir en el proceso de obtención de compuestos bioactivos (incrementos significativos en el rendimiento del extracto, la presencia de diferentes tipos de compuestos y cambios en las propiedades bioactivas de estas sustancias) al modificar parámetros en el proceso de extracción como, tipo de disolvente, la concentración del mismo, el tipo de proceso extractivo así como modificaciones en la relación masa/disolvente. Lo cual se observó en el estudio realizado por Háuad-Marroquín *et al.*, 2010, quienes al obtener extractos a partir de las hojas de *Agave tequilana* con diferentes disolventes (metanol, cloroformo y hexano) encontraron cambios en su actividad citotóxica sobre células de linfoma murino B16F10, siendo el extracto metanólico el que mostró mayor actividad (una concentración de 200 µL, dejando 55.55% de células vivas viables). Otro estudio realizado con las hojas de *Agave lechuguilla*, mostró la importancia del tipo de disolvente, relación sólido/líquido y temperatura óptima para aumentar el rendimiento de extracción de saponinas, encontrándose que las condiciones óptimas para su extracción son; metanol/agua como disolvente extractor en una relación 19:1 a 50°C (Soto *et al.*, 2005).

Por otra parte, en otras especies, también se han reportado cambios en el efecto nutracéutico de sus compuestos por efecto del proceso o disolvente utilizado para la extracción, tal es el caso

del chopé (*Gustavia augusta* L.), fruta nativa de la región amazónica, en la cual se observó un efecto sinérgico entre el extracto (etéreo, alcohólico y acuoso) y el Butil hidroxitolueno (BTH), al incrementar la actividad antioxidante de los extractos (García-Torres *et al.*, 2009) y otro estudio realizado en la corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla* donde se analizaron las propiedades antioxidantes y contenido total de fenoles utilizando diferentes concentraciones de etanol (disolvente extractor) y diferentes relaciones masa/disolvente, encontrando que la extractibilidad de fenoles incrementa con el aumento del contenido de agua (lo que puede deberse a la facilidad de extracción por la solubilidad que presentan los compuestos fenólicos en la muestra) y mayores rendimientos en relaciones masa/disolvente que involucraron mayor volumen de disolvente, lo cual lo atribuyen a fenómenos de transferencia de masa característicos (Soto-García *et al.*, 2016).

### **1.7.2 Tipos de interacción entre el disolvente extractor y materia prima vegetal**

Por otro lado, de acuerdo a diversos estudios fitoquímicos existen tres principales formas de interacción entre el disolvente extractor y el tejido vegetal, una es la interacción con un solo tipo de disolvente (Sharapin, 2010), otra consiste en colocar dos disolventes de diferente polaridad junto con el material vegetal, en el cual es importante considerar diferentes concentraciones de cada uno de los disolventes con la finalidad de hacer más eficiente la extracción de compuestos bioactivos (Martínez-Ramírez, 2010). Y la forma de extracción secuencial, en la cual se utilizan más de dos disolventes diferentes puestos en contacto con el material vegetal de manera consecutiva iniciando con el disolvente menos polar y finalizando con el de mayor polaridad (Lamarque, 2012).

#### **1.7.2.1 Interacción individual**

El utilizar un solo tipo de disolvente en el proceso de extracción, es una de las técnicas más comunes en el estudio de un solo tipo de compuestos funcionales, debido a que la polaridad del disolvente extractor seleccionado solubilizará solo aquellos compuestos que posean la misma naturaleza, sin embargo, existe el inconveniente de obtener un gran conjunto de compuestos de la misma polaridad y sería necesario realizar otro procedimiento de separación para evaluar un solo tipo de compuesto. Además, es posible que durante la extracción algunos compuestos de diferente polaridad al del disolvente eluyan al mismo tiempo, esto por la generación de uniones

interatómicas de tipo puente de hidrógeno, generando impurezas dentro de la extracción (Ringuelet, 2010). Con el fin de minimizar estas impurezas es necesario determinar experimentalmente otros factores que intervienen dentro del proceso de extracción como la temperatura, pH y tamaño de partícula (Sharapin, 2010).

### **1.7.2.2 Interacción dual**

Por otra parte, estudios en los que se han realizado extracciones de tipo dual, donde se utilizan disolventes de diferente polaridad, sugieren que este tipo de técnica presenta mayor eficiencia de extracción que al utilizar disolventes de manera individual, debido a que los disolventes utilizados tienen diferente polaridad y al mezclarse en ciertas proporciones se incrementa la capacidad de extracción, ya que se obtienen los compuestos bioactivos afines a cada disolvente (Irianda, 2010). Este efecto también fue observado por Shene *et al.*, (2009) quienes realizaron extracciones de las hojas y del fruto de la murta, encontrando que una mezcla de 50% etanol/agua resultó más eficiente en la extracción de compuestos funcionales que con los solventes puros (agua y etanol). También Trabelsi *et al.*, (2010) trabajando con hojas de *limoniastrum monopetalum* observaron que la adición de un 20% de agua a otros disolventes como el metanol, acetona o etanol incrementaba el poder de extracción de los compuestos bioactivos.

### **1.7.2.3 Interacción secuencial**

En la técnica de extracción secuencial, existen dos formas de obtener el extracto, con base en los requerimientos del compuesto deseado. En el primer caso, se realiza la extracción secuencial separando al final del proceso las fracciones obtenidas con cada disolvente, de esta manera se aprovecha la separación selectiva de cada componente del material vegetal en función a su polaridad y se colectan de forma separada para ser analizados individualmente. En el segundo caso las extracciones realizadas con cada disolvente se colectan en una misma fracción, obteniendo en el extracto un conjunto de compuestos funcionales de diversa polaridad, con la finalidad de analizar de manera conjunta las capacidades funcionales de los compuestos del material vegetal (Ringuelet, 2010). En ambos casos el uso de los disolventes es de polaridad creciente, aumentando la eficiencia de obtención de compuestos en cada extracción consecutiva, debido a que de realizarse el proceso de manera inversa se obtendrían impurezas dentro de los

primeros extractos polares por la posible extracción de compuestos de distinta polaridad a la del disolvente (Lamarque, 2012).

Estudios que han utilizado esta técnica de extracción indican que es muy útil en la obtención de compuestos bioactivos específicos dentro de un mismo grupo funcional, ya que el uso de disolventes de manera consecutiva beneficia la obtención de un tipo de compuestos distinto estructuralmente al compuesto obtenido por extracción individual o dual (Hernández, 2011).

## **1.8 Microorganismos patógenos de interés en la industria alimentaria**

La salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad sanitaria de los alimentos que consumen diariamente, por ello una de las principales preocupaciones en la industria alimentaria, es aplicar un control sanitario adecuado, que evite el desarrollo y proliferación de microorganismos indeseables (patógenos), que lejos de generar un producto de mala calidad, repercuten directamente en la salud del consumidor, de manera individual o colectiva (Kopper *et al.*, 2009).

Algunas investigaciones indican que existen más de 250 tipos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), siendo la mayoría ocasionadas por bacterias, entre las que se encuentran, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei* y *Staphylococcus aureus* (González *et al.*, 2005).

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, posee forma bacilar, con una temperatura apta de crecimiento de 37°C, puede desarrollarse en medios carentes o escasos de oxígeno y no esporula, coloniza el intestino del hombre y de los animales homeotermos y se le considera un microorganismo de flora normal, pero existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño, como las enterotoxigénicas (ETEC), que provocan diarrea aguda y en pocos casos fiebre y vómito, las enterohemorrágicas (EHEC) con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, las enteroinvasivas (EIEC), provocando diarrea acuosa, con sangre y moco, las enteropatógenas (EPEC), que afectan principalmente a niños menores de 6 meses, provocando diarrea aguda, fiebre baja y mala absorción, las enteroagregativas (EAEC), que se manifiestan en diarrea líquida de color verde con moco sin sangre y que en ocasiones puede llegar a ser severa; y las de adherencia difusa (DAEC), provocando síntomas como diarrea acuosa sin sangre (Rodríguez, 2002) (**Tabla 1.13**).

Por otro lado, *Listeria monocytogenes* es una bacteria que no forma esporas y es considerada un microorganismo anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio intervalo de temperaturas (1°C a 45°C). Esta bacteria se ha localizado de manera natural en al menos 37 especies de mamíferos, tanto domésticos como salvajes y en por lo menos 17 especies de aves y por su fácil proliferación puede ser aislada del suelo, forraje y otras fuentes ambientales (Carpentier *et al.*, 2011). La principal vía de contagio es por la ingestión de agua y alimentos contaminados, una vez que se está infectado por *Listeria monocytogenes*, se produce la enfermedad conocida como listeriosis (Noriega, 2008) (**Tabla 1.13**).

*Salmonella typhimurium*, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos no encapsulados que no producen esporas, capaces de crecer en un intervalo de temperatura de 35 a 37°C. Ésta bacteria se define como microorganismo ubicuo, que tienen como principal hábitat el intestino de los animales homeotermos y poiquilotermos, sin embargo también se han aislado de los más diversos hábitats, como aguas residuales, heces, suelos, entre otros (Cabello, 2008) (**Tabla 1.13**). Esta bacteria es la causa principal de infecciones humanas de salmonelosis siendo los huevos de gallina una de las principales fuentes del agente patógeno. La enfermedad que provoca se caracteriza por diarrea, fiebre, dolores o calambres abdominales, vómitos, cefalea y náuseas, afectando con mayor frecuencia a lactantes, ancianos y personas inmunodeprimidas (Ruíz *et al.*, 2008).

*Shigella sonnei* es un bacilo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra estrechamente relacionado con el género *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas. El intervalo óptimo para su crecimiento de 25 a 35°C. Se caracteriza por no formar esporas y por crecer de forma natural en los seres humanos y los monos (Marco *et al.*, 2008) (**Tabla 1.13**). La infección por *Shigella sonnei* normalmente es por ingerir alimentos y agua contaminados, provocando la enfermedad conocida como shigelosis, generando síntomas como diarrea, fiebre, náusea, vómitos y calambres estomacales (Martínez, 2011).

Finalmente *Staphylococcus aureus* es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas, que se encuentra microscópicamente aislado, en pares, tetrádas o formando racimos irregulares, no forma esporas, crece en temperaturas de 35 a 40°C y generalmente no es encapsulado (**Tabla 1.13**), suele estar en la piel y en las membranas mucosas sin llegar a causar infección, pero

cuando penetra en los tejidos (como puede ser en el caso de una herida), puede ocasionar una amplia gama de síntomas debido a las toxinas producidas (Pascual, 2010). La difusión de esta bacteria es de tipo alimentaria, provocando náuseas, vómito, arcadas (movimiento violento del estómago que se produce antes de vomitar), calambres abdominales, postración; en casos severos puede ocurrir dolor de cabeza, calambres musculares, cambios temporales en la presión arterial y el pulso; y de tipo intrahospitalario, produciendo lesiones cutáneas (granos, impétigo y piel escaldada), así como también osteomielitis, neumonía y endocarditis (Kumar *et al.*, 2010).

**Tabla 1.13** Características generales de los principales microorganismos patógenos de interés en la industria alimentaria

Microorganismos	Tinción de Gram	Movilidad	Vehículo de infección	Enfermedad que provoca
<i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>	-	Móvil	Vía fecal-oral.	Dependiendo del grupo, generalmente diarrea.
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>2</sup>	+	Móvil	Agua y alimentos contaminados	Listeriosis
<i>Salmonella typhimurium</i> <sup>3</sup>	-	Móvil	Huevo de gallina infectados	Salmonelosis (diarrea, fiebre, dolor estomacal)
<i>Shigella sonnei</i> <sup>4</sup>	-	Inmóvil	Alimentos y agua contaminada	Shigelosis (fiebre, diarrea y dolor estomacal)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Inmóvil	Alimentos contaminados (huevos, pollo, jamón, o lácteos)	Náuseas, vómito, dolor de cabeza y calambres musculares

1) Rodríguez, 2002, 2) Noriega, 2008, 3) Cabello, 2008, 4) Martínez, 2011.

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe una creciente demanda en la industria alimentaria de nuevos compuestos funcionales que provean al consumidor de opciones más naturales que igualen o superen las propiedades nutraceuticas de los compuestos bioactivos ya existentes. Ante esto, se han analizado diferentes tipos de plantas, siendo *Agave salmiana* una de las especies más prometedoras en este sentido, ya que además de representar una importante contribución económica al país en la producción de bebidas alcohólicas como mezcal y pulque, se han aislado de sus flores, raíz y hojas diversos compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides y taninos, que presentan importantes efectos antioxidantes y antimicrobianos, sin embargo la estructura del escapo no ha sido analizada desde este punto de vista, debido a que es poco conocida conocida y porque sus usos principales no representan beneficios económicos importantes, pero características como actividad desparasitante en rumiantes ejercida de manera tradicional y un efecto de pudrición sin aparente ataque bacteriano representan indicios de su posible potencial como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana que pueden ser aprovechados en el área de alimentos. Por ello, se considera relevante analizar las propiedades bioactivas de extractos obtenidos a partir del escapo floral, utilizando diferentes disolventes y métodos de extracción que permitan establecer las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos nutraceuticos.

## **HIPÓTESIS**

Los extractos obtenidos de la sección media del escapo de *Agave salmiana* de 250 cm, poseen propiedades antioxidantes o antimicrobianas, resultado de la presencia de los diferentes compuestos bioactivos obtenidos, dependiendo del proceso de extracción y la polaridad del disolvente utilizado.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Identificar los principales compuestos responsables de la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos obtenidos de la sección media del escapo floral de *Agave salmiana* de 250 cm y evaluar el efecto de los disolventes y método de extracción sobre su actividad antioxidante y antimicrobiana.

### **Objetivos específicos**

- Determinar el efecto del método de extracción (extracción individual, dual, dual-secuencial y secuencial) sobre el rendimiento de los extractos obtenidos a partir del escapo floral de *Agave salmiana*.
- Identificar el efecto del método de extracción y los disolventes utilizados, sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos obtenidos
- Identificar los grupos principales de compuestos bioactivos presentes en los extractos que mostraron la mayor actividad antimicrobiana, el más amplio espectro de acción o la mayor actividad antioxidante
- Cuantificar la concentración de los grupos de compuestos bioactivos identificados en los extractos seleccionados.
- Determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante de los compuestos bioactivos obtenidos de los extractos seleccionados.

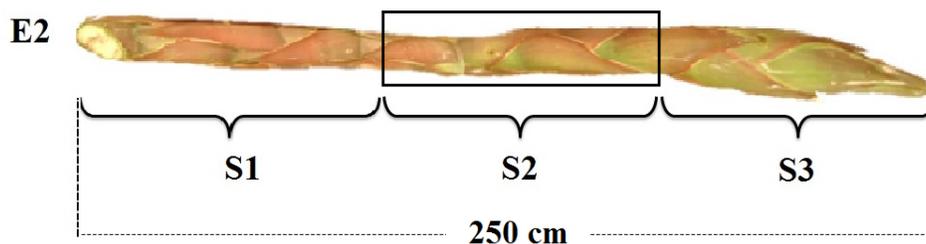
## CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Material vegetal

El escapo floral, se obtuvo de plantaciones ubicadas en el municipio de Singuilucan, Hidalgo, México (altitud 2640 m; 19°59'20" N, 98°27'52"O), considerando como parámetro de referencia su altura (250 cm), se lavó y seccionó en tres partes, etiquetadas como; Sección 1, la cual es la parte que se encuentra más cercana a la roseta, Sección 2, que representa la parte intermedia del escapo y Sección 3, que es la parte en la cual se desarrollarán las flores (**Figura 2.1**), se seleccionó la parte media como material de estudio.

La sección de estudio se cortó en cubos de aproximadamente 1 cm de lado, y se almacenó en lotes de 1 kg en bolsas de PVC, a 4°C, hasta su análisis (González-Cruz *et al.* 2011).

Para los análisis se realizaron tres repeticiones utilizando 3 escapos diferentes.



**Figura 2.1** Escapo floral de mediana madurez (250 cm) de *Agave salmiana* y sus secciones

### 2.2 Obtención de extractos y rendimiento

#### 2.2.1 Extracto crudo

El extracto crudo se obtuvo utilizando el jugo resultante de 100 g de material fresco macerado con ayuda de una licuadora manual (Oster, BPST02-B00-013, México), se filtró a través de un papel filtro (Whatman N°4), se concentró a sequedad en un rota vapor (DragonLab, RE100-Pro, China), el extracto obtenido se colocó en un vial ámbar al cual se le inyectó nitrógeno (20 mL\*min<sup>-1</sup> por 2 min.) y se almacenó a 4°C hasta su análisis (Srinivasan *et al.*, 1953, González-Cruz *et al.*, 2011), este extracto fue considerado el control y se etiquetó como EC (Extracto Crudo).

### **2.2.2 Extracción individual (etanol o agua)**

Esta extracción se realizó utilizando una proporción del material vegetal:disolvente 1:2 p/v (agua o etanol), se molió con una licuadora manual hasta lograr su completa homogenización, se mantuvo en agitación con un agitador mecánico a temperatura ambiente ( $\approx 27^{\circ}\text{C}$ ) por 24 h, se filtró al vacío a través de un papel filtro, se concentró a sequedad en un rota vapor, el extracto obtenido se colocó en un vial ámbar al cual se le inyectó nitrógeno ( $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  por 2 min.) y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (Centurión-Hidalgo *et al.*, 2013), la muestra fue etiquetada como EIA (Extracción Individual Acuosa) y EIE (Extracción Individual Etanólica).

### **2.2.3 Extracción dual (etanol-agua)**

100 g de material vegetal se maceraron con 200 mL de etanol (concentraciones 60%, 50% y 40% por separado) se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente ( $\approx 27^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 h, se filtró al vacío a través de papel filtro, se concentró a sequedad en un rota vapor, se colocó en un vial ámbar, se le inyectó nitrógeno ( $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  por 2 min) y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (Centurión-Hidalgo *et al.*, 2013; Martínez-Ramírez *et al.*, 2010; Alvis *et al.*, 2012; Chavely, 2009), los extractos se etiquetaron ED60/40 (Extracción Dual Etanol 60%: Agua 40%), ED50/50 (Extracción Dual Etanol 50%: Agua 50%) y ED40/60 (Extracción Dual Etanol 40%: Agua 60%).

### **2.2.4 Extracción dual-secuencial**

100 g de material vegetal fueron colocados con 200 mL de etanol absoluto (Fermont, México), se maceró y se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente ( $\approx 27^{\circ}\text{C}$ ), se filtró al vacío a través de papel filtro, se concentró a sequedad en un rota vapor, se colocó en un vial ámbar, se le inyectó nitrógeno ( $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  por 2 min) y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis, obteniendo el extracto EDSE (Extracción Dual Secuencial Etanólica). La fase sólida remanente de la primera extracción, se colocó con agua destilada en una proporción 1:2 (p/v), se mantuvo en agitación a temperatura ambiente ( $\approx 27^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 h, se filtró al vacío a través de papel filtro, se concentró a sequedad en un rota vapor, se colocó en un vial ámbar, se le inyectó nitrógeno ( $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  por 2 min) y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (Centurión-Hidalgo *et al.*, 2013 y Lamarque, 2012), obteniendo el extracto EDSA (Extracción Dual Secuencial Acuosa).

Se realizó la combinación de EDSE y EDSA para generar el extracto EDSEA (Extracción Dual Secuencial Etanol-Agua).

### **2.2.5 Extracción secuencial**

Se utilizaron como disolventes de extracción; hexano (Fermont, México, concentrado), acetona (Fermont, México, concentrado), metanol (Fermont, México, concentrado), etanol absoluto (Fermont, México) y agua destilada de manera secuencial.

100 g de material vegetal fueron colocados en 200 mL de hexano, se maceró y se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ), se filtró al vacío a través de papel filtro, se concentró a sequedad en un rota vapor, se colocó en un vial ámbar, se le inyectó nitrógeno ( $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  por 2 min) y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis, obteniendo el extracto ESH (Extracción Secuencial con Hexano). El remanente de esta extracción se utilizó para la obtención del extracto ESAC (Extracción Secuencial con Acetona) siguiendo la metodología anterior, el remanente generado de la extracción de ESAC fue utilizado para la obtención del extracto ESM (Extracción Secuencial con Metanol), el remanente obtenido ESM se utilizó para obtener el extracto ESE (Extracción Secuencial con Etanol), finalmente se obtuvo el extracto ESA (Extracción Secuencial con Agua) utilizando el remanente de ESE y agua como disolvente de extracción, en cada proceso se utilizó una proporción de 1:2 (p/v) del material con respecto al disolvente utilizado (modificado de Dai *et al.*, 2006). El extracto ESC (Extracción Secuencial Combinado) es la combinación de los 5 extractos obtenidos.

## **2.3 Determinación de la actividad antioxidante**

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos y de los compuestos bioactivos que se obtuvieron en cada caso.

### **2.3.1 DPPH**

Se utilizó la técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), descrita por Brad-Williams *et al* (1995), en la cuál se evalúa la actividad antioxidante de sustancias frente a una disolución alcohólica de DPPH de color violeta intenso, cuya intensidad disminuye de acuerdo con la cantidad de sustancias que contenga la muestra con capacidad de neutralizar a este radical libre. Se preparó una disolución metanólica de DPPH 0.1 mM y se construyó una curva patrón a partir de la medición de la absorbancia del radical DPPH a diferentes concentraciones (0.1, 0.08, 0.06,

0.04, 0.02 y 0 mM) a una longitud de onda de 514 nm. Una alícuota de 0.05 mL del extracto (en diferentes concentraciones utilizadas) se agregó a 2 mL de disolución metanólica de DPPH 0.1 mM. La reacción se midió a 514 nm cada 10 minutos hasta completar 1 hora en oscuridad. A partir de la ecuación de la curva se determinó la concentración a la cual se redujo el DPPH. El porcentaje de DPPH inhibido (% DPPH) se calculó con la ecuación:

$$\% DPPH = \left( \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100$$

Donde  $A_{control}$  es la absorbancia del DPPH control y  $A_{muestra}$  es la absorbancia de la muestra. Los valores de  $CE_{50}$  (concentración efectiva, cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH) se calcularon a partir de gráficos del porcentaje de inhibición y las concentraciones de los tratamientos. Los resultados se expresaron en g de extracto seco/g DPPH.

### 2.3.2 FRAP

Se utilizó la técnica descrita por Benzie y Strain (1996), la cual se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico ( $Fe^{3+}$ ) al ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) formando un complejo azul. A 100  $\mu$ g de la muestra, se adicionaron 300  $\mu$ L de agua destilada y 3000  $\mu$ L del reactivo FRAP (2.5 mL de la solución 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina; Sigma-Aldrich, USA; 10 mM en HCl 40 mM; 2.5 mL  $FeCl_3 \times H_2O$ ; Golden Bell, México; 20 mM y 25 mL de buffer de acetatos (Fermont, México) 300 mM a un pH 3.6). La absorbancia se midió a 593 nm después de 30 minutos de incubación a 37°C. Se utilizó una curva de calibración de Trolox en un intervalo de 20 a 400  $\mu$ M, las actividades de los extractos se expresaron en  $\mu$ g TE/g de extracto.

### 2.3.3 ABTS<sup>+</sup>

La actividad antioxidante de los extractos se determinó por el método de ABTS (Re *et al.*, 1999), con algunas modificaciones de Choi *et al* (2014), el cual se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>) con el antioxidante presente en la muestra. El radical catión ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) se preparó a partir de la disolución estándar de ABTS (7 mM) en buffer de acetato de sodio (Fermont, México) 20 mM (pH 4.5) y persulfato de potasio (Sigma-Aldrich, USA) 2.45 mM, incubados a temperatura ambiente, en oscuridad por 16 h, la muestra se diluyó en etanol

absoluto hasta obtener la absorbancia de 0.70 ( $\pm$  0.02) a 734 nm. 0.03 mL del extracto analizado previamente reconstituido con agua destilada (1:10<sup>5</sup> p/v), se hace reaccionar con 3 mL de radical ABTS<sup>\*+</sup> diluido, se incubó durante 30 min y se midió la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu$ g TE/g extracto seco a partir de la curva de calibración de Trolox (0 a 400  $\mu$ M).

## **2.4 Identificación y extracción de grupos de compuestos bioactivos**

### **2.4.1 Determinación de contenido de fenoles totales**

Se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu de Singleton *et al.*, 1999 con algunas modificaciones de Rojas-Barquera *et al.*, 2009. Se colocaron 20  $\mu$ L del extracto previamente reconstituido con agua destilada (1:500 p/v), 1580  $\mu$ L de agua destilada y 100  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (HYCEL, México), se dejó reposar 5 min, se agregaron 300  $\mu$ L de disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) (Fermont, México), se agitó hasta su completa homogeneización, se dejó reaccionar 30 min a 40°C y se leyó la absorbancia a 765 nm. Paralelamente, se realizó la curva de calibración de ácido gálico (Fermont, México) (0 y 5 mg\*L<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron como mg de GAE/g de extracto de extracto.

### **2.4.2 Fenoles simples**

**Identificación:** Para la determinación de fenoles totales se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu adaptada para alimentos por Singleton *et al* en 1999, descrita en el punto 2.5 del documento.

**Extracción:** se adicionaron 2 mL de una disolución de metanol:agua (50:50, v/v) a 1 g de muestra, se agitó, se mantuvo a 50 °C durante 30 min, se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min., sobrenadante se colecto, el residuo se sometió a dos extracciones sucesivas con 2 mL de acetona:agua (80:20, v/v) cada vez, se agitó, se mantuvo a 50 °C durante 30 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min. Los tres sobrenadantes se colectaron en un mismo frasco, se eliminó el disolvente a sequedad con rota vapor (DragonLab, RE100-Pro, China), se almacenó a 4 °C hasta su cuantificación (Cuellar *et al*, 2013; Chavely *et al.*, 2009; Medini *et al.*, 2014).

**Cuantificación:** Se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu de Singleton *et al.*, 1999 con algunas modificaciones de Rojas-Barquera *et al.*, 2009. Se colocaron 20  $\mu$ L del extracto previamente reconstituido con agua destilada (1:500 p/v), 1580  $\mu$ L de agua destilada y 100  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (HYCEL, México), se dejó reposar 5 min, se agregaron 300  $\mu$ L de

disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20%) (Fermont, México), se agitó hasta su completa homogeneización, se dejó reaccionar 30 min a  $40^\circ\text{C}$  y se leyó la absorbancia a 765 nm. Paralelamente, se realizó la curva de calibración de ácido gálico (Fermont, México) (0 y  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los resultados se expresaron como mg de GAE/g de extracto de extracto.

### 2.4.3 Flavonoides

**Identificación:** Se realizó de forma cualitativa con base en la prueba de Shinoda. 1 mg de la muestra se diluyó en una disolución etanólica en agua (1:7), se trató térmicamente a  $60^\circ\text{C}$ , se filtró y luego se colocó en un tubo de ensayo con 0.5 g de magnesio en polvo. Se adicionó HCl concentrado, gota a gota, hasta el desprendimiento de hidrógeno. La presencia de flavonoides es positiva al observar la aparición de una coloración rojiza, violeta o naranja (Ruíz *et al.*, 2013).

**Extracción:** Se adicionó 20 mL de disolvente hidroalcohólico (etanol al 70%) a 1 g de muestra seca, se mantuvo en agitación constante a  $50^\circ\text{C}$  por 60 min, se filtró, se eliminó el disolvente y se almacenó en un vial ámbar a  $4^\circ\text{C}$  (Al-Rimawi *et al.*, 2017; Victório *et al.*, 2010)

**Cuantificación:** Se utilizó el método descrito por Soto (2015). Se reflujo por 2 h 0.5 g de muestra con 20 mL de ácido sulfúrico al 10 % y 20 mL de etanol al 50 %, se enfrió y se filtró al vacío. Se realizó un lavado al residuo con 30 mL de etanol al 50 %, y el líquido se adicionó al filtrado inicial. El filtrado total se evaporó en baño de agua hasta la mitad del volumen inicial, se enfrió sobre baño de hielo durante 30 min, se filtró y se lavó el precipitado formado con cuatro porciones de 10 mL de agua destilada fría ( $10\text{-}15^\circ\text{C}$ ). Se eliminaron los filtrados y se colectó el precipitado generado, estos residuos se disolvieron con 70 mL de etanol al 96 % a  $50^\circ\text{C}$ , la disolución se completó a un volumen de 100 mL con etanol al 96 %, se lee la absorbancia a 258 nm. Los resultados se expresaron en mg de quercetina (QE)/g extracto seco a partir de la curva de calibración de quercetina diluida en etanol al 50 % (0 a 400 mM). El blanco consistió en una solución de etanol al 50 %.

### 2.4.4 Taninos

**Identificación:** Se realizó con base en la prueba de dicromato de potasio, para la cual se utilizaron 2 mL de extracto previamente reconstituidos en agua destilada a una concentración de  $0.002 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a los cuales se les agregó 1 mL de una disolución de dicromato de potasio 0.025 M, se consideró positiva la presencia de precipitado café-rojizo (Kasay *et al.*, 2013).

**Extracción:** Se desengrasa 1 g de muestra con éter de petróleo, a la muestra desengrasada se le adicionaron 10 mL de acetona (70%) manteniendo en agitación constante durante 60 min a 60°C, se filtró, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min., se colectó el sobrenadante y se eliminó el disolvente por evaporación. El extracto se almacenó a 4 °C en oscuridad para su cuantificación (Raisa *et al.*, 2015; Karamac *et al.*, 2007).

**Cuantificación:** Se agita 1 g de muestra con 50 mL de etanol al 50 % durante 6 h, se deja en reposo 8 h, se agita nuevamente por 30 min y se filtra. Se transfieren 0.3 mL del filtrado a un matraz aforado de 5 mL y se diluye con agua. Se prepara la disolución de referencia de ácido tánico (se disuelven 2.5 mg de ácido tánico en 10 mL de agua destilada, se toman 2 mL y se completa el volumen hasta 10 mL) y el reactivo para taninos (1 g de tungstato de sodio dihidratado, 0.02 g de ácido fosfomolibdico y 0.5 mL de ácido fosfórico al 85 % en 7.5 mL de agua destilada. Se refluja 2 h y se completa a 10 mL con agua destilada). A partir de las disoluciones se preparan las muestras considerando la **tabla 1.14**:

**Tabla 1.14** Preparación de reactivos para la cuantificación de taninos

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Sm	-	-	0.1 mL
Disolución de referencia de ácido tánico	-	0.3 mL	-
Agua destilada	0.5 mL	0.2 mL	0.4 mL
Reactivo para taninos	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
<b>Se agita y se deja en reposo 5 min</b>			
Disolución de carbonato de sodio 20%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL

Se mezcla bien y se lee cada uno a 700 nm. Los resultados se expresan en mg de taninos (expresados como ácido tánico)/g extracto seco a partir de la curva de calibración de ácido tánico a concentraciones de 0.025 – 0.15 mg\*mL<sup>-1</sup> (Ruiz *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2000).

#### 2.4.5 Alcaloides

**Identificación:** Se realizó la identificación de alcaloides utilizando la prueba del reactivo de Mayer (1.36 g of HgCl<sub>2</sub> y 5 g de KI en 100 mL de agua destilada, ambas marca Meyer). Se reconstituyeron los extractos utilizando agua destilada para obtener muestras a una concentración de 0.5 g\*mL<sup>-1</sup>, a 1 mL de cada muestra preparada se le agregaron 5 mL del reactivo de Mayer, considerando como prueba positiva la generación de un precipitado de color blanco crema (Coy *et al.*, 2014).

**Extracción:** Los extractos de alcaloides totales se obtuvieron según el método de Harborne con ligeras modificaciones. Se adicionó 2 mL de una disolución de ácido acético al 10% (2 mL) en etanol a 1 g de muestra, se agitó durante 24 h, se filtró y el sobrenadante se concentró a sequedad. El pH se ajustó a 9 con disolución concentrada de hidróxido de amonio, se realizó una extracción con cloroformo (0.5 mL) tres veces, se colectó la fracción orgánica en cada extracción, se eliminó el disolvente y se almacenó en viales ámbar a 4°C en oscuridad para su cuantificación (Shoaib *et al.*, 2016; Harbone, 1984; Azmir *et al.*, 2013).

**Cuantificación:** Se utilizó el método basado en la reacción con verde de bromocresol (BCG) (Jaramillo *et al.*, 2016), a partir de una disolución de atropina (1 mg\*mL<sup>-1</sup>), diluida 1:10, se prepararon seis disoluciones (0.01-0.1 mg\*mL<sup>-1</sup>) para la elaboración de la curva de calibración. 5 mL de cada extracto diluido 1:5, se transfirieron a un embudo de separación, al cual se le agregaron 5 mL de disolución de BCG y 5 mL una disolución buffer de fosfato a pH 4.7. La mezcla se agitó, y el complejo formado fue extraído con cloroformo. Los extractos se recogieron en un matraz aforado de 10 mL y se completó a ese volumen con cloroformo. Todo este proceso fue realizado por triplicado para cada extracto de hojas de planta. Las absorbancias del complejo en cloroformo fueron medidas a una longitud de onda de 470 nm.

#### 2.4.6 Saponinas

**Identificación:** Se identificó cualitativamente la presencia de saponinas en los extractos por medio de la prueba de Rosenthaler, que consistió en añadir una gota de reactivo Rosenthaler (se diluye 1 g de vainillina en 100 mL de etanol), una gota de ácido sulfúrico concentrado a 10 mg de extracto reconstituido previamente con agua destilada (1:10 p/v). La presencia de saponinas generó un color violeta en la solución (Kujur *et al.*, 2010).

**Extracción:** 5 mL de etanol (20%) en un 1 g de muestra, se agitó y se colocó la mezcla en baño maría (55°C) por 4 horas. El extracto se filtró y el residuo se volvió a extraer con 10 mL de etanol (20%). Se colectaron ambos extractos en un mismo recipiente y se concentró en baño maría hasta reducir el volumen a 2 mL, se adicionó 1 mL de éter dietílico, se agitó vigorosamente y se colectó la fracción acuosa. A esta fracción se añadieron 60 mL de n-butanol, se agitó vigorosamente y se adicionó 0.5 mL de disolución de NaCl al 5%. La disolución resultante se concentró y almacenó en viales ámbar a 4°C para su cuantificación (Mukarram *et al.*, 2014)

**Cuantificación:** Se realizó con la metodología establecida por Monje y Raffaillac (Lozano *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2013) en el cual se utiliza el reactivo de Lieberman-Burchard (LB) para formar productos coloridos al reaccionar con saponinas. Se preparó el reactivo LB (16.7% de anhídrido acético en ácido sulfúrico concentrado), se agregó 1 mL a 0.6 mL de muestra diluida (1:5), se agitó, se dejó en reposo por 37 min y se leyó la absorbancia a 528 nm. Los resultados se expresaron en mg saponinas (basado en saponina estándar)/g extracto seco a partir de la curva de calibración de saponina quillaja a concentraciones de 0.4 a 10 mg\*ml<sup>-1</sup>.

#### **2.4.7 Determinación de proteína**

Se realizó un análisis electroforético SDS-PAGE de los extractos con base en la metodología descrita por Laemmli, 1970. La muestra (1µg de proteína\*mL<sup>-1</sup>) se solubilizó en disolución reguladora (0.1M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS), se agitó y se colocó en baño maría a 96°C durante 5 minutos. Se aplicaron 10 µL de muestra en cada pozo del gel de poliacrilamida. La electroforesis se realizó con equipo Mini Protean® Tetra cell de BioRad a 120 V durante 1 h. La tinción se realizó con Coomassie Brilliant Blue R 250.

Los resultados se reportaron de acuerdo a la intensidad de las bandas como, presencia ausencia del compuesto (+ y -, respectivamente).

#### **2.4.8 Precipitación de proteína**

200 µL de muestra se adicionan a 200µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % en frío (4°C ± 1), después se dejó reposar en baño maría por 1 h a 4°C, se centrifugó por 20 minutos a 4°C a 10 000 rpm y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se realizan dos lavados al material orgánico residual con 250µL de etanol al 75% frío (-20°C ± 1), se centrifuga por 15 minutos a 4°C a 10 000 rpm, eliminando cada vez el sobrenadante. Se realiza un tercer lavado con 250µL de etanol al 95% en frío (-20°C± 1), se centrifugó por 15 minutos a 10 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el material residual con agua destilada hasta eliminar los residuos del etanol (Kim *et al.*, 1990).

## 2.5 Actividad antimicrobiana

### 2.5.1 Cepas bacterianas

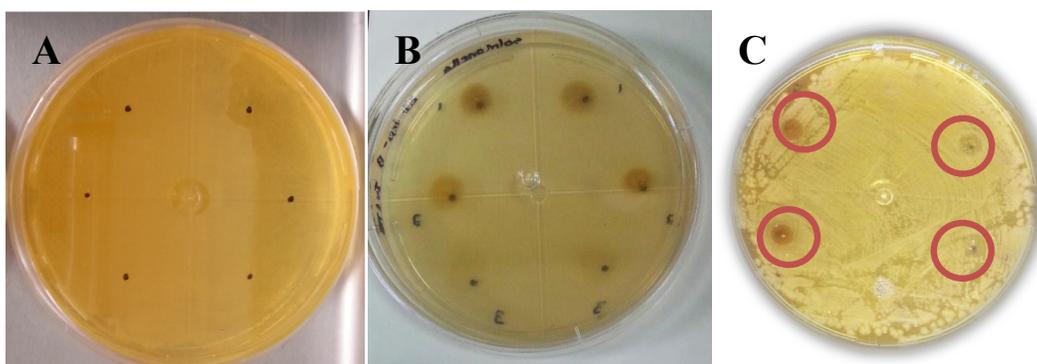
Se utilizaron bacterias Gram positivo; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) y bacterias Gram negativo; *Escherichia coli* O157:H7 (E09 de la Universidad Autónoma de Querétaro); *Shigella sonnei* (ATCC 25931); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Cepas con resistencia a la rifampicina (R+), (Sigma-Aldrich, USA). Las cepas R+ se mantuvieron en tubos de agar inclinados con agar soya de tripticaseína (Bioxon, México) a 3-7 °C (Cruz *et al.*, 2013).

### 2.5.2 Preparación del inóculo

Se cultivó cada cepa en tubos con 3 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB, Bixon, *Becton Dickinson*, México), incubando a 35°C por 18 h en una incubadora (Arsa AR-130AD, México), se realizaron diluciones consecutivas 1:10, en peptona de caseína (Bioxon, México), aproximando una concentración celular de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL.

### 2.5.3 Técnica de difusión en placa

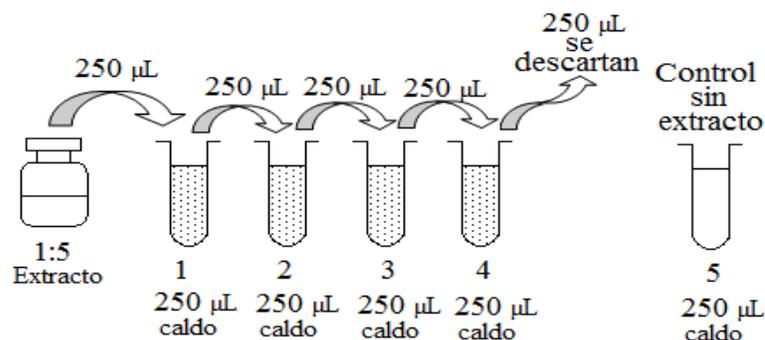
100  $\mu$ L del inóculo en placas con agar de métodos estándar (Bioxon, México), conteniendo 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de rifampicina, se distribuyó sobre el agar utilizando la técnica de extensión en placa. Se reconstituyeron los extractos en agua destilada en una relación 1:5 p/v, se colocaron 5  $\mu$ L de este extracto sobre el agar (**Figura 2.2**), se incubaron a 35°C por 18h Pasado este tiempo, se evaluó la generación de halos de inhibición (Modificado de Cruz *et al.*, 2013). Se realizaron triplicados por cada extracto.



**Figura 2.2** Secuencia para determinar la inhibición microbiana de los extractos, A) distribución de los sitios de aplicación de los extractos, B) superficie de acción de los extractos colocados en el agar, C) halos de inhibición producidas por extractos contra *E. coli* (círculos rojos).

## 2.5.4 Concentración mínima inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada extracto se determinó mediante el método de diluciones seriadas en medio líquido (Taroco *et al.*, 2006) utilizando peptona de caseína. Los extractos se reconstituyeron con agua destilada en relaciones 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:120, 1:160 y 1:320 tal como se muestra en la **figura 2.3**. Los inóculos bacterianos se prepararon en tubos con caldo de soja de tripticaseína, se incubaron a 35°C por 18 h y se realizaron diluciones con peptona de caseína hasta llegar a la concentración de 1:200 (correspondiente a  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL). El control negativo fue un tubo con caldo de soja tripticaseína y el control positivo el inóculo correspondiente a cada bacteria utilizada. 250  $\mu$ L de inóculo bacteriano fueron adicionados a cada tubo con extracto, se incubó a 35°C por 18 h. Los resultados se reportaron como valores “+” o “-” de acuerdo a la presencia o ausencia de turbidez respectivamente.



**Figura 2.3** Procedimiento de diluciones de muestras en la técnica de CMI

## 2.6 Desarrollo experimental

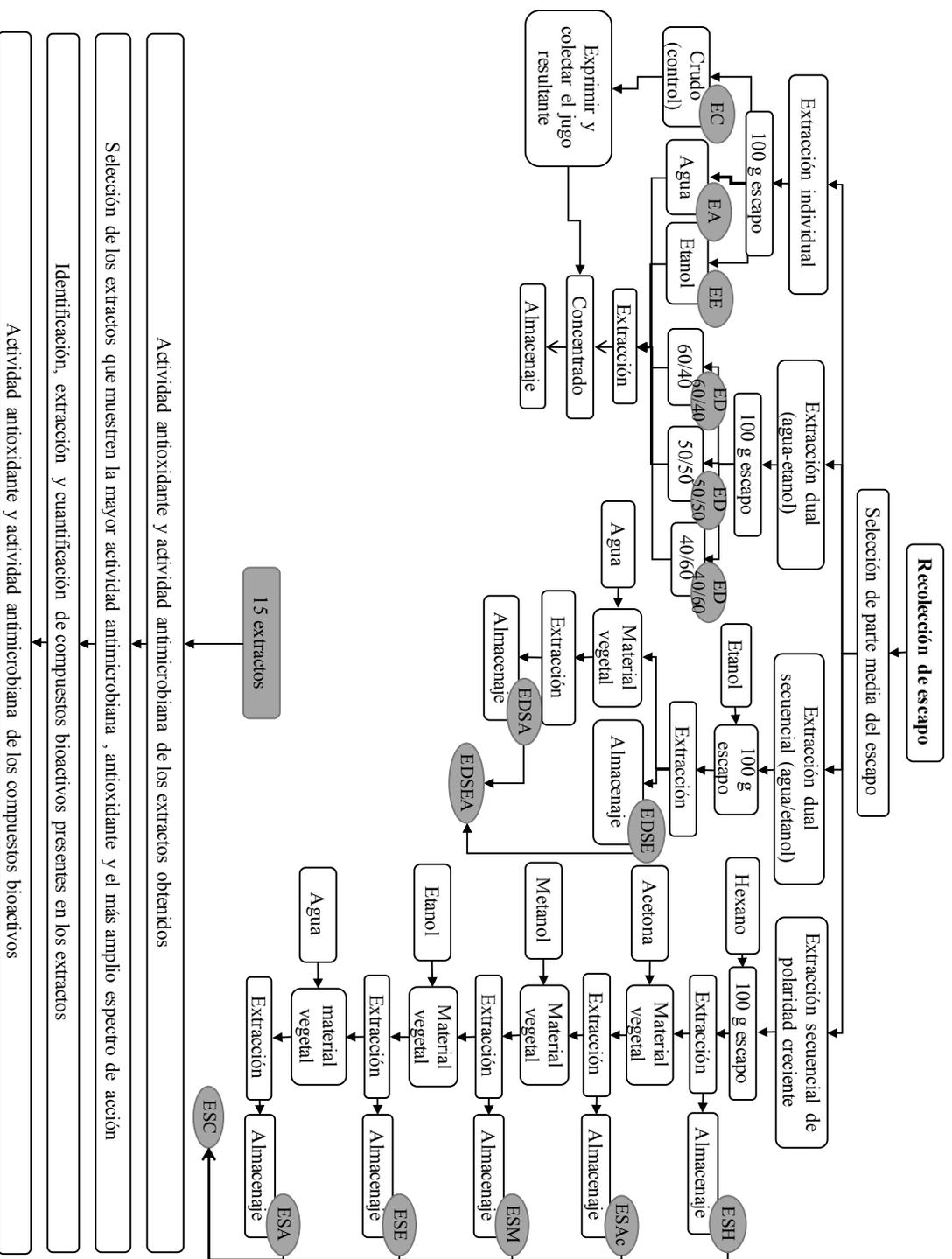
El presente proyecto se realizó en 5 etapas, las cuales se muestran en la **figura 2.4**.

La primera etapa contempló el acondicionamiento de la materia prima, el cual consistió en la recolección del escapeo con una altura aproximada de 250 cm, utilizando solo la parte media de dicha estructura, la cual fue cortada en cubos de aproximadamente 1 cm de lado, los cuales se almacenarán en refrigeración (4°C) en lotes de 1 kg hasta su análisis.

En la segunda etapa se realizaron los cuatro diferentes métodos de extracción. En los primeros tres métodos se consideraron como disolventes; el agua y etanol, utilizando en el cuarto método de extracción 5 disolventes de diferente polaridad (hexano, acetona, metanol, etanol y agua).

En la cuarta etapa los extractos obtenidos se evaluaron para determinar su actividad antimicrobiana, actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos. Con base en estos resultados se seleccionaron los extractos que mostraron mayor actividad antimicrobiana y el más elevado espectro de acción inhibitorio ante microorganismos de interés en la industria alimentaria.

Finalmente en la quinta etapa en los extractos seleccionados se analizaron el contenido de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas y proteínas), se evaluó a cada uno su actividad antimicrobiana y actividad antioxidante.



**Figura 2.4** Esquema general del proceso del proyecto.

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS

### 3.1 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre el rendimiento de extracción

El rendimiento de los extractos obtenidos (**Tabla 1.15**) muestran que existe influencia tanto por el método de extracción como por la polaridad del disolvente utilizado. Se observa que existe una tendencia que indica que a mayor número de disolventes utilizados para la extracción con diferentes polaridades, los rendimientos disminuyen, por esta razón el orden de rendimientos decrece de la siguiente manera, extracción individual acuosa  $\geq$  extracción dual secuencial  $>$  secuencial, este patrón aparentemente es derivado de la presencia del agua en las primeras etapas, lo que indica que el orden de los disolventes utilizados en la extracción afecta el rendimiento, siendo el agua el mejor disolvente para la extracción de los compuestos presentes en el escapo floral de *Agave salmiana*, dicho efecto, puede ser corroborado con lo reportado en extractos de hojas de *Lippia sidoides* Cham., del pericarpio del maíz morado (*Zea mays* L.) y en semillas de la uva (*Vitis*) donde se encontró que el rendimiento disminuye hasta un 50% con extracciones secuenciales, en comparación con las extracciones con los disolventes absolutos respectivos (Garmus *et al.*, 2015, Monroy *et al.*, 2016 y García-Marino *et al.*, 2006).

Por otra parte, los resultados indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el rendimiento generado en la extracción individual con agua (EIA) y la extracción dual secuencial (EDSEA), lo cual podría ser debido al uso del agua como segundo disolvente para la extracción, sin embargo, se observó que el rendimiento de los extractos disminuyó hasta un 38% cuando se realizó la combinación agua/etanol independientemente de la proporción de cada uno, lo que indica que la presencia del etanol disminuye la polaridad del agua, reduciendo la capacidad de extracción del medio, por otra parte, se podría estar provocando la formación de una red en la estructura del escapo, que evita la extracción de los compuestos, este mismo efecto se observó en extractos de hojas de *Phyllanthus niruri*, de *Lippia sidoides* Cham. y cortezas de *Azadirachta indica*. donde el rendimiento disminuye hasta 20% en las extracciones duales (50/50 y 30/70, agua/etanol, v/v) en comparación con las extracciones con los disolventes absolutos respectivos (Markom *et al.*, 2007 y Sultana *et al.*, 2009)

Mientras que, un efecto contrario fue observado en extractos de las cortezas de *Acacia nilotica*, *Eugenia jambolana*, *Terminalia arjuna*, en hojas y raíces de *Moringa oleifera*, en el fruto de *Ficus religiosa*, en hojas de *Aloe barbadensis* y la pulpa de café (*Coffea*) (Sultana *et al.*, 2009, Flores-Agüero *et al.*, 2016), donde los rendimientos obtenidos son más elevados utilizando combinaciones agua/etanol en proporciones 80/20 y 60/40, v/v respectivamente, en comparación al uso de agua o etanol absoluto, esta discrepancia puede ser atribuida a diferentes factores, entre ellos, la naturaleza del material vegetal, el tipo de extracción, la naturaleza de los compuestos que conforman el material analizado, sin embargo se podría considerar que uno de los factores principales es la proporción de agua utilizada, ya que en éstos últimos extractos, se trabajó con altas proporciones de agua con respecto al etanol, lo que indica que éste disolvente es el responsable del rendimiento obtenido en la extracción (Azmir *et al.*, 2013 y Pandey *et al.*, 2014).

Los resultados indican que el escapo floral de *Agave salmiana* cuenta con mayor proporción de compuestos polares fácilmente extraídos con agua, dicho comportamiento también fue observado en *Cassia fistula*, *Heliotropium indicum*, *Rhinacanthus nasutus*, *Mimosa púdica*, *Vernonia zeylanica*, *Pongamia pinnata* y en la nuez (*Juglans regia* L.) donde el mayor rendimiento es obtenido al utilizar agua como agente extractor (Jeyaseelan *et al.*, 2012, Fernández-Agulló *et al.*, 2013).

La extracción secuencial (ESC), por su parte, fue el método con el cual se obtuvo el menor rendimiento de 24% y 21% con respecto a las extracciones individuales con agua y dual secuencial, respectivamente. Con base en los resultados obtenidos, para la extracción secuencial de compuestos a partir del escapo floral del *Agave salmiana*, es necesario utilizar los disolventes de mayor polaridad al inicio, ya que aparentemente los disolventes de baja polaridad provocan la generación de una red de compuestos no polares que evitan la penetración de los disolventes polares, los cuales fueron utilizados en la última etapa del proceso de extracción (Hirner, 1992, Smolskaitė *et al.*, 2015 y Adebayo *et al.*, 2017).

**Tabla 1.15** Capacidad de extracción de los disolventes sobre compuestos de los escapos florales de *Agave salmiana*

Extracto	Rendimiento (%)	Incremento en el rendimiento de extracción*
EC	1.151 <sup>d</sup> ± 0.03	1.00
EIA	3.773 <sup>a</sup> ± 0.40	3.28
EIE	2.204 <sup>c</sup> ± 0.18	1.92
ED60/40	2.707 <sup>b,c</sup> ± 0.13	2.35
ED50/50	2.343 <sup>b,c</sup> ± 0.14	2.04
ED40/60	2.499 <sup>b,c</sup> ± 0.10	2.17
EDSEA	3.638 <sup>a</sup> ± 0.24	3.16
ESC	2.874 <sup>b</sup> ± 0.05	2.50

Valores en g/100g de muestra fresca. \* Con base en el extracto crudo. Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis. Valores con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$ .

EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

En comparación con extractos reportados en las hojas de menta verde (*Mentha spicata* L), el extracto crudo del escapo floral de *Agave salmiana*, presenta un rendimiento hasta 90% menor, debido posiblemente a que el escapo presenta una estructura fibrosa que impide mayor penetración de los disolventes y por ende se genera menor rendimiento en la extracción, a diferencia del tejido suave de las hojas de menta, que pueden llegar a tener hasta 10% de agua (Pérez *et al.*, 2017), lo cual aumenta la extractabilidad en este tipo de extracción (Bimakr *et al.*, 2011).

En las extracciones acuosas el rendimiento en el escapo de *Agave salmiana*, es 78% mayor en comparación al rendimiento obtenido en la planta *Quercus resinosa* (Rocha-Guzman *et al.*, 2007) y similar en las extracciones etanólicas en comparación a lo reportado en los extractos de la corteza de *Eugenia jambolana* (Sultana *et al.*, 2009) con una diferencia de 0.6% a lo obtenido en el escapo de *Agave salmiana*, sin embargo en las extracciones secuenciales los rendimientos obtenidos se encuentran por debajo a lo reportado en extractos de las hojas de *Combretum vendae* y de manrubio blanco (*Ageratum conyzoides* L.) (un tipo de maleza originaria de Argentina, Brasil, Paraguay) (Okunade, 2002) donde sus rendimientos son 70% (Komape *et al.*, 2014) y 14%, respectivamente, superiores a los extractos del escapo de *Agave salmiana* obtenidos en el presente trabajo (Mesa *et al.*, 2015).

### 3.2 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antioxidante en los extractos

Se ha demostrado, que la actividad antioxidante del material vegetal, varía dependiendo la técnica utilizada para su determinación (Hwang *et al.*, 2014, Zengin *et al.*, 2015 y Floegel *et al.*, 2011), y en el escapo floral de *Agave salmiana* no es la excepción (**Tabla 1.16**), sin embargo, los resultados obtenidos, mostraron una tendencia semejante, independientemente de la técnica utilizada, donde la extracción secuencial fue la que generó extractos con mayor actividad antioxidante, seguido por la extracción dual 50/50.

Es importante mencionar que las técnicas FRAP y ABTS expresan los valores en equivalentes Trolox (TE), basándose en diferentes reacciones de los antioxidantes, siendo un proceso de óxido-reducción del ion férrico ( $Fe^{3+}$ ) al ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) en el primer caso y de transferencia de electrones del compuesto antioxidante con el complejo  $ABTS^+$ , en el segundo caso (Mercado-Mercado *et al.*, 2013), mientras que la técnica DPPH, al reflejar parámetros cinéticos, indica los gramos de muestra necesarios para inhibir al radical DPPH, por lo que, cuanto menos cantidad de muestra se requiera más actividad antioxidante tendrá la muestra, es decir menor será su valor de  $IC_{50}$  (Bondet *et al.*, 1997, Xie *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se observó que aún cuando la extracción secuencial fue la que generó el menor rendimiento de los extractos, fue la que presentó la mayor actividad antioxidante, lo que podría indicar que la combinación de los disolventes permiten la extracción de compuestos que podrían estar interactuando de manera sinérgica y generar mayor capacidad para captar radicales libres, lo cual se corrobora al determinar la presencia de 5 metabolitos bioactivos en el extracto (fenoles simples, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides), cuyo contenido indica que los fenoles simples son los compuestos que presentan la mayor contribución con hasta 98% en el extracto secuencial respecto con los demás metabolitos analizados (flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides, 0.42%, 0.41% 0.44 y 0.36% respectivamente), demostrando que posiblemente estos metabolitos son los responsables de la actividad antioxidante del extracto (tomando como un 100% la sumatoria del contenido de cada uno de los metabolitos en el extracto) (**Tabla 1.17**), este comportamiento también fue observado en los extractos secuenciales de las raíces de *Curcuma caesia*, hongo comestible *Pleurotus eous* y orujo de uva (*Vitis vinifera*), donde se reportan bajos rendimientos (0.18 a

4 %) y elevada actividad antioxidante con hasta el 92%, 83% y 96% respectivamente, utilizando la técnica de DPPH, (Reenu *et al.*, 2015, Sudha *et al.*, 2012, de Campos *et al.*, 2008).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el escapo floral de *Agave salmiana* difieren de los resultados reportados para extractos de *Agave attenuata*, *Agave sisalana* y en otras plantas como *Inonotus hispidus*, *Hydnellum ferrugineum*, *Tricholoma columbata* y *Agaricus bisporus*, donde los rendimientos más bajos (0.30 % a 2.15 %) también generaron la menor actividad antioxidante (hasta 97% menos actividad antioxidante, en comparación a los extractos que obtuvieron mayor rendimiento) (Santos-Zea *et al.*, 2012, Smolskaitė *et al.*, 2015). Lo anterior corrobora que, la naturaleza del material vegetal representa el parámetro más importante para la obtención de compuestos con actividad biológica (Tansaringkarn *et al.*, 2008).

Por otro lado, se observa que el uso de agua o etanol como únicos disolventes para la extracción favorece la obtención de compuestos responsables de la actividad antioxidante, principalmente fenoles, saponinas, flavonoides, antocianinas y taninos, los cuales son solubles en medios polares (Shukla *et al.*, 2008), sin embargo, al combinar el agua con el etanol considerando una mayor proporción de uno de los dos disolventes se genera un decremento de hasta el 68% de la actividad antioxidante, lo cual podría ser debido a que las combinaciones provocan cambios en la polaridad del medio (7.84 y 6.66 en ED60/40 y ED40/60, respectivamente) lo cual al parecer disminuyó la extracción de compuestos antioxidantes, dicho efecto se corrobora al analizar el contenido y contribución de los compuestos bioactivos presentes en el extracto, donde el extracto ED60/40 (agua/etanol) presentó una disminución en el contenido de alcaloides y saponinas con hasta 88%, con respecto al extracto secuencial, el cual presentó la mayor actividad antioxidante, indicando que dichos metabolitos ejercen un efecto sinérgico con los demás compuestos presentes en el escapo de *Agave salmiana* aumentando la actividad antioxidante del extracto, propiedad que puede verse afectada al modificarse la contribución de alguno de estos compuestos (**Tabla 1.17**); un efecto similar se observó en el extracto ED40/60 (agua/etanol) donde los alcaloides presentaron un aumento en su contenido de hasta 54% respecto al extracto secuencial, que provocó una disminución en la actividad antioxidante del extracto ya que

estos metabolitos a diferencia de los fenoles presentan menos grupos OH y ejercen menos actividad antioxidante (Tsoi *et al.*, 2015). Un comportamiento semejante se ha reportado en la obtención de diferentes extractos a partir de fuentes vegetales, tales como los extractos del té negro (*Camellia sinensis*), propóleo (Turkmen *et al.*, 2006 y Zhang *et al.*, 2015), lo cual indica la importancia de establecer tanto el método como el disolvente más adecuado para la obtención de compuestos con actividades biológicas (Santos *et al.*, 2016).

**Tabla 1.16** Determinación de la actividad antioxidante y fenoles totales de extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

Extracto	CE <sub>50</sub> (g extracto seco/g DPPH)	FRAP (μmol TE/g de extracto)	ABTS (μmol TE/g extracto seco)
EC	111.26 <sup>b</sup> ± 1.18	185.58 <sup>g</sup> ± 1.06	95.53 <sup>g</sup> ± 1.07
EIA	85.81 <sup>c</sup> ± 1.15	242.77 <sup>d</sup> ± 1.05	154.48 <sup>d</sup> ± 0.93
EIE	89.61 <sup>d</sup> ± 0.60	230.76 <sup>c</sup> ± 1.94	141.80 <sup>c</sup> ± 0.99
ED60/40	96.02 <sup>c</sup> ± 1.39	211.43 <sup>f</sup> ± 1.94	123.37 <sup>f</sup> ± 0.76
ED50/50	40.50 <sup>g</sup> ± 1.43	385.53 <sup>b</sup> ± 1.09	295.92 <sup>b</sup> ± 0.83
ED40/60	125.56 <sup>a</sup> ± 0.96	178.05 <sup>h</sup> ± 0.72	88.55 <sup>h</sup> ± 0.93
EDSEA	47.31 <sup>f</sup> ± 1.13	377.77 <sup>c</sup> ± 1.46	290.34 <sup>c</sup> ± 1.28
ESC	10.42 <sup>h</sup> ± 0.53	408.67 <sup>a</sup> ± 0.60	320.84 <sup>a</sup> ± 1.56

Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis. Valores con diferente letra en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$ . EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

En comparación a otras especies de *Agave*, los resultados de los extractos secuenciales de *Agave salmiana* superan la actividad antioxidante reportada para hojas de *Agave sisalana* y *Agave americana* (25% y 60% respectivamente) (Ribeiro *et al.*, 2013 y Chirinos *et al.*, 2013), lo cual podría ser debido a que en el escapo se requiere mayor concentración de compuestos con actividad antioxidante, toda vez que en ésta estructura se generan las flores, frutos y semillas, por lo que el escapo floral produce los diferentes compuestos con actividad antioxidante como un mecanismo de defensa contra los depredadores naturales, así como contra microorganismos (Taiz *et al.*, 2010), por otra parte, se ha reportado que factores como estructura de la planta, localización geográfica de la planta, cantidad de lluvia y disponibilidad de nutrientes, influyen en la concentración de este tipo de metabolitos en las plantas, por ejemplo, en las hojas y flores de *Agave tequilana* y *Agave lechuguilla*, el contenido de compuestos antioxidantes presentó una diferencia de hasta 32% respecto a la región donde se desarrolló la planta (Silvia-Montellano *et al.*, 2003).

Por otra parte, los extractos de flores de las especies *Agave durangensis*, *Agave attenuata* y *Agave sisalana*, presentan mayor actividad antioxidante que la obtenida para el escapo floral de *Agave salmiana* (85%, 90% y 82%, respectivamente) (Barriada-Bernal *et al.*, 2014, Rizwan *et al.*, 2012 y Chen *et al.*, 2009), lo cual podría ser un indicio de que los compuestos antioxidantes son transportados a través del escapo hacia las flores y frutos, las cuales son los receptores finales (Leal-Díaz *et al.*, 2015), cuya concentración de compuestos antioxidantes está influida principalmente por el estado de maduración de la planta, como se observó en hojas de *Agave tequilana*, *Agave salmiana* y *Agave americana* (Arrizon *et al.*, 2010, Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008 y Leal-Díaz *et al.*, 2015).

De acuerdo con la clasificación propuesta por Kuete y Efferth (2010), donde las muestras con  $EI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$  se identifican como moderadamente activas y las muestras con  $CE_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$  como de alta capacidad antioxidante, los extractos del escapo floral de *Agave salmiana* se ubican dentro del grupo de moderada actividad antioxidante con un  $CE_{50} > 7.5 \text{ mg/mL}$ .

En plantas provenientes de otros géneros, al igual que en el escapo floral de *Agave salmiana*, la actividad antioxidante es variable, aparentemente en función al tipo y sección de la planta así como del tipo de extracción y uso de disolventes (Tansaringkarn *et al.*, 2008), sin embargo de manera general, los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro de los intervalos reportados para especies vegetales como *Anadenanthera peregrina*, *Pseudopiptadenia contora*, *Albizia procera*, ramas de *Acacia catechu* y corteza de *Pinus maritima* (Mensor *et al.*, 2001 y Dudonné *et al.*, 2009).

**Tabla 1.17** Contribución porcentual de los compuestos bioactivos presentes en el escapo de *Agave salmiana*

Extracto	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas
EC	98.92 <sup>a,B</sup> ± 0.10	0.51 <sup>b,B</sup> ± 0.05	0.49 <sup>b,E</sup> ± 0.04	n.d	0.07 <sup>c,D</sup> ± 0.002
EIA	99.22 <sup>a,A</sup> ± 0.15	0.28 <sup>b,F</sup> ± 0.01	0.26 <sup>b,c,E</sup> ± 0.07	0.02 <sup>d,B</sup> ± 0.001	0.21 <sup>c,B</sup> ± 0.03
EIE	45.88 <sup>b,D</sup> ± 0.21	0.41 <sup>c,D</sup> ± 0.08	53.71 <sup>a,B</sup> ± 2.53	n.d	n.d
ED60/40	98.98 <sup>a,B</sup> ± 0.07	0.44 <sup>b,C</sup> ± 0.02	0.36 <sup>b,E</sup> ± 0.06	0.04 <sup>d,B</sup> ± 0.001	0.17 <sup>c,C</sup> ± 0.02
ED50/50	35.89 <sup>b,E</sup> ± 0.13	0.30 <sup>c,F</sup> ± 0.05	63.76 <sup>a,A</sup> ± 2.81	0.02 <sup>d,B</sup> ± 0.002	0.03 <sup>d,D</sup> ± 0.001
ED40/60	22.30 <sup>b,F</sup> ± 0.09	0.35 <sup>c,E</sup> ± 0.01	23.34 <sup>b,C</sup> ± 1.73	54.01 <sup>a,A</sup> ± 2.31	n.d
EDSEA	92.88 <sup>a,C</sup> ± 0.18	1.05 <sup>c,A</sup> ± 0.02	6.00 <sup>b,D</sup> ± 0.09	n.d	0.06 <sup>d,D</sup> ± 0.001
ESC	98.37 <sup>a,B</sup> ± 0.13	0.42 <sup>b,c,C,D</sup> ± 0.04	0.41 <sup>c,E</sup> ± 0.05	0.36 <sup>d,B</sup> ± 0.07	0.44 <sup>b,A</sup> ± 0.05

Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis. n.d-no detectado. Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna y diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$ . EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

### 3.3 Identificación de los principales grupos de compuestos bioactivos presentes en los extractos

El escapo floral de *Agave salmiana*, mostró la presencia de los tres grupos de metabolitos secundarios vegetales (**Tabla 1.17**), grupos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y taninos), compuestos que contienen nitrógeno (alcaloides y proteínas) y saponinas (terpenos y otros).

Los resultados indican que los compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y proteínas se encuentran presentes en los extractos obtenidos del escapo floral de *Agave salmiana*, independientemente del método de extracción y tipo de disolvente utilizado (**Tabla 1.17**). El conjunto de compuestos fenólicos en los que se incluye a los fenoles simples, flavonoides y taninos, es el grupo más abundante de metabolitos secundarios en el género *Agave*, estos se encuentran distribuidos en toda la planta, donde los fenoles simples y flavonoides se concentran en mayor proporción en las hojas y los taninos en raíces y corteza. Sus funciones son diversas, pueden ser de tipo estructural (lignina y suberina), de protección ante las radiaciones ultravioleta, de formación de pigmentos naturales (antocianinas, flavonas y flavonoles), como reguladores de interacciones planta-microorganismos (rizobios, *Agrobacterium* spp), como efectores de crecimiento (ácido cafeico, ácido ferúlico), de defensa ante microorganismos (los taninos furanocumarinas) y de atracción a polinizadores (Hamissa *et al.*, 2012, Almaraz-Abarca *et al.*, 2013), mientras que las proteínas que se encuentran en menor proporción en la planta en comparación a los demás metabolitos, se vinculan a procesos metabólicos de la planta formando parte del conjunto de enzimas que modulan dichos procesos (Bhatia *et al.*, 1955, Du Toit *et al.*, 1978, Díaz-Tenorioa *et al.*, 2015, González-Cruz *et al.*, 2012, Srinivasan *et al.*, 1953).

Algunas referencias indican que la mayoría de los compuestos fenólicos y flavonoides son extraídos con facilidad utilizando disolventes polares (agua y etanol) (Do Toit *et al.*, 2014, Ghitescu *et al.*, 2015, Drosou *et al.*, 2015), sin embargo, en algunas otras investigaciones se sugiere el uso de disolventes menos polares como la acetona, metanol o el hexano para la extracción de estos compuestos (Złotek *et al.*, 2016, García *et al.*, 2016, Roby *et al.*, 2013), esta discrepancia se debe principalmente a que éstos compuestos tienen estructuras químicas diversas que las hacen afines a diferentes disolventes (Jayaprakasha *et al.*, 2001, Alberti *et*

*al.*, 2014, Roby *et al.*, 2013), los taninos, también muestran un comportamiento semejante, donde el grupo glucosídico (generalmente glucosa), presente en los taninos hidrolizables, es fácilmente extraído con disolventes polares (Markom *et al.*, 2007, Do Toit *et al.*, 2014), mientras que el grupo de la catequina, presente en los taninos condensados tiene mayor afinidad con los disolventes menos polares como metanol o acetona (Trabelsi *et al.*, 2010 y Tatiya *et al.*, 2011).

Otro grupo de compuestos, encontrados en el escapo de *Agave salmiana*, son los compuestos nitrogenados, los cuales pueden incluir péptidos, aminoácidos, aminas y algunas enzimas, que cumplen funciones estructurales y de aporte energético dentro del escapo floral, ya que es una sección del *Agave* que se encuentra en constante crecimiento además de ser la zona donde se generarán las flores, frutos y semillas, por lo que sus necesidades metabólicas demandan la presencia de enzimas que catalizan las reacciones para la síntesis de los diferentes biocompuestos, así como la elongación del tejido vegetal, y generación de nuevas estructuras, es por ello que en los extractos se detectó la presencia de proteínas, las cuales, se ha demostrado, pueden ser extraídas con agua o mezclas agua/etanol (Chel *et al.*, 2003). Algunas de las enzimas extraídas a partir de la piña, hojas y escapo floral de diferentes especies de *Agaves* (*Agave vera cruz* Mill, *Agave americana*, *Agave tequilana*, *Agave angustifolia* y *Agave atrovirens* Karw) son; fructosiltransferasa (sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa y 1,2- $\beta$ - fructano 1-fructosiltransferasa), aminopeptidasas y las metalotioneínas (Bhatia *et al.*, 1955, Du Toit *et al.*, 1978, Díaz-Tenorioa *et al.*, 2015, González-Cruz *et al.*, 2012, Srinivasan *et al.*, 1953)

De los metabolitos secundarios encontrados en el escapo floral de *Agave salmiana*, los alcaloides y saponinas fueron los que mostraron mayor efecto tanto por el disolvente como por el método utilizado en el proceso. Se ha reportado que en el género *Agave*, tanto los alcaloides como las saponinas representan una parte importante dentro de la planta como agentes de protección ante hongos, bacterias y depredadores naturales o como parte de mecanismos de supervivencia ante competencia vegetal. Los alcaloides debido a su naturaleza alcalina (presencia del grupo amina o imina) que genera un sabor amargo al consumirlo como la quinolizidina, actúa principalmente como defensa ante herbívoros e insectos sin embargo la presencia de nitrógeno en su estructura sugiere también su

participación como producto de desecho, almacenamiento y transporte del nitrógeno no metabolizado y como regulador de crecimiento (alcaloides derivados de la putrescina) (Singh *et al.*, 2018, Fallon *et al.*, 2014, Wink *et al.*, 2017). Mientras que las saponinas de tipo esteroideal aisladas del género *Agave* (*Agave sisalana*, *Agave americana*, *Agave angustifolia* y *Agave offoyana*) como tigogenina, neotigogenina, hecogenina, neohecogenina, rockogenina, cantalasaponina-1, Agabrittonósido E, Magueyosides A, Agabrittonosides D y cantalasaponina, que se encuentran en mayor proporción en la planta en comparación a las saponinas terpénicas, realizan principalmente funciones fitotóxicas (contra *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Lepidium sativum*, *Allium* spp.), antifúngicas (*Cercospora agavicola*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*) y antimicrobianas (*Pectobacterium carotovora*), como mecanismo de supervivencia ante competencia vegetal, ataque fúngico y bacteriano (Chen *et al.*, 2011, Pérez *et al.*, 2014, Pereira *et al.*, 2017).

Los resultados mostraron que el uso del etanol como único o primer disolvente evita la extracción de los alcaloides, lo cual podría ser debido a reacciones de oxidación-reducción donde el grupo OH del etanol sustituye el grupo alcoxi (grupo alquilo unido a un átomo de oxígeno) presente en los alcaloides, por grupos hidroxilo, provocando cambios en la estructura que afectan su actividad y por ende su disponibilidad (Crow *et al.*, 1949). Este comportamiento también fue observado en extractos de *Melicope fareana*, *Eugenia caryophyllata* y en cortezas de *Terminalia avicennoides*, *Entada africana*, *Mitragyna stipulosa* y *Lanaea acida*, donde los extractos obtenidos con etanol no mostraron la presencia de alcaloides (Crow *et al.*, 1949, Joshi *et al.*, 2011 y Aboaba *et al.*, 2006).

Por su parte, las saponinas al estar conformadas por una estructura glucósido-esteroideal, donde el glucósido (azúcar) es fácilmente extraído por disolventes polares y la parte esteroideal o triterpénica soluble en disolventes orgánicos, hace propensos a este tipo de compuestos a cambios en su estructura al interactuar con diferentes disolventes para su extracción bajo mecanismos de acción que aún no están del todo claros, sin embargo un estudio realizado con saponinas aisladas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) indica que la aglicona (grupo no glucídico) sufre desprotonación (cesión de un catión hidrógeno) al interactuar con el etanol en su extracción, haciendo inestable la molécula de la saponina (Heng *et al.*, 2006 y Sidana, *et al.*, 2016), por lo que, la presencia de etanol en elevadas concentraciones se

convierte en un limitante para la obtención de éste tipo de compuestos (Ko *et al.*, 1992). Otra explicación de la poca o nula extracción de saponinas por la presencia del etanol en altas concentraciones, es debido a que a mayor proporción de etanol utilizado en la extracción se favorece la obtención de componentes lipídicos, aumentando la resistencia a la difusión y disminuyendo la extracción de saponinas (Chen *et al.*, 2009). De tal manera que la solubilidad de las saponinas en presencia de etanol dependerá principalmente de las características estructurales de su grupo esteroidal (Ozlem *et al.*, 2007).

Un comportamiento semejante, fue observado en los extractos de Ginseng rojo coreano (*Panax ginseng*) y de soya (*Glycine max*), donde la extracción de saponinas se vio reducida al aumentar la proporción del etanol en la extracción (Lee *et al.* y 2016 y Ozlem *et al.*, 2007).

**Tabla 1.18** Identificación de los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

Extracto	Compuestos bioactivos					
	Fenólicos			Grupos con N		Saponinas
	Fenoles simples	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Proteína	(terpenos y otros)
EC	+	+	+	-	+	+
EIA	+	+	+	+	+	+
EIE	+	+	+	-	-	-
ED60/40	+	+	+	+	+	+
ED50/50	+	+	+	+	+	+
ED40/60	+	+	+	+	-	-
EDSEA	+	+	+	-	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+

(-) indica ausencia del compuesto, (+) indica presencia del compuesto. Los valores se expresan como la media del triplicado de los análisis. EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

Los resultados obtenidos en los extractos etanólicos del escapo de *Agave salmiana* son similares a los reportados para los extractos de pétalo de *Crocus sativus* L., donde el análisis fitoquímico de sus principales compuestos bioactivos (flavonoides, taninos y saponinas) tienen el mismo patrón de presencia y ausencia en los compuestos respectivos (Hosseinzadeh *et al.*, 2002), de manera similar, los extractos acuosos de *Cleome rutidosperma*, *Ettlingera coccinea*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Psidium guajava* y *Adiantum capillus* mostraron la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos y saponinas al igual que los extractos obtenidos del escapo floral de *Agave salmiana* (Edeoga *et al.*, 2005, Wadood *et al.*, 2013 e Ishaq *et al.*, 2014).

Por el contrario, en las extracciones duales, la presencia de los metabolitos secundarios en el escapo de *Agave salmiana* difiere a lo reportado para los extractos de *Acanthospermum hispidum*, donde las saponinas se encuentran presentes en extractos que tienen mayor proporción de etanol con respecto al agua (30/70, agua/etanol) (Roy *et al.*, 2010), de igual manera se observó que en los extractos etanólicos al 50% de *Gymnema sylvestre* y *Tagetes erecta* Linn no hubo presencia de flavonoides y alcaloides (Kiranmai *et al.*, 2011), mientras que en el escapo de *Agave salmiana* se muestra la presencia de todos estos metabolitos secundarios y en los extractos de hojas de *Psidium guajava* L. al aumentar la proporción de agua (80%) se limitó la extracción de alcaloides y proteínas (Arya *et al.*, 2012), siendo estos compuestos extraídos en condiciones similares en los extractos del escapo de *Agave salmiana*, indicando que la presencia o ausencia de éstos compuestos, dependerá de diferentes factores como son el tipo y sección de la planta analizada además del tipo de disolvente de extracción.

En cuanto a las extracciones secuenciales de este tipo de metabolitos, a diferencia de los resultados obtenidos en los extractos de *Agave salmiana*, se reporta que para extractos de ginseng brasileño (*Panax ginseng*), fibra de alfalfa (*Medicago sativa*) y hojas de *Agave sisalana* y *Ziziphus joazeiro*, el uso de disolventes de diferente polaridad no interfirió en la extracción de las saponinas, encontrándose diferentes tipos en cada uno de los extractos obtenidos, aquellos solubles en agua (con un mayor grupo glucósidico), los solubles en disolventes menos polares como la acetona (con un mayor grupo de esteroides) y aquellos extraídos con disolventes de polaridad media (combinaciones de agua/etanol) (Bitencourt *et al.*, 2014, Malinow *et al.*, 1979 y Ribeiro *et al.*, 2013).

### **3.4 Cuantificación de los principales grupos de compuestos presentes en los extractos**

Entre los metabolitos secundarios presentes en el escapo floral de *Agave salmiana*, la familia de los Compuestos Fenólicos fueron los que mostraron mayor concentración en todos los extractos obtenidos (**Tabla 1.18**), alcanzando concentraciones hasta de  $6208.66 \pm 39.62$   $\mu\text{g}$  AG/g extracto seco, cuando se realiza la extracción secuencial, lo cual es debido a que en esta extracción se utilizaron disolventes con diferentes polaridades y considerando la variabilidad de la estructura química de los compuestos fenólicos, los disolventes permitieron

la extracción de diferentes grupos que conforman esta familia de compuestos, aunado a que la técnica utilizada para su cuantificación (Folin-Coicalteu) permite identificar los Compuestos Fenólicos Totales, es decir aquellos compuestos que comparten cierta similitud estructural como son anillos de benceno y grupos hidroxilados (Ikawa *et al.*, 2003 y Pękal *et al.*, 2014), por lo que en este caso los fenoles simples, flavonoides y taninos así como otros compuestos fenólicos no cuantificados en este trabajo, se encuentran incluidos en los resultados.

Los resultados indican que tanto el tipo de extracción como la polaridad de los disolventes utilizados influyen en la extracción de compuestos fenólicos, presentándose variabilidad en los resultados obtenidos. El valor máximo fue obtenido cuando se utilizó la extracción secuencial, seguido por las extracciones dual 50/50 y dual secuencial, las cuales fueron 29 y 34% menores con respecto a la extracción secuencial, lo cual indica que el uso de polaridades diferentes en la extracción permite la separación de mayor cantidad de compuestos fenólicos (Smolskaitė *et al.* 2015 y Gajera *et al.*, 2017), lo cual se ve corroborado comparando los resultados de los extractos obtenidos con un solo disolvente donde la concentración de compuestos fenólicos se disminuye hasta un 74% con respecto a la extracción secuencial. Dicho comportamiento también ha sido observado en los extractos de grosella roja (*Ribes rubrum*), grosella negra (*Ribes nigrum*), uva (*Vitis vinifera* var. *Pinot Noire*) y el durazno (*Prunus persica* L.), donde el Contenido de Fenoles Totales disminuye 66%, 75%, 97% y 51% respectivamente, en comparación a los extractos en los que se utilizó varios disolventes (Lapornik *et al.* 2005 y Mokrani *et al.*, 2016).

Por otra parte, la concentración de Compuestos Fenólicos Totales presentes en los extractos del escapo floral de *Agave salmiana* es menor respecto a lo reportado para los extractos metanólicos y acuosos de hojas de *Agave attenuata* y *Agave americana* con un 41% y 20% respectivamente (Rizwan *et al.*, 2012 y Nasri *et al.*, 2012), pero es mayor a lo reportado para los extractos metanólicos de hojas de *Agave americana* y bagazo de *Agave tequilana* con un 28% y 95% respectivamente (Hamissa *et al.*, 2012 y Arreola *et al.*, 2016). Lo que indica que, dentro del mismo género, se presentan diferencias en cuanto a concentración de compuestos fenólicos, lo cual depende, además de los disolventes y los métodos de extracción, de

características botánicas (especie, estructura y sección de la planta) y parámetros externos (lugar de procedencia de la planta, técnicas de cultivo), (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013).

En comparación a otras fuentes de origen vegetal, el Contenido de Fenoles Totales del escapo floral de *Agave salmiana* se posiciona dentro de las plantas clasificadas como herbales y medicinales con el mayor contenido de este tipo de metabolitos, en un intervalo de 400 a 7400 µg GAE/g extracto, debajo de los frutos rojos (*Empetrum nigrum*, *Aronia melanocarpa*, *Fragaria ananassa*, *Malus pumila* y *Rubus idaeus*) con hasta 87% y por encima de algunos cereales (*Avena sativa*, *Triticum aestivum* y *Hordeum sativum*), plantas (*Pinus sylvestris*, *Betula pendula* y *Salix alba*) y vegetales (*Daucus carota*, *Pisum sativum*, *Solanum tuberosum*, y *Lycopersicon esculentum*) hasta con un 95% (Kähkönen *et al.*, 1999, Marinova *et al.*, 2005 y Sengul *et al.*, 2009).

Entre los compuestos fenólicos presentes en los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*, los taninos fueron los compuestos que mostraron mayor concentración, lo cual era de esperarse si se considera que el escapo floral es una estructura vegetal que ha mostrado empíricamente baja contaminación por insectos, hongos o bacterias (*Chortoicetes terminifera*, *Fusarium oxysporum* y *Pectobacterium atrosepticum*, respectivamente), lo cual es un indicio de la presencia de taninos en altas concentraciones, ya que éstos compuestos se caracterizan por tener efecto en la prevención de la contaminación, derivada de su actividad sobre enzimas de adhesión y proteínas de transporte de envoltura celular, mediante interacciones moleculares formando complejos con las proteínas a través de las fuerzas no específicas, tales como enlaces de hidrógeno y efectos hidrófobos, así como por la formación de enlaces covalentes, provocando cambios de permeabilidad de la membrana y lisis celular (Medini *et al.*, 2014, Cowan, 1999, Shafique *et al.*, 2018, Shikano, 2017 y Meziani *et al.*, 2015).

Los resultados indican que, en la extracción de taninos al igual que en los demás compuestos, existe influencia tanto por el método de extracción como por el disolvente utilizado, mostrando las mayores concentraciones de taninos con la extracción dual 50/50, seguido de la extracción dual 40/60 y la extracción individual con etanol, las cuales disminuyeron 62% y 69% respectivamente, en relación a la mayor concentración obtenida, lo que indica que aparentemente la presencia del etanol en mayor proporción o como único disolvente,

favorece la obtención de los taninos, específicamente del tipo condensados (proantocianidinas, prodelfinidinas, profisetinidinas y prorobinetinidinas) (Klongsiriwet *et al.*, 2015 y Schofield *et al.*, 2001), los cuales tienden a formar fácilmente complejos con moléculas proteínicas y son preferentemente extraídos con disolventes menos polares (etanol, etanol/agua, acetona) (Madrigal-Carballo *et al.*, 2016), por lo que en los extractos de *Agave salmiana* la presencia del etanol rompe las posibles interacciones de los taninos condensados con las proteínas presentes, liberando así los metabolitos y haciéndolos más accesibles para su extracción (Hagerma *et al.*, 1980 y Madrigal-Carballo *et al.*, 2016), lo cual también fue observado en extractos de sorgo (*Sorghum* spp.), de hollejo y semilla de uva (*Vitis vinifera*) (Hagerma *et al.*, 1980, Downey *et al.*, 2016 y Roumeas *et al.*, 2013).

Por otra parte, la extracción donde el agua está presente como único disolvente o disolvente mayoritario, se obtuvieron extractos con las menores concentraciones de taninos, lo cual indica que los extractos del escapo floral, presentan menor proporción de taninos hidrolizables, que pueden ser fácilmente extraídos con agua debido a la presencia de un grupo glucosídico en su estructura (Madrigal-Carballo *et al.*, 2016, Downey *et al.*, 2016 y Roumeas *et al.*, 2013).

La extracción secuencial, generó extractos con una concentración 98% menor con respecto a la extracción dual 50/50, lo cual podría ser debido a que el uso de los disolventes con polaridades crecientes, pudo haber generado una red que evitó la extracción y subsecuente cuantificación de los taninos, este mismo comportamiento fue observado en extractos secuenciales de *Cichorium intybus*, *Carya illinoensis* y sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Muthusamy *et al.*, 2008, Hahn *et al.*, 1986 y Pinheiro *et al.*, 2009).

En comparación a lo reportado para el escapo de *Agave salmiana*, los extractos de *Agave lechuguilla*, *Agave americana* y *Agave angustifolia* se encuentran por debajo del contenido total de taninos con hasta 98%, 15% y 93% respectivamente (Mendez *et al.*, 2012, Nasri *et al.*, 2012 y López-Romero *et al.*, 2017). Mientras que si se comparan los extractos de *Agave salmiana* con otras fuentes vegetales, se pueden observar una gran variabilidad en los resultados, por ejemplo; los extractos de hojas de las plantas como *Garcinia cola*, *Azadirachta indica* y *Carica papay* mostraron 98%, 96% y 87% menos concentración de taninos que el escapo floral de *Agave salmiana* (Eleazu *et al.*, 2012), mientras que los

extractos de plantas como *Suaeda fruticosa* y *Drynaria fortunei* (Oueslati *et al.*, 2012 y Chang *et al.*, 2012) reportan concentraciones similares y extractos de plantas como *Ficus decora* y *Ficus virnes* muestran concentraciones mayores a los obtenidos en el presente trabajo hasta en un 83% (Abdel-Hameed, 2009), finalmente, con relación al contenido de taninos en frutas (*Astrocaryum aculeatum*, *Juniperus excelsa* y *Punica granatum*) éstas superan los valores obtenidos en el escapo de *Agave salmiana* hasta con un 77% (Sagrillo *et al.*, 2015, Nabi *et al.*, 2012 y Saad *et al.*, 2012).

Los flavonoides, fueron los compuestos pertenecientes a la familia de los Compuestos Fenólicos, que presentaron menor concentración en los extractos, siendo la extracción dual 40/60 la que generó mayor concentración de flavonoides, seguido de la extracción dual 50/50 y la extracción dual secuencial, estos resultados podrían indicar que, el agua y el etanol realizan una interacción sinérgica, debido a la polaridad resultante (6.6-7.84), valor que ha demostrado ser favorable para la extracción de dichos compuestos (Bimakr *et al.*, 2011), es por ello que las extracciones individuales de agua y etanol mostraron valores más bajos (64% y 59% respectivamente), con respecto a la extracción dual 40/60. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son semejantes a lo que se ha reportado para extractos de las plantas *Radix Astragali*, *Mentha spicata* L. y *Hieracium pilosella* L. donde las combinaciones de agua/etanol (50/50, 30/70 y 50/50 respectivamente) generaron polaridades entre 6-8, fueron las que permitieron la extracción de mayor concentración de este tipo de compuestos (Xiao, 2008, Bimakr *et al.*, 2011 y Stanojević *et al.*, 2009).

Respecto a otros *Agaves*, el contenido de flavonoides en los extractos de escapo de *Agave salmiana* están por debajo de los valores reportados para las especies *Agave lechuguilla*, *Agave durangensis* y *Agave attenuata*, por 98.1%, 98.6% y 97.6% respectivamente (Hamissa *et al.*, 2012, Barriada-Bernal *et al.*, 2014 y Rizwan *et al.*, 2012).

Comparado con otras fuentes de origen vegetal, los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*, presentó menores concentraciones de flavonoides, tal es el caso de extractos de *Ruta montana*, *Artemisia arboresens*, *Thapsia garganica* y *Juniperus oxycedrus*, donde los valores obtenidos están por debajo hasta en un 98% (Djeridane *et al.*, 2006), de igual manera para para extractos de frutas como la mora (*Rubus ulmifolius*), fresa (*Fragaria vesca*) y manzana (*Pyrus malus* L.) donde el contenido de flavonoides supera lo obtenido en el

presente trabajo con hasta 99% (de Souza *et al.*, 2014 y Peçkal *et al.*, 2014), indicando que el escapo de *Agave salmiana* no es una fuente potencial de este tipo de metabolitos.

Además de los taninos y los flavonoides existe una gran variedad de compuestos que pertenecen a la familia de los Compuestos Fenólicos, como los fenoles simples (tienen dos o tres grupos hidroxilo en el anillo aromático, ejemplo; catecol, resorcinol, hidroquinona y floroglucinol), los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos), cumarinas (tienen un anillo aromático unido a un heterociclo oxígeno), xantonas, estilbenos, benzofenonas (dos anillos aromáticos unidos por cetona), quinonas (un anillo orto-benzoquinona completamente conjugado), lignanos y ligninas (compuestos fenólicos dímeros derivados de fenilalanina y alcoholes cinámicos presentes en varios alimentos) (Peñarrieta *et al.*, 2014), los cuales fueron cuantificados en conjunto, encontrando que pueden representar hasta el 75% del total de los compuestos fenólicos presentes en los extractos, este porcentaje de extracción dependerá del tipo de extracción y disolvente utilizado. El extracto que presentó mayor concentración de compuestos fenólicos simples fue el obtenido con la extracción individual con agua como disolvente, seguido de la extracción dual 60/40 (agua/etanol), lo que indica que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en el escapo, son de naturaleza polar (Gu *et al.*, 2014).

Se ha reportado mayor concentración de compuestos fenólicos simples en extractos de *Agave americana* (4.49 mg\*g<sup>-1</sup>) y *Agave atrovirens* (6.64 mg\*g<sup>-1</sup>) en comparación a lo obtenido para los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*, mientras que extractos de *Agave attenuata* y *Agave durangensis* presentaron una concentración de contenido de fenoles simples del 95% y 89% menor a lo reportado en el presente trabajo (Hamissa *et al.*, 2012, Rizwan *et al.*, 2012, Santos-Zea *et al.*, 2012), en otras plantas el contenido de estos metabolitos en los extractos se supera con 88%, 91% y 57%, en especies como *Amaranthus caudatus*, *Chenopodium quinoa* y *Oxalis tuberosa* respectivamente, mientras que en relación a los extractos frutales como manzana (*Pyrus malus* L.), toronja (*Citrus maxima*) y ciruela pasa (*Prunus domestica*) el valor obtenido para los extractos del escapo de *Agave salmiana* se encuentra por debajo con 37%, 60% y 52% respectivamente (Balasundram *et al.*, 2006 y Chirinos *et al.*, 2013).

El segundo grupo de metabolitos secundarios presente en el escapo floral de *Agave salmiana* son las saponinas, siendo la extracción secuencial la que permitió la mayor extracción, lo cual podría deberse a la versatilidad de la estructura de estos compuestos, al contener dos elementos, la aglicona también denominada sapogenina soluble en lípidos (esteroides o triterpenos) y los glucósidos solubles en agua (arabinosa, glucosa, y galactosa), permitiendo su extracción por una mayor variedad de disolventes (Rezgui *et al.*, 2016 y Cheok *et al.*, 2014).

Al utilizar agua como único disolvente o disolvente mayoritario (EIA y ED60/40) se extrae menor concentración de éstos compuestos, lo cual puede indicar que en los extractos se encuentra menor concentración de saponinas tipo triterpénicas en el escapo, las cuales en comparación a las saponinas tipo esteroidales son favorablemente solubles en medios polares y se encuentran en menor proporción en el género *Agave*, lo cual podría explicar el bajo contenido de este tipo de metabolitos en los extractos más polares y un mayor contenido en extractos en los que se utilizó disolventes menos polares (Chen *et al.*, 2011, Martini, 2017 y Rodríguez *et al.*, 2014), el mismo efecto se observó al utilizar etanol como único disolvente o en combinación con el agua donde se extraen las bajas concentraciones de este metabolito (ED50/50, EDSEA) e inclusive en algunos casos sólo se obtienen trazas de saponinas por lo que no pudieron cuantificarse (EIE, ED40/60), este comportamiento puede ser explicado debido a que el etanol podría formar enlaces con los esteroides del grupo aglicona de la saponina por enlaces no covalentes lo que impide su completa extracción e identificación (Moreau *et al.*, 2003).

Los contenidos de saponinas del escapo floral de *Agave salmiana* obtenidos son 94%, 96% y 95% menores a lo reportado para extractos de *Agave americana*, *Agave decipiens* y *Agave attenuata* respectivamente (Leal-Díaz *et al.*, 2015, Abdel-Gawad *et al.*, 1999 y da Silva *et al.*, 2002) y semejantes a las encontradas en los extractos de *Agave offoyana* (2.4-18.8 µg/g) y *Agave macroacantha* (4-7.5 µg/g) (Pérez *et al.*, 2013, Eskander *et al.*, 2010). Mientras que en comparación con otras fuentes vegetales los valores reportados en el presente trabajo son superiores que los extractos de plantas como *Chenopodium quinoa*, *Clematis chinensis* y *Clematis hexapetala* con hasta 87% (Szakiel *et al.*, 2011) y más bajos respecto a los extractos

de los frutos de *Sapindus saponaria*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Pithecellobium saman* con más del 98% (Hess *et al.*, 2003).

El tercer grupo de metabolitos secundarios presente en el escapo floral de *Agave salmiana* es el de los compuestos que contienen nitrógeno, en este caso, se cuantificó la presencia de alcaloides, los cuales presentaron las menores concentraciones en comparación con los demás compuestos cuantificados, siendo la extracción secuencial la que permitió la mayor extracción, lo cual podría deberse al grupo nitrogenado de los alcaloides que permite una mayor extracción con disolventes menos polares (Anulika *et al.*, 2016), este comportamiento se corrobora al observar la disminución del contenido de alcaloides de hasta el 96% al utilizar disolventes polares (agua y etanol), ya sea como único disolvente (EIA y EIE) o en combinación (ED60/40, ED50/50 y ED40/60), indicando que los disolventes polares no favorecen la extracción de este tipo de compuestos. Este mismo comportamiento se observó en los extractos de *Claviceps purpurea*, *Solanum nigrum* y *Dissotis rotundifolia*, donde el contenido de alcaloides disminuyó al aumentar la polaridad del medio extractivo (Hafner *et al.*, 2008, Jasim *et al.*, 2015 y Darkwah *et al.*, 2018).

El contenido de alcaloides del escapo floral de *Agave salmiana* está por debajo de lo reportado para extractos de hojas, flores y raíces de plantas (*Albizia amara*, *Achyranthes aspera*, *Cassia fistula*, *Cassia auriculata*, *Datura stramonium*, *Moringa concanensis*, *Mahonia spp.*, *Dendrobium thyrsiflorum*, *Aniba rosaeodora*, *Capparis spinosa*) hasta en 99% (Kumar *et al.*, 2008, Santhi *et al.*, 2016, Ji *et al.*, 2000, Bhattacharyya, *et al.*, 2015, Chevalier *et al.*, 2014, Khatib *et al.*, 2016), esta gran diferencia podría deberse a que en las plantas los alcaloides son sintetizados principalmente en las hojas, flores y en algunos casos raíces, actuando en hojas y flores como parte del mecanismo de defensa ante herbívoros e insectos debido a su naturaleza alcalina (presencia del grupo amina o imina) que genera un sabor amargo al consumirlo y en las raíces desempeñando funciones como producto de desecho, almacenamiento y transporte del nitrógeno no metabolizado, así como regulador de crecimiento (alcaloides derivados de la putrescina) (Singh *et al.*, 2018, Fallon *et al.*, 2014, Wink *et al.*, 2017), siendo el tallo y semillas las partes con un menor contenido de este metabolito, ya que el nitrógeno en estas estructuras es utilizado principalmente para la síntesis de proteínas (Yadav *et al.*, 2015), dicho comportamiento también se ha observado en

las plantas *Moringa concanensis*, *Mahonia* spp. y *Solanum tuberosum* donde al analizar diferentes secciones, se observó una concentración elevada de alcaloides en tejidos suaves (hojas, flores, raices y frutos) con relación al contenido obtenido en semillas y tallo de hasta 64%, 73% y 82% respectivamente, (Santhi *et al.*, 2016, Ji *et al.*, 2000, Hossain *et al.*, 2016).

La concentración de alcaloides obtenida en el presente trabajo indica que el escapo de *Agave salmiana* no es una fuente importante de este tipo de alcaloides.

Tabla 1.18 Determinación del contenido de compuestos bioactivos presentes en los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

Extracto	Contenido de Fenoles totales (µg AG/g extracto seco)*	Compuestos Fenólicos Simples (µg AG/g extracto seco)	Flavonoides (µg QE/g extracto seco)	Taninos (µg AT/g extracto seco)	Alcaloides (µg atropina/g de extracto seco)	Saponinas (µg saponina estándar/g extracto seco)
<b>EC</b>	1776.13 <sup>a,G</sup> ± 29.02	1246.67 <sup>b,D</sup> ± 51.32	6.47 <sup>c,D,E</sup> ± 0.45	6.23 <sup>c,E</sup> ± 0.35	n.d	0.85 <sup>c,D</sup> ± 0.04
<b>EIA</b>	1917.25 <sup>b,F</sup> ± 18.31	2113.33 <sup>a,A</sup> ± 61.10	6.07 <sup>c,E</sup> ± 0.25	5.53 <sup>c,E</sup> ± 0.25	0.43 <sup>c,B,C</sup> ± 0.03	4.53 <sup>c,B</sup> ± 0.47
<b>EIE</b>	1660.10 <sup>a,H</sup> ± 44.40	783.31 <sup>c,F</sup> ± 25.17	6.97 <sup>d,D,E</sup> ± 0.25	916.90 <sup>b,C</sup> ± 5.29	n.d	n.d
<b>ED60/40</b>	2138.59 <sup>a,D</sup> ± 30.02	1953.33 <sup>b,B</sup> ± 55.08	8.17 <sup>c,D</sup> ± 0.25	7.63 <sup>c,E</sup> ± 0.40	0.84 <sup>c,B,C</sup> ± 0.03	3.40 <sup>c,C</sup> ± 0.40
<b>ED50/50</b>	4380.74 <sup>a,B</sup> ± 20.13	1662.07 <sup>c,C</sup> ± 41.03	13.77 <sup>d,B</sup> ± 0.45	2952.50 <sup>b,A</sup> ± 36.15	0.93 <sup>d,B</sup> ± 0.03	1.41 <sup>d,D</sup> ± 0.38
<b>ED40/60</b>	2060.90 <sup>b,E</sup> ± 31.40	1060.26 <sup>c,E</sup> ± 66.25	16.83 <sup>d,A</sup> ± 1.02	1110.03 <sup>c,B</sup> ± 13.49	0.26 <sup>a,C</sup> ± 0.04	n.d
<b>EDSEA</b>	4073.33 <sup>a,C</sup> ± 19.74	1033.18 <sup>b,E</sup> ± 60.28	11.73 <sup>c,C</sup> ± 1.37	66.77 <sup>c,D</sup> ± 0.35	n.d	0.71 <sup>c,D</sup> ± 0.02
<b>ESC</b>	6208.66 <sup>a,A</sup> ± 39.62	1763.45 <sup>b,C</sup> ± 45.09	7.60 <sup>c,D,E</sup> ± 0.44	7.40 <sup>c,E</sup> ± 0.30	6.40 <sup>c,A</sup> ± 0.50	7.87 <sup>c,A</sup> ± 0.25

\*Tomado del extracto total. Prueba de Tukey. n.d-compuesto bioactivo no detectado.

Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna y diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

### 3.5 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de *Agave salmiana*

Los resultados obtenidos indican que tanto el tipo de extracción como los disolventes utilizados influyen en la actividad antioxidante de los metabolitos presentes en el escapo de *Agave salmiana* (Tabla 1.19). El agua como disolvente mayoritario favoreció la extracción de compuestos que presentaron elevada actividad antioxidante, observándose la siguiente tendencia, flavonoides > taninos > fenoles simples > alcaloides, indicando que los compuestos antioxidantes presentes en el escapo de *Agave salmiana* son fácilmente extraíbles en disolventes de naturaleza polar, sin embargo en el caso particular de las proteínas y saponinas, se observó un incremento de la actividad antioxidante al ser extraídas a partir del extracto crudo, es decir en ausencia de disolventes (EC), lo cual puede ser debido a que estos últimos metabolitos tienen grupos nitrogenados y esteroidales respectivamente, que interaccionan con mayor facilidad con disolventes bajo reacciones de oxidación reduciendo modificando la estructura de los compuestos o bien formando enlaces inespecíficos (fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno) que impiden la interacción con los radicales oxidantes utilizados en el análisis de actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) disminuyendo en ambos casos sus propiedades antioxidantes en los extractos en los que se utilizó disolventes (Huang *et al.* 2015). Este mismo comportamiento se observó para los extractos crudos de *Atriplex laciniata*, *Datura metel* e *Isodon rugosus* en donde las saponinas, péptidos y algunas enzimas mostraron mayor actividad antioxidante en comparación a los extractos donde se utilizó disolvente en la extracción (hexano, metanol, etanol, acetato de etilo y agua) (Kamal *et al.*, 2015, Alabri *et al.*, 2014 y Zeb *et al.*, 2014).

La familia de compuestos fenólicos en la que se incluyen los fenoles simples, flavonoides y taninos, son el grupo de metabolitos más estudiado en el ámbito fitoquímico, los cuales en su mayoría presentan una elevada actividad antioxidante en comparación a otros metabolitos (saponinas, alcaloides, taninos, terpenos y péptidos) debido a que tienen grupos hidroxilo, los cuales interaccionan fácilmente con los compuestos oxidantes por medio de reacciones de oxidación reduciendo (Nimse *et al.*, 2015).

En el escapo de *Agave salmiana* este grupo fenólico presentó 97%, 98% y 94% mas actividad antioxidante en relación a los alcaloides, proteínas y saponinas respectivamente, este

comportamiento también se observó en los extractos de hoja de *Agave lechuguilla*, *Agave sisalana* y *Agave salmiana*, donde los metabolitos que comparten el grupo OH pertenecientes al conjunto de fenoles, presentaron hasta 86% mayor actividad antioxidante en comparación a los metabolitos que carecen o presentan menor cantidad de este grupo hidroxilado (alcaloides, saponinas y terpenos) (Sidana *et al.*, 2016 y Carmona *et al.*, 2017), sin embargo, estos últimos compuestos si bien no presentan elevada actividad antioxidante, se ha encontrado que tienen otras propiedades importantes como antiinflamatorios, antihipertensivos, inmunomoduladores, antiparasitarios y antifúngicos (López-Romero *et al.*, 2018).

Entre el grupo de compuestos fenólicos presentes en los extractos del escapo de *Agave salmiana*, los flavonoides fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante con 95% y 96% en comparación a los fenoles simples y taninos respectivamente, lo cual puede ser debido a que los flavonoides en comparación a los fenoles simples y taninos, ejercen su actividad antioxidante por otros mecanismos además de donar el electrón hidrógeno del grupo OH (comportamiento propio del grupo de fenoles), como la capacidad de quelar metales (cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre) asociado a grupo catecol (posiciones 3' y 4') en el anillo B y 5 hidroxilo en el anillo C de los flavonoides e inhibición de enzimas (lipoxigenasa, ciclo-oxigenasa, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa) evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno e hidroxiperóxidos orgánicos (Kasprzak *et al.*, 2015, Cherrak *et al.*, 2016), como se observó en los extractos de *Opuntia streptacantha* y *Opuntia ficus* (Mabrouki *et al.*, 2015).

Los resultados indican que, la actividad antioxidante al igual que análisis anteriores está influida por el método de extracción y por el disolvente utilizado, mostrando los extractos de flavonoides una mayor actividad antioxidante al aumentar el número de disolventes utilizados en la extracción, de acuerdo con la siguiente tendencia, secuencial agua-etanol > extracción dual 50/50 > extracción dual 60/40 > individual agua, con una disminución en la actividad antioxidante hasta 90% al realizar extracciones en combinación agua/etanol y hasta 93% al realizar extracciones individuales con disolventes absolutos con respecto al valor más elevado (extracción secuencial EDSEA) en esta determinación.

También es importante mencionar que no existe diferencia estadística significativa al realizar extracciones secuenciales con dos o 5 disolventes de diferente polaridad, indicando que el proceso secuencial independientemente del disolvente utilizado favorece el aumento de la

actividad antioxidante de los flavonoides, lo cual puede ser debido a que se provocan cambios de oxido-reducción en la estructura de estos compuestos al interactuar con los disolventes en alguna de las etapas secuenciales de la extracción, formando complejos más antioxidantes como quinonas y pironas (Kruk *et al.*, 2016), lo cual también fue observado en extractos de *Salvia miltiorrhiza*, *Alchemilla vulgaris*, *Sambucus ebulus* L., *Mentha spicata* L. y *Fragaria vesca* L. (Weng *et al.*, 1992 y Kiselova *et al.*, 2006).

Por otra parte, las extracciones donde el agua está presente como único disolvente o disolvente mayoritario aumentó hasta 90% la actividad antioxidante en los extractos de flavonoides, en comparación al valor más elevado obtenido en este metabolito (EDSEA), lo cual puede ser debido a un mayor contenido de flavonoides unidos a azúcares (glicósidos o heterósidos; hesperidina, naringina, rutina, quercitrina y antocianinas) en el extracto, los cuales a diferencia de los flavonoides que carecen de este grupo (agliconas o geninas; flavonona, flavona, flavonol, isoflavonoide, auroa y antocianidina), son altamente hidrosolubles (Lou *et al.*, 2016 y Xiao, 2017).

Mientras que los extractos en los que se utilizó etanol como disolvente único presentó la menor actividad antioxidante al disminuir 93% respecto al extracto secuencial, el cual mostró la mayor actividad antioxidante, indicando que la presencia de etanol en la extracción afecta las propiedades antioxidantes de los flavonoides, debido a que la baja polaridad del etanol en comparación al agua (5.2 y 9, etanol y agua respectivamente) (Sharapin, 2010) posiblemente logró extraer flavonoides menos polares (luteonina, hesperidina y naringina), los cuales a diferencia de los flavonoides polares (isoquercitina, quercetrina, canferol y Orientina), presentan menos grupos hidroxilo y por ende su actividad antioxidante disminuye (Kasote *et al.*, 2015).

En comparación a otros Agaves, la actividad antioxidante de los flavonoides obtenidos en el escapo de *Agave salmiana* es inferior a lo reportado para los extractos de hojas de *Agave americana*, *Agave duranguensis* y *Agave rzedowskiana* en 66%, 52% y 48%, respectivamente (Dif, 2017, Barriada-Bernal *et al.*, 2014 y Ahumada-Santos *et al.*, 2013), lo cual puede deberse a que los flavonoides presentes en dichos Agaves, son de tipo geninas (carecen de uniones con monosacáridos), los cuales tienen mayor actividad antioxidante con relación sus respectivos heterósidos (flavonoides que presentan el grupo glúcido) (Oliveira *et al.*, 2017), que de acuerdo a los resultados en el presente trabajo están en mayor proporción en los extractos del escapo de

*Agave salmiana*. Mientras que, en comparación a los resultados obtenidos en otras especies de planta, los extractos del escapo de *Agave salmiana* superan a lo reportado para los extractos de *Arisaema jacquemontii*, *Limnophila aromatica* y *Cyclocarya paliurus*, con 46%, 61% y 35% respectivamente (Baba *et al.*, 2015, Do *et al.*, 2014 y Xie *et al.*, 2015) y permanece debajo de los valores con respecto a extractos de frutas cítricas y de frutas de las plantas *Zizyphus mauritiana* y *Aristotelia chilensis* hasta con 86%, debido a estos este tipo de fuentes vegetales son consideradas de elevada actividad antioxidante por su elevado contenido de flavonoides con relación a diversas especies vegetales (Koley *et al.*, 2016, Genskowsky *et al.*, 2016 y Zou *et al.*, 2016).

Los fenoles simples, fueron los compuestos pertenecientes a la familia de los compuestos fenólicos, que presentaron menor actividad antioxidante, siendo las extracciones duales (agua/etanol) las que presentaron mayor actividad antioxidante ( $1.41 \pm 0.03$  a  $3.23 \pm 0.02$  g extracto seco\*g DPPH<sup>-1</sup>) seguido de las extracciones individuales y las extracciones secuenciales, las cuales presentaron una disminución de 69% y 73% respectivamente, en relación con la mayor actividad antioxidante obtenida. Lo cual indica que el uso de disolventes absolutos elevada polaridad y de baja polaridad en secuencia, disminuyen la actividad antioxidante de los fenoles simples extraídos, lo cual puede ser debido a la susceptibilidad de estos compuestos a la interacción con los disolventes utilizados en cada caso, donde la presencia de disolventes absolutos (etanol y agua) pueden provocar cambios de dimerización y glicosilación (Beelders *et al.*, 2014), mientras que la secuenciación de disolventes menos polares (hexano, acetona y metanol) genera cambios estructurales de tipo oxido reducción, metilación de grupos hidroxilos o del núcleo fenólico y metilación de grupos hidroxilos en posición orto, que afectan las propiedades antioxidantes de los fenoles simples presentes en los extractos (Dryhurst, 2015). Este comportamiento también se observó en los extractos hidroalcohólicos (agua/etanol) de las plantas *Zizyphus mauritiana*, *Baccharis dracunculifolia*, *Capparis spinosa* y *Eugenia uniflora*, donde la actividad antioxidante de los fenoles simples disminuyó hasta 41% en los extractos que se utilizó los disolventes absolutos respectivos y hasta 73% en los que se realizó extracciones secuenciales del metabolito (Koley *et al.*, 2016, Veiga *et al.*, 2017, Mansour *et al.*, 2016 y Garmus *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en los extractos de escapo de *Agave salmiana* son similares a lo reportado para otros Agaves, como *Agave lechuguilla* y *Agave americana* en un intervalo de 1.5 a 9 g DDPH/g de extracto (Morales-Luckie *et al.*, 2016 y Singh *et al.*, 2018), bajos en comparación a *Agave sisalana* (Santos *et al.*, 2015) con hasta 26% y superiores con respecto a los extractos de *Agave duranguensis* (Barriada-Bernal *et al.*, 2014) en 15%. Esta variabilidad de la actividad antioxidante dentro del mismo género *Agave*, puede deberse diversos factores entre los cuales se incluyen, la sección de la planta analizada, localización geográfica, tipo de extracción y disolvente utilizado, como se observo en la actividad antioxidante de las plantas *Merremia borneensis* y *Chenopodium murale*, donde se presentó una diferencia de actividad antioxidante de los extractos de los compuestos fenólicos simples de hasta 37% debido a los disolventes empleados y a la tierra de cultivo en la que se desarrollaron las plantas (Hossain *et al.*, 2015 y Abdel-Aziz *et al.*, 2014).

Respecto a otro tipo de plantas, la actividad antioxidante de los extractos de *Agave salmiana* supera la actividad antioxidante de una gran variedad de especies (*Semecarpus anacardium*, *Humulus lupulus*, *Curcuma longa* Linn, *Styrax* spp., *Apium graveolens* L., *Calamus scipionum* y *Raphanus sativus* L.) con hasta 18% (Daniel, 2016 y Asif, 2015), es similar a lo reportado para algunos cereales (sorgo, trigo y cebada; *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum* y *Hordeum vulgare* respectivamente) (Masisi *et al.*, 2016) y menor a las frutas tropicales como aguacate, piña, plátano, papaya, maracuyá, sandía y melón (*Persea americana*, *Ananas comosus*, *Musa paradisiaca*, *Carica papaya*, *Passiflora edulis*, *Citrullus lanatus* y *Cucumis melo*) con 31%, 94%, 71%, 45%, 55%, 37% y 42% respectivamente (Morais *et al.*, 2015).

El siguiente grupo de compuestos fenólicos, los taninos, al igual que los metabolitos que pertenecen a dicho grupo, el proceso de extracción y disolvente utilizado fueron factores determinantes en la actividad antioxidante de los extractos, mostrando una tendencia en el que la presencia de varios disolventes en la extracción produce un aumento en la actividad antioxidante en los extractos, como sigue, extracción secuencial > extracción dual 40/60 > extracción dual 50/50 > extracción dual 60/40 > extracto etanólico absoluto, indicando que los disolventes utilizados en los procesos extractivos en forma secuencial favorecen la actividad antioxidante en los taninos, lo cual puede ser debido a que, estos metabolitos al pertenecer al grupo de compuestos fenólicos y compartir estructuras como anillos de benceno y grupos

hidroxilados (Peřkal *et al.*, 2014), también presentan cambios conformacionales al interactuar con disolventes menos polares en alguna de las etapas secuenciales de la extracción donde se presenta un aumento en la actividad antioxidante al generarse compuestos más oxidados que presentan mayor actividad antioxidante a los compuestos originales (Nimse *et al.*, 2015).

En cuanto al efecto producido por el disolvente, los resultados indican que el contenido de agua en la extracción es inversamente proporcional a la actividad antioxidante en los extractos de taninos, siendo los extractos en los que se utilizó agua como primer disolvente o disolvente mayoritario los que presentaron menor actividad antioxidante con una disminución hasta 90%, respecto al valor más elevado en la determinación, indicando que los disolventes polares afectan la actividad antioxidante de estos metabolitos, debido a que los taninos en presencia de agua o etanol pueden sufrir cambios conformacionales en el número y posición de los grupos hidroxilo además de mecanismos de glicosilación, relacionada a la extracción de monosacáridos de polaridad similar al disolvente, lo cual disminuyó la actividad antioxidante en los taninos (Yokozawa *et al.*, 1998). Este comportamiento también se observó en los extractos de las plantas *Eugenia caryophyllus*, *Coriandrum sativum* L. y *Limnophila aromatica*, donde la actividad antioxidante disminuyó respecto al aumento de la polaridad del medio extractivo (Hemalatha *et al.*, 2016, Msaada *et al.*, 2017 y Do *et al.*, 2014).

Mientras que los extractos secuenciales en los que se utilizaron disolventes menos polares (hexano, acetona y metanol), presentaron mayor actividad antioxidante, lo cual puede ser debido a la presencia de taninos condensados, los cuales, a diferencia de los taninos hidrolizables, son fácilmente extraídos en medios menos polares (Mohammed *et al.*, 2014).

En comparación a otros Agaves, la actividad antioxidante de los taninos del escapo de *Agave salmiana*, es inferior a lo reportado para *Agave impressa* y *Agave ornithobroma* con hasta 37% (Ahumada-Santos *et al.*, 2013), lo cual puede ser debido a que los disolventes polares utilizados en las extracciones de dichos Agaves favorecieron la obtención de taninos hidrolizables que a diferencia de los taninos condensados presentes en el escapo de *Agave salmiana*, son fácilmente extraídos por disolventes polares y presentan mayor actividad antioxidante (Muhacir-Güzel *et al.*, 2014).

Por otro lado, la actividad antioxidante de los taninos de extractos del escapo de *Agave salmiana* en comparación a otras especies vegetales es inferior a lo reportado para extractos de las plantas

*Limonium delicatulum*, *Datura metel*, *Psychotria carthagenensis* y *Strychnos minor*, con 48%, 51%, 42% y 69% respectivamente (Medini *et al.*, 2014, Alabri *et al.*, 2014, Formagio *et al.*, 2014 y John *et al.*, 2015), superior a extractos de cereales de sorgo (*Sorghum bicolor*) y mijo (*Panicum miliaceum*), con hasta 38% (Rao *et al.*, 2018 y Shahidi *et al.*, 2015) e inferior con relación a extractos de las frutas de las plantas *Coriandrum sativum* L., *Ficus carica* y *Lepisanthes amoena*, con 76%, 65% y 82% respectivamente (Msaada *et al.*, 2017, Harzallah *et al.*, 2016 y Salusu *et al.*, 2017).

En cuanto a los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura (alcaloides y proteínas) los resultados de actividad antioxidante indican que este grupo presentó los valores más bajos con una disminución de hasta 98%, en comparación a lo reportado para los compuestos con mayor actividad antioxidante (flavonoides), siendo las proteínas los compuestos que mostraron menor actividad antioxidante respecto a los alcaloides en 88%. Indicando que aparentemente la presencia del nitrógeno en la estructura de las proteínas esta relacionada con la disminución de la actividad antioxidante en los extractos respectivos. Lo cual puede deberse a que la efectividad de la actividad antioxidante de las proteínas se basa principalmente al sinergismo con otros compuestos antioxidantes, bajo mecanismos de atrapamiento de las trazas metálicas que catalizan la oxidación, reacción con compuestos prooxidantes o regeneración de antioxidantes que ya habían sido oxidados (Nicklisch *et al.*, 2014), por ello la actividad antioxidante de estos metabolitos se ve disminuida al analizarlas de manera individual hasta 27% en comparación a los extractos en los que se encuentra combinado con otros metabolitos (ESC).

Por otro lado los resultados obtenidos en los extractos de proteína, a diferencia de los demás metabolitos analizados (fenoles, flavonoides y taninos) no presentaron un comportamiento que indicara relación entre el tipo de extracción o disolvente empleado y las propiedades antioxidantes del metabolito, aparentemente debido a interacciones inespecíficas (iónicas e hidrófobas) del grupo nitrogenado de las proteínas con los disolventes utilizados (Ma *et al.*, 2015), lo cual se corrobora en el aumento de la actividad antioxidante en el extracto que no se utilizo disolvente para la extracción (EC). Este mismo efecto se observo en los extractos peptídicos de las plantas *Emblica officinalis* L., *Curcuma longa* L. y *Leucas linifolia*, donde la actividad antioxidante fue similar entre extractos en lo que se utilizo diferentes disolventes

(etanol, metanol y acetona) y mayor hasta 27% en los extractos crudos (Scartezzini *et al.*, 2000 y Ramakrishna *et al.*, 2012).

En el género *Agave* existe muy poca información acerca de las propiedades antioxidantes de las proteínas presentes en la planta, lo cual podría ser debido a que estos realizan como función principal procesos metabólicos formando parte del conjunto enzimático de la planta (sacarosa:sacarosa fructosil-transferasa, 1,2- $\beta$ - fructano 1-fructosiltransferasa, aminopeptidasas y las metalotioneínas) (Bhatia *et al.*, 1955, Du *et al.*, 1978, Díaz-Tenorioa *et al.*, 2015, González-Cruz *et al.*, 2012, Srinivasan *et al.*, 1953) además de realizar funciones estructurales y de aporte energético (Jones *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado que estos metabolitos al tener un mayor contenido de grupos nitrogenados en comparación a otros compuestos bioactivos son reconocidos por otras propiedades bioactivas como inmunomoduladores, antimicrobianos y antihipertensivos (Sanjukta *et al.*, 2016).

En otras plantas, la actividad antioxidante esta limitada a metabolitos nitrogenados de bajo peso molecular como péptidos (500 a 1800 Da) o aminoácidos (70-200 Da), que tienen grupos azufrados (metionina y cisteína), aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) o anillo imidazol (histidina) en el primer caso y secuencias específicas de aminoácidos (valina o leucina en el amino terminal o prolina, histidina, tirosina, triptófano, metionina y cisteína en sus secuencias) en el segundo caso (e Silva *et al.*, 2017).

En comparación a lo reportado para el escapo de *Agave salmiana*, los extractos proteínicos de las plantas *Amaranthus hypochondriacus* y *Spirulina platensis*, superan la actividad antioxidante en 58% y 37% respectivamente (Delgado *et al.*, 2015 y Yu *et al.*, 2016), al igual que los extractos de las leguminosas como el garbanzo (*Cicer arietinum*) o caupí (*Vigna unguiculata*) con hasta 69% (Marques *et al.*, 2015 y Torres-Fuentes *et al.*, 2015), mientras que los extractos peptídicos de la papa (*Solanum tuberosum*) y el arroz (*Oryza sativa*) presentan 18% menos actividad antioxidante con relación a lo reportado en el presente trabajo (Zou *et al.*, 2016 y Wattanasiritham *et al.*, 2016).

Por su parte, los alcaloides, a diferencia de las proteínas, sí presentaron una relación entre la actividad antioxidante de los extractos en función al tipo de extracción y disolvente utilizado, donde se observó aumento en la actividad antioxidante de los extractos al utilizar varios disolventes en la extracción, siendo la extracción secuencial la que mostró la mayor actividad

antioxidante, seguido las extracciones duales agua/etanol y extracción acuosa individual, con una disminución de 82% y 84% respectivamente, indicando que el uso subsecuente de disolventes en la extracción aumenta las propiedades antioxidantes en los alcaloides, debido posiblemente a que, además de la obtención de alcaloides el uso de disolventes con un amplio rango de polaridades (0-9, hexano-agua respectivamente) en la extracción favoreció la formación de compuestos tipo pseudoalcaloides los cuales a diferencia de los alcaloides verdaderos (biosintetizado a partir de un aminoácido), se obtienen por transferencia de un grupo nitrógeno a un compuesto de origen terpenico, esteroide, monosacárido o a un ácido graso, los cuales pudieron extraerse en conjunto con los alcaloides por afinidad a alguna de las polaridades de los disolventes utilizados, que finalmente en conjunto tanto los alcaloides verdaderos y los pseudoalcaloides ejercieron un efecto sinérgico y aumentaron la actividad antioxidante en este extracto. Este comportamiento también se observó en los extractos secuenciales de alcaloides de las hojas de las plantas *Piper nigrum* L. y *Fumaria capreolata*, que presentaron mayor actividad antioxidante que los extractos en los que se utilizó los disolventes absolutos (Sruthi *et al.*, 2017 y Contreras *et al.*, 2017).

Por otra parte, el efecto producido por el tipo de disolvente utilizado, presentó un efecto donde se observó un incremento en la actividad antioxidante en los extractos en los que se utilizó disolventes menos polares, (ESC), mientras que los extractos duales (60/40, 50/50 y 40/60, agua/etanol) e individual acuoso disminuyeron su actividad antioxidante hasta 84%, respecto con el extracto secuencial, lo cual indica que polaridades elevadas en el medio extractivo afecta significativamente la actividad antioxidante de estos metabolitos. Lo cual puede ser debido a posibles enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas de los disolventes polares con el grupo nitrogenado de estos metabolitos, ejerciendo impedimento estérico del compuesto con los radicales oxidantes en las determinaciones de actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP), que provocaron la disminución de dicha propiedad (Sacconnay *et al.*, 2015). Este mismo efecto se reportó en los extractos acuosos y etanólicos de *Musa paradisiaca* y *Vetiveria zizanioides* Linn, los cuales presentaron hasta 76% menos actividad antioxidante en comparación a los extractos en los que se utilizó disolventes menos polares (acetona, acetato de etilo y hexano) (Maity *et al.*, 2016, Muthukrishnan *et al.*, 2018).

En el género *Agave*, la actividad antioxidante de los alcaloides es superior a lo obtenido en el presente trabajo, en las especies *Agave americana*, *Agave cupreata* y *Agave attenuata*, con 36%, 68% y 19%, respectivamente, mientras que los extractos de hojas del *Agave sisalana*, la actividad antioxidante es inferior en 13% (Singh *et al.*, 2018, Salazar-Pineda *et al.*, 2017, Hossain *et al.*, 2014 y Jajere *et al.*, 2016). Aparentemente al igual que en otros metabolitos (fenoles, flavonoides y taninos) esta variabilidad en el mismo género puede ser debido a factores como, sección de la planta analizada, localización geográfica de la planta, tipo de extracción y disolvente empleado que favorecen la obtención de cierto tipo de alcaloides, lo cuales en función a estos factores presentan diversas estructuras con afinidad a un amplio intervalo de polaridades.

En comparación a otras especies de planta, la actividad antioxidante de los alcaloides es similar entre las plantas *Peltophorum africanum*, *Zanthoxylum capense* y *Clausena anisata* consideradas con baja actividad antioxidante en un intervalo de 2 a 15 g extracto seco\*gDPPH<sup>-1</sup> bajo la técnica de DPPH (Adebayo *et al.*, 2015), inferior a los reportado para frutas como carambola (*Averrhoa carambola* L.) marolo (fruta de Brasil, *Annona crassiflora*) y el fruto cítrico de *Nitraria tangutorum*, en 57%, 72% y 48% respectivamente (Yang *et al.*, 2015, Pereira M. *et al.*, 2017 y Zhao *et al.*, 2017) y superior a algunos vegetales y cereales como calabaza (*Lagenaria siceraria*), pepino (*Cucumis sativus*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y trigo (*Triticum aestivum*), con hasta 23% (Yadav *et al.*, 2016 y Nayak *et al.*, 2015).

Por su parte, las saponinas presentaron una disminución de actividad antioxidante de 90%, con relación al compuesto de mayor actividad antioxidante (flavonoides), representado el cuarto grupo de compuestos bioactivos con mayor actividad antioxidante dentro de los metabolitos analizados (**Tabla 1.19**).

En los resultados obtenidos en los extractos de saponinas al igual que los demás metabolitos analizados, el tipo de extracción y disolvente utilizado permanecieron como factores determinantes en los resultados de actividad antioxidante, siendo los extractos individuales los que presentaron la mayor actividad antioxidante, mientras que los extractos secuenciales, seguido de los extractos duales mostraron los valores más bajos con una disminución de 61% y 53% respectivamente, en comparación al extracto con el valor más elevado en esta determinación. Indicando que el utilizar dos o más disolventes en la extracción disminuye la actividad antioxidante en las saponinas, lo cual puede ser debido a posibles cambios

estructurales de tipo metilación o glicosilación en el grupo que ejerce mayormente la actividad antioxidante en este metabolito (aglicona que podría ser un esteroide o terpeno) (Weng *et al.*, 2014), en alguna de las etapas secuenciales de la extracción. Este mismo efecto se observó en los extractos secuenciales de las plantas *Aralia taibaiensis* y *Bituminaria bituminosa*, las cuales mostraron una disminución de 49% y 31% respectivamente, en comparación a los extractos en los que no se utilizó una secuenciación de disolventes (Weng *et al.*, 2014 y Llorent-Martínez *et al.*, 2015).

En cuanto al efecto producido por el disolvente, se observó que el uso de disolventes en la extracción disminuyó la actividad antioxidante en las saponinas, siendo el extracto crudo el que presentó un aumento hasta de 61% en la actividad antioxidante con relación a los extractos en los que se utilizó disolvente en la extracción. Debido posiblemente a que en el extracto crudo al no utilizar disolvente extractor que favorezca la obtención de un solo tipo saponina, se tiene la presencia de ambos tipos, tanto la esterooidal como la triterpénica, las cuales presentan actividad antioxidante de manera individual y en conjunto podrían haber ejercido un efecto sinérgico que favoreció sus propiedades antioxidantes. Este comportamiento se reportó también en los extractos crudos de las hojas de *Agave salmiana* y *Agave atrovirens*, donde las saponinas presentaron un aumento en la actividad antioxidante hasta de 53%, en comparación a los extractos en los que se utilizó disolvente (Leal-Díaz *et al.*, 2016 y Olvera-García *et al.*, 2017).

También se observó que en los extractos en los que se utilizó disolventes, la actividad antioxidante de las saponinas aumentó 50% en medios polares (agua y etanol) y disminuyó 55% en los extractos en los que se utilizó disolventes menos polares (hexano, acetona y metanol), ambos respecto al valor más elevado de las extracciones con disolventes. Indicando que el uso de disolventes de diferente polaridad favorece la extracción de cierto tipo de saponinas, que en función a su grupo aglicona (terpeno o esteroide) presentan mayor o menor actividad antioxidante, siendo los extractos acuosos los que mostraron una mayor actividad antioxidante respecto a los extractos en los que se utilizó disolventes menos polares, al extraer favorablemente las saponinas tipo triterpenoide que a diferencia de los tipo esterooidal, son de naturaleza polar y presentan mayor actividad antioxidante (Junior *et al.*, 2016).

La actividad antioxidante de las saponinas del escapo floral de *Agave salmiana* es 12%, 8% y 17% menor a lo reportado para los extractos de hojas de *Agave salmiana*, *Agave lechuguilla* y

*Agave americana* (Puente-Garza *et al.*, 2018, Carmona *et al.*, 2017 y Singh *et al.*, 2018). Estas diferencias mínimas entre los Agaves podrían deberse a que posiblemente estas plantas comparten un contenido similar de saponinas tipo esterooidal al encontrado en el escapo de *Agave salmiana*.

En comparación a lo reportado para el escapo de *Agave salmiana*, los extractos de las plantas *Atriplex laciniata* L., *Solanum anguivi* y *Polygonum hydropiper* L., se encuentran por debajo de la actividad antioxidante de saponinas con 36%, 51% y 79% respectivamente (Kamal *et al.*, 2015, Elekofehinti, 2015 y Ayaz *et al.*, 2014). Mientras que al compararlo con extractos de algunos frutos de las plantas *Averrhoa carambola* L. y *Argania spinosa*, el valor es mayor con un 16% y 9% a los reportado en el presente trabajo (Khanam, Z. y Sam, K. *et al.*, 2015 y Khallouki *et al.*, 2017).

**Tabla 1.19** Determinación de actividad antioxidante de compuestos bioactivos de extractos de escapo floral de *Agave salmiana*

	Compuestos bioactivos					
	Fenólicos	Flavonoides	Taninos	Grupos con Nitrogeno	Saponinas	
	Fenoles simples			Alcaloides	Proteínas	Terpenos y otros
	Actividad antioxidante					
Extracto	CE <sub>50</sub> (g extracto seco*g DPPH <sup>-1</sup> )					
EC	4.68 <sup>b</sup> B ± 0.06	2.07 <sup>d</sup> C ± 0.07	3.66 <sup>c</sup> D ± 0.04	n.d	9.67 <sup>a</sup> H ± 0.02	1.43 <sup>e</sup> F ± 0.04
EA	3.80 <sup>d</sup> D ± 0.10	0.94 <sup>f</sup> D ± 0.04	6.03 <sup>c</sup> A ± 0.09	10.32 <sup>b</sup> A ± 0.05	11.30 <sup>a</sup> E ± 0.04	1.66 <sup>e</sup> E ± 0.03
EE	4.03 <sup>b</sup> C ± 0.06	3.43 <sup>d</sup> A ± 0.04	3.89 <sup>c</sup> C ± 0.04	n.d	14.19 <sup>a</sup> A ± 0.03	n.d
ED60/40	1.41 <sup>e</sup> G ± 0.03	0.53 <sup>f</sup> E ± 0.04	3.51 <sup>c</sup> E ± 0.04	9.00 <sup>b</sup> B ± 0.03	11.02 <sup>a</sup> F ± 0.02	1.73 <sup>d</sup> D ± 0.04
ED50/50	2.13 <sup>c</sup> F ± 0.04	0.42 <sup>f</sup> F ± 0.04	2.74 <sup>d</sup> F ± 0.06	5.19 <sup>b</sup> C ± 0.07	10.09 <sup>a</sup> G ± 0.04	2.98 <sup>c</sup> C ± 0.04
ED40/60	3.23 <sup>b</sup> E ± 0.02	2.24 <sup>c</sup> B ± 0.05	1.67 <sup>d</sup> G ± 0.05	3.38 <sup>b</sup> D ± 0.05	12.33 <sup>a</sup> C ± 0.03	n.d
EDSEA	3.77 <sup>c</sup> D ± 0.03	0.22 <sup>e</sup> G ± 0.02	5.50 <sup>b</sup> B ± 0.04	n.d	12.62 <sup>a</sup> B ± 0.04	3.34 <sup>d</sup> B ± 0.03
ESC	5.24 <sup>b</sup> A ± 0.06	0.23 <sup>f</sup> G ± 0.03	0.57 <sup>e</sup> H ± 0.04	1.60 <sup>d</sup> E ± 0.0	12.02 <sup>a</sup> D ± 0.04	3.70 <sup>c</sup> A ± 0.03

\*Tomado del extracto total. Prueba de Tukey. n.d-compuesto bioactivo no detectado.

Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna y diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0,05$

EC-extracto crudo, EA-extracto individual acuoso, EE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50),

ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

Continuación de tabla 1.19

Extracto	Compuestos bioactivos						
	Fenólicos		Grupos con N		Saponinas		Actividad antioxidante
	Fenoles simples	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Proteínas	Terpenos y otros	
	<b>FRAP (μmol TE*<i>g</i> de extracto<sup>-1</sup>)</b>						
EC	880.89 <sup>c,G</sup> ± 1.69	1121.95 <sup>b,E</sup> ± 1.41	975.66 <sup>d,E</sup> ± 2.00	n.d	530.71 <sup>e,A</sup> ± 1.31	1181.38 <sup>a,A</sup> ± 1.41	
EA	962.10 <sup>c,E</sup> ± 1.32	1226.33 <sup>a,D</sup> ± 1.26	757.14 <sup>d,H</sup> ± 1.18	362.53 <sup>f,E</sup> ± 1.69	493.50 <sup>e,D</sup> ± 1.18	1159.68 <sup>b,B</sup> ± 1.77	
EE	941.31 <sup>c,F</sup> ± 1.69	997.66 <sup>a,G</sup> ± 2.12	955.64 <sup>b,F</sup> ± 1.57	n.d	425.82 <sup>d,H</sup> ± 1.34	n.d	
ED60/40	1180.69 <sup>b,A</sup> ± 1.99	1264.73 <sup>a,C</sup> ± 1.57	990.59 <sup>d,D</sup> ± 1.77	484.73 <sup>f,D</sup> ± 1.57	500.69 <sup>e,C</sup> ± 1.77	1153.01 <sup>c,B</sup> ± 1.32	
ED50/50	1117.45 <sup>b,B</sup> ± 1.57	1273.21 <sup>a,B</sup> ± 2.73	1059.88 <sup>c,C</sup> ± 2.23	835.64 <sup>e,C</sup> ± 1.57	521.29 <sup>f,B</sup> ± 1.09	1038.79 <sup>d,C</sup> ± 1.31	
ED40/60	1016.23 <sup>c,C</sup> ± 3.34	1105.33 <sup>b,F</sup> ± 2.57	1158.67 <sup>a,B</sup> ± 1.29	1001.70 <sup>d,B</sup> ± 2.23	468.77 <sup>c,F</sup> ± 1.21	n.d	
EDSEA	965.54 <sup>c,D</sup> ± 2.06	1291.60 <sup>a,A</sup> ± 1.52	804.32 <sup>d,G</sup> ± 1.21	n.d	463.52 <sup>e,G</sup> ± 1.29	1004.73 <sup>b,D</sup> ± 1.57	
ESC	829.58 <sup>c,H</sup> ± 1.29	1292.61 <sup>a,A</sup> ± 1.29	1261.90 <sup>b,A</sup> ± 2.25	1166.34 <sup>c,A</sup> ± 2.79	477.45 <sup>f,E</sup> ± 1.29	972.40 <sup>d,E</sup> ± 1.77	

\*Tomado del extracto total. Prueba de Tukey. n.d-compuesto bioactivo no detectado.

Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna y diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

EC-extracto crudo, EA-extracto individual acuoso, EE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

Continuación de tabla 1.19

Extracto	Compuestos bioactivos						
	Fenólicos		Grupos con N			Saponinas	
	Fenoles simples	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Proteínas	Terpenos y otros	
	Actividad antioxidante						
	<b>ABTS (µmol TE* g extracto seco<sup>-1</sup>)</b>						
EC	659.83 <sup>dG</sup> ± 1.24	839.85 <sup>bE</sup> ± 1.44	729.98 <sup>cE</sup> ± 0.67	n.d	398.89 <sup>cA</sup> ± 1.34	883.18 <sup>aA</sup> ± 1.02	
EA	720.21 <sup>cE</sup> ± 1.06	917.97 <sup>aD</sup> ± 1.18	566.90 <sup>dH</sup> ± 1.13	271.84 <sup>fE</sup> ± 0.84	370.61 <sup>cD</sup> ± 1.52	867.58 <sup>bB</sup> ± 1.34	
EE	704.39 <sup>cF</sup> ± 0.89	747.04 <sup>aG</sup> ± 1.34	714.71 <sup>bF</sup> ± 1.52	n.d	318.98 <sup>dH</sup> ± 1.28	n.d	
ED60/40	883.51 <sup>bA</sup> ± 1.50	947.26 <sup>aC</sup> ± 0.79	740.42 <sup>dD</sup> ± 1.38	363.98 <sup>fD</sup> ± 0.89	375.54 <sup>cC</sup> ± 1.92	862.41 <sup>cC</sup> ± 0.94	
ED50/50	835.70 <sup>bB</sup> ± 1.25	952.87 <sup>aB</sup> ± 1.14	793.95 <sup>cC</sup> ± 1.06	625.60 <sup>cC</sup> ± 1.14	389.24 <sup>fB</sup> ± 1.14	778.24 <sup>dD</sup> ± 1.14	
ED40/60	760.06 <sup>cC</sup> ± 1.61	826.27 <sup>bF</sup> ± 0.79	865.89 <sup>aB</sup> ± 1.01	749.06 <sup>dB</sup> ± 0.71	350.97 <sup>cF</sup> ± 1.35	n.d	
EDSEA	723.58 <sup>cD</sup> ± 1.25	967.91 <sup>aA</sup> ± 1.24	602.03 <sup>dG</sup> ± 2.50	n.d	347.49 <sup>eG</sup> ± 1.18	751.19 <sup>bE</sup> ± 0.98	
ESC	620.33 <sup>eH</sup> ± 1.81	967.13 <sup>aA</sup> ± 1.83	943.33 <sup>bA</sup> ± 1.52	871.50 <sup>cA</sup> ± 0.94	357.47 <sup>fE</sup> ± 2.14	728.86 <sup>dF</sup> ± 1.34	

\*Tomado del extracto total. Prueba de Tukey. n.d-compuesto bioactivo no detectado.

Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna y diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

EC-extracto crudo, EA-extracto individual acuoso, EE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

### 3.6 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antimicrobiana en los extractos

Los resultados indican que solo el 38% de los extractos analizados presentan actividad antimicrobiana contra uno de los microorganismos patógenos utilizados para el análisis. Siendo las extracciones individuales con agua y etanol (EIA y EIE) los que mostraron actividad contra *Escherichia coli*, mientras que el extracto crudo (EC) mostró actividad contra *Shigella sonnei* (**Tabla 1.20**), lo que indica que los disolventes polares y la extracción individual son las condiciones más adecuadas para la obtención de los compuestos antimicrobianos presentes en el escapo floral de *Agave salmiana*.

En este análisis resultó evidente un efecto producido por el tipo de proceso de extracción, debido a que se observan cambios significativos entre los extractos obtenidos con el mismo disolvente bajo procedimientos extractivos distintos (**Tabla 1.20**). Por ejemplo, tanto los extractos EIA como EIE presentan inhibición contra el mismo microorganismo, sin embargo, los extractos obtenidos por combinación de agua/etanol (ED60/40, ED50/50 y ED40/60) no mostraron efecto sobre algún microorganismo. Este comportamiento podría deberse a la contribución de los compuestos presentes en los extractos agua/etanol, siendo los taninos y los alcaloides los metabolitos que presentaron un aumento en 98% y 99% respectivamente, con relación a los extractos individuales (EIA y EIE), presentando aparentemente un efecto antagónico sobre los demás compuestos presentes en el extracto (fenoles, flavonoides y saponinas) (**Tabla 1.17**). Este efecto es semejante al reportado para los extractos hidroalcohólicos (agua/etanol) de las plantas *Punica granatum* L. y *Apium graveolens*, los cuales no presentaron inhibición contra *Escherichia coli* en comparación a sus extractos absolutos respectivos (Pagliarulo *et al.*, 2016 y Sarshar *et al.*, 2018).

Por otra parte, los extractos que fueron obtenidos utilizando métodos secuenciales, ya sea dual o de polaridad creciente, no presentaron actividad antimicrobiana, lo cual podría ser indicio que existe un efecto antagónico entre los disolventes, esto concuerda con lo observado en la contribución de los metabolitos presentes en estos extractos, donde los flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas presentan un aumento de 73%, 95%, 94%, y 52% respectivamente a los extractos individuales (EIA y EIE) (**Tabla 1.17**), los cuales de manera similar que en los extractos hidroalcohólicos (agua/etanol) posiblemente ejercieron un efecto antagónico en la

actividad antimicrobiana del extracto. Este comportamiento también se reportó en los extractos de las plantas of *Paganum harmala*, *Embothrium coccineum* y *Piper nigrum* L., donde el proceso secuencial de extracción disminuyó las propiedades antimicrobianas de los extractos respecto al proceso en los que se utilizó los disolventes de forma individual (Afzal *et al.*, 2014, Leyton *et al.*, 2015 y Sruthi *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que los resultados obtenidos no tienen correlación con los compuestos antioxidantes presentes en el escapo, lo cual concuerda con lo reportado en los extractos de las hojas de las plantas *Arisaema jacquemontii*, *Atrocarpus altilis*, *Chenopodium murale* y *Myrtus communis* L., debido posiblemente al tipo y contenido de compuestos bioactivos presentes en los extractos de las plantas, los cuales pueden ejercer un efecto antagónico o sinérgico en función a la contribución que presenten en la planta, donde un mayor contenido de compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoide y taninos) y alcaloides, favorecen la efectividad de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas en plantas (Baba *et al.*, 2015, Ravichandran *et al.*, 2016, Abdel-Aziz *et al.*, 2014 y Aleksic *et al.*, 2014).

Respecto a otros Agaves, los resultados del escapo de *Agave salmiana* no presentaron inhibición contra *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en comparación a lo reportado para *Agave sisalana*, *Agave americana* y *Agave lechuguilla* (Ade-Ajayi *et al.*, 2011, Vega-Menchaca *et al.*, 2013 y Verástegui *et al.*, 2008) respectivamente, debido posiblemente a un efecto antagónico de alguno de los compuestos presentes en el escapo de *Agave salmiana*, siendo los compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y taninos) los metabolitos que minimizan las propiedades antimicrobianas de los alcaloides y saponinas al presentar una mayor contribución de hasta 99%, 95% y 97% respectivamente, cuando los alcaloides y las saponinas son los metabolitos que presentan mayor actividad antimicrobiana respecto a los fenoles por la presencia de estructuras nitrogenadas y grupos monosacáridos respectivamente, que a diferencia de los grupos hidroxilo de los fenoles, ejercen mayor espectro de acción contra bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) y bacterias gram negativas (*Staphylococcus aureus*) (Karou *et al.*, 2006).

En comparación a otras especies vegetales, la actividad antimicrobiana de los extractos de *Agave salmiana* es similar a lo reportado para *Withania somnifera* y *Melissa officinalis* L., donde el tipo de extracción utilizada semeja las condiciones realizadas en el presente trabajo (Mehrotra

*et al.*, 2017 y Skotti *et al.*, 2014), mientras que en comparación a especies como *Thymus vulgaris*, *Amomum kerervanh*, *Origanum syriacum* L. y *Syzygium aromaticum* L. el espectro de acción es inferior, debido posiblemente al tipo de compuestos presentes en estas plantas, siendo en mayoría aceites esenciales extraídos de las flores y semillas, los cuales presentan un mayor espectro de acción al inhibir bacterias y hongos bajo mecanismos relacionados en la interacción con las proteínas de la membrana del microorganismo provocando inestabilidad en la estructura y lisando la célula (Akthar *et al.*, 2014 y Al-Mariri *et al.*, 2014).

**Tabla 1.20** Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

Extracto	Microorganismos				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
EC	-	-	+	-	-
EIA	+	-	-	-	-
EIE	+	-	-	-	-
ED60/40	-	-	-	-	-
ED50/50	-	-	-	-	-
ED40/60	-	-	-	-	-
EDSEA	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-

+, indica que la muestra generó inhibición y -, indica que la muestra no generó inhibición contra los microorganismos en cuestión. Los valores se expresan como la media del triplicado de los análisis. EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

### 3.7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos

En los resultados se observó un efecto producido por el tipo de extracción y disolventes utilizados (**Tabla 1.21**), donde los extractos obtenidos por extracción individual además del extracto crudo, fueron los que presentaron inhibición, mientras que los procesos duales y secuenciales anularon la actividad antimicrobiana del extracto, indicando que estos procedimientos de extracción afectan la actividad antimicrobiana del extracto, lo cual puede ser debido a posibles cambios estructurales en los compuestos, producidos por reacciones de óxido-reducción, metilación o glicosilación al interactuar con los disolventes durante el proceso, que modifica la interacción con el microorganismo en cuestión así como a efectos antagónicos donde una mayor contribución de algunos de los compuestos presentes en el extracto minimizan y en este caso anulan la propiedades antimicrobianas de los compuestos presentes en menor cantidad.

Este comportamiento también se observó en el extracto acuoso de la planta *Zingiber officinale* y extracto etanólico de la planta *Psidium guajava*, donde al utilizar en cada caso un proceso de extracción combinado de disolventes (agua/etanol) impidió la inhibición contra *Salmonella typhi* y *Acinetobacter baumannii* respectivamente (Valle *et al.*, 2015 y Ekwenye *et al.*, 2005).

Por otro lado la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos obtenidos de la extracción individual con agua o etanol, mostraron inhibir al mismo microorganismo (*Escherichia coli*), sin embargo, al usar etanol como único disolvente, se requiere mayor concentración del extracto para llevar a cabo la inhibición del microorganismo, indicando que el etanol afecta la actividad antimicrobiana del extracto, debido a que este disolvente a diferencia del agua no extrae alcaloides y saponinas, los cuales aparentemente en el extracto acuoso ejercen un efecto sinérgico con los demás metabolitos presentes en el escapo (fenoles, flavonoides y taninos) aumentando la actividad antimicrobiana en 34% con respecto al extracto etanólico y la ausencia o menor contribución de alguno de estos metabolitos se vió reflejada en la disminución de la actividad antimicrobiana en el extracto etanólico al requerir un mayor CMI del extracto contra un mismo microorganismo, lo que sugiere que los alcaloides y saponinas son los principales compuestos presentes en el escapo de *Agave salmiana* que favorecen las propiedades antimicrobianas de los extractos acuosos al interactuar de manera sinérgica con otros metabolitos. Mientras que el extracto crudo presentó inhibición contra *Shigella sonnei* con un CMI similar al reportado para el extracto acuoso contra *Escherichia coli* (**Tabla 1.21**).

También se observó que las bacterias gram negativas (*Shigella sonnei* y *Escherichia coli*) presentaron mayor sensibilidad ante los extractos analizados en comparación a las bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*), siendo los extractos acuoso, etanólico y crudo los que lograron inhibir a *Escherichia coli* y *Shigella sonnei* respectivamente, indicando que estos microorganismos son sensibles a los compuestos extraídos por dichos extractos, siendo los fenoles simples el grupo de compuestos que presenta la mayor contribución con hasta 98%, con respecto a los demás metabolitos presentes en los extractos. De tal manera puede decirse, que los fenoles simples son los metabolitos que ejercen principalmente la actividad antimicrobiana contra las bacterias gram negativas en dichos extractos.

Por otra parte, es importante mencionar que, del grupo de las bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium*), *Escherichia coli* y *Shigella*

*sonnei* fueron los microorganismos que presentaron inhibición a los extractos analizados, mientras que *Salmonella typhimurium* no fue inhibida por ningún extracto, lo cual puede ser debido a que *Escherichia coli* y *Shigella sonnei* comparten una similitud en su ADN de hasta 75%, que las hacen vulnerables ante mecanismos de acción similares de los compuestos presentes en dichos extractos, no siendo así en la bacteria *Salmonella typhimurium* que no comparte esta característica (Hazen *et al.*, 2016).

En comparación a otros Agaves, los resultados obtenidos en el escapo de *Agave salmiana* presentan mayor actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* que lo reportado para los extractos etanólicos de *Agave lechuguilla* y extracto acuoso de *Agave sisalana* con una diferencia de hasta 25% y 47% respectivamente (Verástegui *et al.*, 1996 y Santos *et al.*, 2009), indicando que el escapo de *Agave salmiana* es una fuente importante de compuestos antimicrobianos entre el género Agave. Mientras que, en comparación a otras plantas, la actividad antimicrobiana contra *Shigella sonnei* del presente trabajo es inferior a lo reportado para los extractos crudos de las plantas *Diospyros peregrina*, *Coccinia grandis* y *Swietenia macrophylla*, en 36%, 68% y 51% respectivamente (Dewanjee *et al.*, 2007), observándose un comportamiento similar en la inhibición de *Escherichia coli*, donde la cantidad de extracto necesario para inhibir dicho microorganismo es menor en el extracto acuoso de la planta *Punica granatum* y extracto etanólico de la planta *Landolphia owerrience*, en 66% y 74% respectivamente, en comparación a lo reportado en el presente trabajo (Voravuthikunchai *et al.*, 2004 y Okeke *et al.*, 2001), esta diferencia en la actividad antimicrobiana podría ser debido a que dichas plantas presentan adicionalmente a los compuestos fenólicos, saponinas y alcaloides, algunos aceites esenciales, terpenos y sulfóxidos, los cuales aparentemente ejercieron un efecto sinérgico con los demás metabolitos presentes, provocando un aumento en la actividad antimicrobiana en las plantas mencionadas, al requerir menor cantidad de extracto para inhibir el microorganismo en cuestión en comparación a los extractos del escapo de *Agave salmiana* (Knezevic *et al.*, 2016).

De acuerdo a la clasificación de bacterias en función a su sensibilidad antimicrobiana reportada por Cruz-Carillo *et al.* (2010), donde clasifica una cepa bacteriana como sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12.5 mg/ml, de mediana sensibilidad antimicrobiana, entre 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad antimicrobiana cuando la CMI

está entre 50 a 100 mg/mL, se tiene que *Escherichia coli* y *Shigella sonnei* presentan elevada sensibilidad antimicrobiana por los extractos acuoso y crudo con un CMI de  $10.42 \pm 1.12$  mg\*mL<sup>-1</sup> y  $10.23 \pm 1.36$  mg\*mL<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que el extracto etanólico mostró un moderado espectro de acción al inhibir *Escherichia coli* con mayor CMI respecto al extracto acuoso (**Tabla 1.21**).

**Tabla 1.21** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

Extracto	Microorganismo	CMI (mg*mL <sup>-1</sup> )
EC	<i>Shigella sonnei</i>	$10.23^b \pm 1.36$
EIA	<i>Escherichia coli</i>	$10.42^b \pm 1.12$
EIE	<i>Escherichia coli</i>	$15.63^a \pm 0.86$

Los valores se expresan como la media  $\pm$  D.S del triplicado de los análisis a un  $p=0.05$   
 EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico,

### 3.8 Efecto de los disolventes y método de extracción sobre la actividad antimicrobiana en los compuestos bioactivos

Los resultados obtenidos indican que no existe un efecto observable por el tipo de extracción o disolvente utilizado sobre la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos analizados, sin embargo se observó que los flavonoides inhibieron en mayor cantidad con hasta 64% en relación con los extractos de fenoles simples, taninos, alcaloides, saponinas y proteínas, siendo los extractos de saponinas los que presentaron menor espectro de acción inhibitorio, indicando que los flavonoides independientemente del tipo de extracción o disolvente utilizado presentan un mayor espectro de acción al inhibir diversas bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* y *Listeria monocytogenes*) (**Tabla 1.22**).

Este comportamiento en los flavonoides, se debe a que estos compuestos a diferencia de otros metabolitos (fenoles simples, taninos, alcaloides, saponinas y proteínas), presentan una dualidad en su conformación estructural que los hace eficaces contra una amplia gama de microorganismos, siendo la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B de la estructura del metabolito, los que interaccionan fácilmente con los fosfolípidos y proteínas solubles de la membrana plasmática de las bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei*), mientras que la presencia del grupo metoxilo, aumenta la lipofilia (afinidad por grasas y lípidos de alta solubilidad) del compuesto, favoreciendo interacciones con las proteínas presentes en la pared celular de las bacterias gram positivas

(*Listeria monocytogenes*) (Cushnie *et al.*, 2005). Dicho efecto también se observó en los extractos de la fruta de la planta *Trigonostadium brachytaenium*, donde los flavonoides presentaron inhibición contra 6 bacterias (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) y contra tres hongos (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*), en comparación a los fenoles, alcaloides y saponinas que lograron inhibir solo un microorganismo (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, respectivamente) (Akhavan *et al.*, 2015, Kabesh *et al.*, 2015 y Jasim *et al.*, 2015).

Por otro lado, se observó un aumento del 50% en el espectro de acción de los extractos de los metabolitos en comparación a los extractos que contienen los metabolitos en forma conjunta (EC, EIA y EIE), al inhibir las 4 bacterias de prueba, lo cual podría deberse a varios factores, en los que se destaca un efecto de concentración de los compuestos bioactivos al analizarlos en forma aislada que permite mayor espectro de acción inhibitorio de estos contra las bacterias patógenas al interactuar con mayor especificidad bajo mecanismos propios de cada metabolito (Paz *et al.*, 2015); y por otra parte a efectos antagónicos producidos en los extractos que tienen el aglomerado de compuestos bioactivos, relacionado a una mayor contribución de alguno de los compuestos bioactivos que minimiza las propiedades antimicrobianas de los compuestos que presentan menor cantidad dentro del extracto en cuestión (Valle *et al.*, 2015).

De las bacterias analizadas, *Listeria monocytogenes* presentó mayor sensibilidad antimicrobiana ante los extractos analizados hasta en 31% en comparación a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei*, lo cual podría deberse a que *Listeria monocytogenes* presenta una estructura celular distinta al resto de las bacterias analizadas, la cual consiste en una capa peptidoglicano con proteínas y polisacáridos expuestos en la parte externa que aparentemente interactuaron con mayor facilidad con los metabolitos extraídos del escapo de *Agave salmiana*, siendo el grupo de compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y taninos), los metabolitos que mostraron mayor contribución y mayor espectro de acción inhibitorio con respecto a las saponinas y alcaloides (Belhadj *et al.*, 2016). De tal manera puede decirse que, los compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y taninos) son el principal grupo de metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana tanto de las bacterias gram positivas

como de las gram negativas analizadas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* y *Listeria monocytogenes*).

Hasta el momento el estudio de la actividad antimicrobiana del grupo de compuestos extraídos en el género *Agave* es limitado al análisis por extracto en conjunto, sin embargo en comparación a otras plantas se tiene que los compuestos fenólicos de los extractos de la planta *Filipendula ulmaria*, *Epilobium angustifolium* L., *Rubus chamaemorus* L. y *Rubus idaeus* L. presentaron un espectro de acción inhibitorio contra *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Listeria monocytogenes* similar a lo reportado en el presente trabajo (Rauha *et al.*, 2000); mientras que la actividad antimicrobiana de las saponinas obtenidas a partir de las plantas *Quillaja saponaria* y *Pulsatilla chinensis*, difieren de lo obtenido en el escapo de *Agave salmiana* al presentar mayor espectro de acción (de hasta 45%) contra *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium* respectivamente (Sewlikar *et al.*, 2017 y Fong *et al.*, 2016), siendo los alcaloides extraídos de las plantas *Crinum angustum* y *Toddalia asiatica*, los metabolitos que superaron lo reportado para los alcaloides del escapo de *Agave salmiana* al exhibir mayor espectro de acción al inhibir tanto bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans*) como hongos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*) (Iannello *et al.*, 2014 y Hu *et al.*, 2014). Esta variabilidad en los resultados podría ser debido a un diferente contenido de compuestos bioactivos en los extractos, a diversas conformaciones de los compuestos presentes en las plantas producidos por el tipo de extracción o disolvente utilizado y a posibles efectos sinérgicos o antagónicos atribuidos a una mayor contribución de alguno de los compuestos presentes en las especies vegetales mencionadas.

**Tabla 1.22** Determinación de la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos presentes en los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

		Compuestos bioactivos																	
		Microorganismos de prueba																	
Extracto	<i>Escherichia coli</i>				<i>Salmonella typhimurium</i>				<i>Shigella sonnei</i>				<i>Listeria monocytogenes</i>						
	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Proteínas	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Proteínas	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Proteínas	
EC	-	+	+	n.d	-	+	-	n.d	-	+	+	n.d	-	+	+	+	n.d	-	+
EA	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
EE	+	+	-	n.d	n.d	-	+	+	+	n.d	n.d	-	+	-	+	n.d	n.d	-	+
ED60/40	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ED50/50	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ED40/60	+	+	-	+	n.d	-	+	+	n.d	+	-	-	+	+	+	+	+	n.d	-
EDSEA	+	+	-	n.d	-	-	+	+	n.d	-	+	+	+	-	+	n.d	+	+	+
ESC	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, indica que la muestra generó inhibición y - indica que la muestra no generó inhibición contra los microorganismos en cuestión. n.d-compuesto bioactivo no detectado.  
 Los valores se expresan como la media del triplicado de los análisis.  
 EC-extracto crudo, EIA-extracto individual acuoso, EIE-extracto individual etanólico. ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua. ESC-extracto secuencial combinado.

### 3.9 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos bioactivos

Los resultados obtenidos en la CMI de los compuestos bioactivos analizados (fenoles simples, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas y proteínas) indican que no existe un efecto por el tipo de extracción o disolvente utilizado sobre la actividad antimicrobiana de estos metabolitos, sin embargo se observa que la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos probados es influenciada por los mecanismos de acción inhibitorios específicos de cada tipo de compuesto extraído. Siendo la posición y número de grupos OH presentes en los fenoles simples lo que favoreció la inhibición de *Salmonella typhimurium* con  $20.82 \pm 1.59 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Nitiema *et al.*, 2012), *Escherichia coli* fue más sensible a los flavonoides con  $30.69 \pm 1.64 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  por la presencia del grupo metoxilo que favorece las interacciones con las proteínas y polisacáridos presentes en la pared celular de este tipo de bacterias (Cushnie *et al.*, 2005), el grupo nitrogenado característico de los alcaloides que interacciona con el ADN de las bacterias, favoreció la inhibición de *Shigella sonnei* y *Listeria monocytogenes* con  $2.17 \pm 0.54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  y  $6.67 \pm 0.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectivamente (Abdallah *et al.*, 2018), y las proteínas presentaron menor la actividad antimicrobiana, con los valores más elevados de CMI, con una disminución de hasta 96%, en comparación a los compuestos que mostraron mayor actividad antimicrobiana independientemente de microorganismo analizado, lo cual pudo ser debido a la inactivación de este metabolito al ser sometido a elevadas temperaturas durante la extracción (**Tabla 1.23**).

Por otro lado *Listeria monocytogenes* presento los valores más bajos de CMI en un intervalo de  $6.67 \pm 0.35$  y  $62.68 \pm 0.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (**Tabla 1.23**), lo cual indica que este microorganismo exhibe mayor sensibilidad antimicrobiana ante los extractos analizados en comparación a *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium* con una diferencia de hasta 87%. Lo cual puede ser debido a que *Listeria monocytogenes* a diferencia de *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium* presenta una capa de peptidoglicano que le confiere otras formas de interacción con los compuestos de prueba (Belhadj *et al.*, 2016), siendo los alcaloides y los flavonoides los compuestos que inhibieron con mayor eficacia a *Listeria monocytógenes* al presentar los valores más bajos de CMI en comparación a los fenoles simples, taninos, saponinas y proteínas con una diferencia hasta de 89%. Este comportamiento también se observo en los extractos de la planta *Sida acuta*, *Schima wallichii*, *Phlogocanthus thyrsoiflorus*

donde los alcaloides presentaron menor CMI contra *Listeria monocytogenes* en comparación a los fenoles o saponinas (Karou *et al.*, 2006 y Sarbadhikary *et al.*, 2015).

También es importante mencionar que se observó un contraste en los resultados de actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de los compuestos analizados en función al tipo de extracción o disolventes utilizados, los cuales fueron factores determinantes en la eficacia antioxidante de los metabolitos extraídos e intransendentes en la actividad antimicrobiana de dichos metabolitos. Lo cual puede ser debido a que dichos factores al provocar modificaciones en la estructura del compuesto por cambios en la electronegatividad, cambios de óxido-reducción y cambios conformacionales de tipo metilación o glicolización, afectan en mayor grado las propiedades antioxidantes de los compuestos (Weng *et al.*, 2014), mientras que las propiedades antimicrobianas de los extractos se relacionan mayormente al tipo de estructura celular del microorganismo en cuestión, en el cual se pueden presentar compuestos de diversa estructura con base en la serología y virulencia bacteriana que influye en la sensibilidad antimicrobiana ante cierto compuesto antibacteriano y en menor grado a la interacción de los grupos bioactivos con los compuestos hidrofílicos (proteínas globulares, monosacáridos, fosfolípidos) y lipofílicos (proteínas, lipoproteínas, esteroides) presentes en el entorno celular (Chen *et al.*, 2016 y Cushnie *et al.*, 2005).

En el mismo contexto, también se observó que la actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de los extractos analizados es influenciada por la disponibilidad de los compuestos bioactivos, siendo EC, EIA y EIE donde los compuestos se encuentran en conjunto, los extractos que mostraron menor actividad antioxidante con una disminución de hasta 97% y mayor actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* con hasta 66%, en comparación a los extractos de los metabolitos, debido posiblemente a efectos antagónicos y sinérgicos respectivamente, relacionado en ambos casos a una mayor contribución de los compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y taninos) de hasta 99%, 95% y 97% respectivamente en comparación los alcaloides y saponinas; mientras en comparación a los extractos EC, EIA y EIE, los extractos de fenoles simples, flavonoides, taninos, alcaloides, proteínas y saponinas presentaron mayor espectro de acción al inhibir las 4 bacterias de prueba *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* y *Listeria monocytogenes*, sin embargo los valores de CMI de los metabolitos fueron menores con una disminución de hasta 83%, debido posiblemente a una compensación

de estos metabolitos al efecto sinérgico producido por el alomerado de compuestos en los extractos EC, EIA y EIE, viéndose aumentada la cantidad de extracto necesario para inhibir el microorganismo en cuestión (Baba *et al.*, 2015), solo a excepción de los alcaloides, los cuales presentaron una disminución en la CMI de hasta 78% y 21% contra *Shigella sonnei* y *Listeria monocytogenes* respectivamente, indicando que estos últimos metabolitos aumentan su actividad antimicrobiana al ser concentrados (alcaloides).

De tal manera se puede decir que, el extraer los compuestos en conjunto (EC, EIA y EIE) favorece la inhibición contra *Escherichia coli* y afecta las propiedades antioxidantes en el extracto, mientras que los extractos individuales de los alcaloides inhiben con mayor eficacia a *Listeria monocytogenes* y *Shigella sonnei* respectivamente.

Por otro lado de acuerdo a la clasificación de bacterias en función a su sensibilidad antimicrobiana ante un compuesto antimicrobiano reportada por Cruz-Carillo *et al.* (2010), donde clasifica una cepa bacteriana como sensible, de mediana sensibilidad antimicrobiana y de baja sensibilidad antimicrobiana cuando la CMI es inferior a 12.5 mg/ml, entre 12.5 y 50 mg/mL y entre 50 a 100 mg/mL respectivamente, se tiene que de manera general ante los extractos analizados, *Escherichia coli* presenta baja sensibilidad antimicrobiana, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei* mostraron moderada sensibilidad antimicrobiana y *Listeria monocytógenes* es una bacteria sensible.

**Tabla 1.23** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos bioactivos presentes en los extractos del escapo floral de *Agave salmiana*

Extracto	Compuestos bioactivos					
	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Proteínas
	Microorganismos de prueba					
	<i>Escherichia coli</i>					
EC	-	62.74 <sup>a,A</sup> ± 1.30	63.08 <sup>a,A</sup> ± 0.52	n.d	-	62.17 <sup>a,A</sup> ± 0.21
EA	-	-	-	31.69 <sup>b,B</sup> ± 0.44	-	61.90 <sup>a,A</sup> ± 1.47
EE	30.96 <sup>b,B</sup> ± 0.88	61.86 <sup>a,A</sup> ± 0.76	-	n.d	n.d	-
ED60/40	31.55 <sup>b,B</sup> ± 1.61	31.38 <sup>b,B</sup> ± 1.57	31.21 <sup>b,B</sup> ± 1.69	62.35 <sup>a,A</sup> ± 1.45	-	-
ED50/50	61.89 <sup>a,A</sup> ± 0.92	31.73 <sup>b,B</sup> ± 0.85	-	61.86 <sup>a,A</sup> ± 1.79	-	-
ED40/60	62.91 <sup>a,A</sup> ± 1.01	30.69 <sup>b,B</sup> ± 1.64	-	31.21 <sup>b,B</sup> ± 0.65	n.d	-
EDSEA	32.16 <sup>b,B</sup> ± 1.25	32.11 <sup>b,B</sup> ± 0.39	-	n.d	-	-
ESC	62.40 <sup>a,A</sup> ± 1.35	-	-	31.47 <sup>b,B</sup> ± 0.87	62.85 <sup>a,A</sup> ± 0.73	62.62 <sup>a,A</sup> ± 1.50

Valores representados como mg\*ml<sup>-1</sup>. Prueba de Tukey. - indica que la muestra no generó inhibición contra los microorganismos en cuestión. n.d-compuesto bioactivo no detectado. Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

Valores con diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

EC-extracto crudo, EA-extracto individual acuoso, EE-extracto individual etanolico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

Continuación de la tabla 1.23

Extracto	Compuestos bioactivos					
	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Proteínas
	Microorganismos de prueba					
<i>Salmonella typhimurium</i>						
EC	-	62.82 <sup>a,A</sup> ± 0.97	-	n.d	-	61.35 <sup>a,A</sup> ± 0.43
EA	62.59 <sup>a,A</sup> ± 0.58	61.83 <sup>a,A</sup> ± 0.88	61.24 <sup>a,A</sup> ± 1.38	61.39 <sup>a,A</sup> ± 0.76	-	-
EE	31.78 <sup>b,B</sup> ± 1.34	62.44 <sup>a,A</sup> ± 0.47	62.99 <sup>a,A</sup> ± 0.31	n.d	n.d	-
ED60/40	62.55 <sup>a,A</sup> ± 0.45	61.48 <sup>a,A</sup> ± 1.04	-	62.54 <sup>a,A</sup> ± 1.08	61.33 <sup>a,A</sup> ± 1.15	-
ED50/50	63.82 <sup>a,A</sup> ± 1.97	61.81 <sup>a,A</sup> ± 0.51	-	31.25 <sup>b,B</sup> ± 0.40	-	-
ED40/60	61.28 <sup>a,A</sup> ± 1.31	31.19 <sup>b,B</sup> ± 1.32	-	62.47 <sup>a,A</sup> ± 1.47	n.d	30.57 <sup>b,B</sup> ± 0.56
EDSEA	-	61.38 <sup>a,A</sup> ± 1.41	-	n.d	-	61.34 <sup>a,A</sup> ± 1.13
ESC	20.82 <sup>c,C</sup> ± 1.59	-	61.27 <sup>a,A</sup> ± 1.89	-	62.45 <sup>a,A</sup> ± 1.10	31.55 <sup>b,B</sup> ± 0.54

Valores representados como mg\*ml<sup>-1</sup>. Prueba de Tukey. - indica que la muestra no generó inhibición contra los microorganismos en cuestión. n.d-compuesto bioactivo no detectado. Los valores se expresan como la media ± D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

Valores con diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

EC-extracto crudo, EA-extracto individual acuoso, EE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

Continuación de la tabla 1.23

Extracto	Compuestos bioactivos					
	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Proteínas
	Microorganismos de prueba					
<i>Shigella sonnei</i>						
EC	-	62.33 <sup>aA</sup> ± 1.53	32.04 <sup>bB</sup> ± 1.47	n.d	-	31.25 <sup>bA</sup> ± 1.25
EA	-	-	-	15.64 <sup>aC</sup> ± 0.13	-	-
EE	61.22 <sup>aA</sup> ± 0.87	62.31 <sup>aA</sup> ± 0.41	21.60 <sup>bC</sup> ± 0.72	n.d	n.d	-
ED60/40	-	61.46 <sup>aA</sup> ± 0.82	-	31.23 <sup>bA</sup> ± 1.33	31.27 <sup>bB</sup> ± 0.57	21.35 <sup>cB</sup> ± 0.56
ED50/50	31.18 <sup>bB</sup> ± 0.57	31.35 <sup>bB</sup> ± 1.94	62.36 <sup>aA</sup> ± 1.30	31.19 <sup>bA</sup> ± 1.83	61.33 <sup>aA</sup> ± 1.10	-
ED40/60	-	-	-	2.17 <sup>bD</sup> ± 0.54	n.d	31.25 <sup>aA</sup> ± 1.85
EDSEA	-	-	-	n.d	-	20.46 <sup>cB</sup> ± 0.93
ESC	62.46 <sup>aA</sup> ± 0.98	31.73 <sup>bB</sup> ± 0.52	31.47 <sup>bB</sup> ± 0.64	20.67 <sup>cB</sup> ± 0.83	-	30.76 <sup>bA</sup> ± 1.75

Valores representados como mg\* $\text{mL}^{-1}$ . Prueba de Tukey. - indica que la muestra no generó inhibición contra los microorganismos en cuestión. n.d-compuesto bioactivo no detectado. Los valores se expresan como la media  $\pm$  D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

Valores con diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

FC-extracto crudo, EA-extracto individual acuoso, EE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

Continuación de la tabla 1.23

Extracto	Compuestos bioactivos					
	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Saponinas	Proteínas
	Microorganismos de prueba					
	<i>Listeria monocytógenes</i>					
EC	31.49 <sup>b</sup> B ± 0.60	61.34 <sup>a</sup> A ± 0.32	62.45 <sup>a</sup> A ± 1.38	n.d	-	62.43 <sup>a</sup> A ± 1.70
EA	32.15 <sup>a</sup> B ± 1.07	21.48 <sup>b</sup> C ± 1.66	31.26 <sup>a</sup> B ± 1.19	6.67 <sup>c</sup> F ± 0.35	20.89 <sup>b</sup> B ± 1.45	-
EE	61.34 <sup>a</sup> A ± 1.63	-	31.46 <sup>b</sup> B ± 0.86	n.d	n.d	-
ED60/40	62.68 <sup>a</sup> A ± 0.56	15.64 <sup>d</sup> D ± 1.42	20.73 <sup>c</sup> C ± 1.08	30.61 <sup>b</sup> A ± 0.86	20.47 <sup>c</sup> B ± 1.39	30.54 <sup>b</sup> B ± 0.54
ED50/50	-	8.32 <sup>d</sup> F ± 0.73	62.58 <sup>a</sup> A ± 0.69	11.22 <sup>c</sup> C ± 1.23	-	32.19 <sup>b</sup> B ± 1.91
ED40/60	31.24 <sup>a</sup> B ± 0.67	11.29 <sup>b</sup> E ± 1.29	32.23 <sup>a</sup> B ± 0.73	8.33 <sup>c</sup> D ± 0.84	n.d	-
EDSEA	-	60.23 <sup>a</sup> A ± 1.05	-	n.d	32.11 <sup>b</sup> A ± 1.01	31.22 <sup>b</sup> B ± 0.29
ECS	60.57 <sup>a</sup> A ± 1.72	30.85 <sup>b</sup> B ± 1.27	60.73 <sup>a</sup> A ± 0.79	21.51 <sup>c</sup> B ± 0.33	20.67 <sup>c</sup> B ± 1.74	-

Valores representados como mg\* $\text{mL}^{-1}$ . Prueba de Tukey. - indica que la muestra no generó inhibición contra los microorganismos en cuestión. n.d-compuesto bioactivo no detectado. Los valores se expresan como la media  $\pm$  D.S del triplicado de los análisis.

Valores con diferente letra mayúscula en la misma columna son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

Valores con diferente letra minúscula en la misma fila son significativamente diferentes a un  $p=0.05$

EC-extracto crudo, EA-extracto individual acuoso, EE-extracto individual etanólico, ED60/40-extracto dual agua/etanol (60/40), ED50/50-extracto dual agua/etanol (50/50), ED40/60-extracto dual agua/etanol (40/60), EDSEA-extracto dual secuencial combinación etanol y agua, ESC-extracto secuencial combinado.

Debido a que el estudio del género *Agave* en la investigación fitoquímica de compuestos enfocada a la actividad antimicrobiana es relativamente reciente, información como CMI de compuestos se limita a extractos en conjunto donde la polaridad del disolvente utilizado es la base de comparación. De tal manera que en comparación a otros *Agaves*, la CMI de los extractos acuosos obtenidos del escapo de *Agave salmiana* contra *Escherichia coli*, es mayor a lo reportado para los extractos de *Agave americana*, *Agave cupreata* y *Agave tequilana*, con hasta 25% (Ahmad, *et al.*, 2016, Salazar-Pineda *et al.*, 2017 y Ávila-Fernández *et al.*, 2016), mientras que, contra *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei* la CMI de los extractos etanólicos de las hojas de *Agave angustifolia* y *Agave sisalana* son similares en el intervalo de 18 a 72 mg\*mL<sup>-1</sup> (López-Romero *et al.*, 2018 y Araldi *et al.*, 2018); y menor contra *Listeria monocytógenes* en comparación a los extractos secuenciales con disolventes menos polares (Hexano y acetona) de *Agave bracteosa* y *Agave tequilana* con hasta 39% (Ullah *et al.*, 2016 y Arrizon *et al.*, 2014). La variabilidad en los resultados puede ser debido a la sección de la planta analizada, al tipo de extracción y disolventes utilizados, al tipo de compuesto presente en el extracto y a la cepa bacteriana, la cual puede variar dentro de una misma especie en función a características como serología y virulencia bacteriana que influencia la sensibilidad o resistencia del microorganismo (Chen *et al.*, 2016 y Cushnie *et al.*, 2005).

Por otro lado a diferencia del género *Agave*, otras especies vegetales presentan una gran cantidad de valores de CMI de compuestos en específico para la inhibición de diversos microorganismos, por lo cual se concentra la información más relevante en la **tabla 1.24**, en la cual se puede observar que la CMI de los alcaloides de *Agave salmiana* contra *Shigella sonnei* es menor a lo reportado para los alcaloides del tamarindo (*Tamarindus indica*) y los terpenos de la planta *Pelargonium luridum* con hasta 91% y 68% respectivamente, mientras que la CMI de los fenoles obtenidos en el presente trabajo contra *Salmonella typhimurium* es similar a lo reportado para los fenoles de la granada (*Punica granatum*) y los flavonoides de la planta *Pelargonium luridum* en el intervalo de 20 a 31 mg\*mL<sup>-1</sup>, indicando que *Salmonella typhimurium* es sensible a el grupo de compuestos fenólicos; y los terpenos, aceite esencial y fenoles de *Hypericum roeperianum*, la granada (*Punica granatum*), *Pelargonium luridum* respectivamente, contra *Escherichia coli* presentaron mayor actividad antimicrobiana en

comparación a los flavonoides del escapo de *Agave salmiana* con una diferencia en la CMI de hasta 97%.

**Tabla 1.24** Comparación de CMI de diferentes plantas

Especie vegetal	Compuesto bioactivo	Tipo de extracto	Microorganismo que afecta	CMI (mg*mL <sup>-1</sup> )	
<i>Agave salmiana</i>	Fenoles simples	Polaridad ascendente	<i>Salmonella typhimurium</i>	20.82 ± 1.59	
	Flavonoides	Agua-Etanol (40:60)	<i>Escherichia coli</i>	30.69 ± 1.64	
	Alcaloides	Agua-Etanol (40:60)		<i>Shigella sonnei</i>	2.17 ± 0.54
		Acuosa		<i>Listeria monocytogenes</i>	6.67 ± 0.35
	Taninos	Agua-Etanol (60:40)		<i>Listeria monocytogenes</i>	20.73 ± 1.08
	Saponinas	Agua-Etanol (60:40)		<i>Listeria monocytogenes</i>	20.47 ± 1.39
<i>Hypericum roeperianum</i> <sup>1</sup>	Terpenos	Acetónicos	<i>Escherichia coli</i>	0.13 ± 0.04	
Guayaba ( <i>Psidium guajava</i> ) <sup>2</sup>	Flavonoides	Etanólico	<i>Escherichia coli</i>	41.78 ± 1.28	
Granada ( <i>Punica granatum</i> )	Fenoles <sup>4</sup>	Acuoso	<i>Salmonella typhimurium</i>	27.86 ± 0.61	
	Flavonoides <sup>7</sup>	Agua-Etanol (50:50)	<i>Listeria monocytogenes</i>	32.77 ± 2.67	
	Aceite esencial <sup>7</sup>	Acuoso	<i>Escherichia coli</i>	0.87 ± 0.14	
Tamarindo ( <i>Tamarindus indica</i> ) <sup>5</sup>	Flavonoides	Acuoso	<i>Escherichia coli</i>	6.25 ± 0.76	
	Alcaloides	Metanólico	<i>Shigella sonnei</i>	25.01 ± 1.03	
Frambuesa ( <i>Rubus idaeus</i> ) <sup>6</sup>	Fenoles	Acuosos	<i>Salmonella typhimurium</i>	142.58 ± 2.55	
<i>Ferula assafoetida</i> <sup>8</sup>	Taninos	Agua-Etanol (30:70)	<i>Listeria monocytogenes</i>	32.50 ± 1.96	
	Terpenos	Acetona	<i>Shigella sonnei</i>	6.89 ± 0.37	
<i>Pelargonium luridum</i> <sup>9</sup>	Fenoles	Acuoso	<i>Escherichia coli</i>	2.78 ± 1.04	
	Flavonoides	Etanólico	<i>Salmonella typhimurium</i>	31.52 ± 2.14	

1.- Elisha, et al., 2017. 2.- Valle, et al., 2015. 3.- Guillermo et al., 2012. 4.- Wafa et al., 2017. 5.- Abdallah et al. 2018. 6.- Cetin-Karaca et al. 2015. 7.- Xylia et al., 2018. 8.- Akhlaghi et al., 2018. 9.- Saheed et al., 2018.

## CONCLUSIONES

Se extrajeron y analizaron las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los principales grupos bioactivos presentes en el escapo de *Agave salmiana*, siendo los flavonoides extraídos favorablemente en agua mediante un proceso individual los que presentaron mayor actividad antioxidante mientras que los alcaloides y flavonoides extraídos por una combinación agua/etanol (40/60 y 50/50 respectivamente) mostraron mayor actividad antimicrobiana contra *Shigella sonnei* y *Listeria monocytógenes* respectivamente.

Tanto en los resultados de actividad antioxidante como en actividad antimicrobiana se presentaron efectos sinérgicos y antagónicos medidados por la contribución mayoritaria del grupo de compuestos fenólicos (fenoles simples, flavonoides y taninos) y se identificó que las propiedades antioxidantes de los extractos obtenidos son influenciadas principalmente por el proceso de extracción y disolvente utilizados mientras que las propiedades antimicrobianas de los extractos se relacionan mayormente al tipo de estructura celular del microorganismo en cuestión y a la interacción de los grupos bioactivos con los compuestos expuestos en el entorno celular de las bacterias analizadas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdallah, M. y Muhammad, A. (2018). Antibacterial activity of leaves and fruits extract of *Tamarindus indica* against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Shigella* at potiskum yobe state, Nigeria. *J Anal Pharm Res*, 7(5), 606-609.
2. Abdel-Aziz, M., Shaheen, M., El-Nekeety, A. y Abdel-Wahhab, M. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(4), 356-363.
3. Abdel-Gawad, M., El-Sayed, M. y Abdel-Hameed, E. (1999). Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia*, 70(4), 371-381.
4. Abdel-Hameed, E. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food chemistry*, 114(4), 1271-1277.
5. Aboaba, O., Smith, S. y Olude, F. (2006). Antibacterial effect of edible plant extract on *Escherichia coli* 0157: H7. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(4), 325-327.
6. Ade-Ajayi, A., Hammuel, C., Ezeayanso, C., Ogabiela, E., Udiba, U., Anyim, B. y Olabanji, O. (2011). Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Agave sisalana* Perrine juice (waste). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(7), 180-183.
7. Adebayo, I., Arsad, H., y Samian, M. (2017). Antiproliferative effect on breast cancer (MCF7) of *Moringa oleifera* seed extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2), 282-287.
8. Adebayo, S., Dzoyem, J., Shai, L. y Eloff, J (2015). The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. *BMC Complementary and Alternative medicine*, 15(1), 159.
9. Afzal, M., Shahid, M. y Jamil, A. (2014). Phytochemical Spectrum of Essential Oil of *Paganum harmala* by GC-MS and Antimicrobial Activity Using Sequential Solvents Fractions and Essential Oil. *Asian Journal of Chemistry*, 26(2).
10. Ahmad, B., Shireen, F., Bashir, S., Khan, I. y Azam, S. (2016). Green synthesis, characterisation and biological evaluation of AgNPs using *Agave americana*, *Mentha spicata* and *Mangifera indica* aqueous leaves extract. *IET nanobiotechnology*, 10(5), 281-287.
11. Ahmed, Y., Rahman, S., Akther, P. y Islam, F. (2013). Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii*. *International Food Research Journal*, 20(1), 2939-2943.
12. Ahumada-Santos, Y., Montes-Avila, J., de Jesús Uribe-Beltrán, M., Díaz-Camacho, S., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J., Basilio, J. y Delgado-Vargas, F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial crops and products*, 49, 143-149.
13. Aiyegoro, O., Adewusi, A., Oyedemi, S., Akinpelu, D., Okoh, A. 2011. Interactions of Antibiotics and Methanolic Crude Extracts of *Azelia Africana* (Smith.) Against Drug Resistance Bacterial Isolates. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(7): 4477-4503.

14. Akhavan, M., Jahangiri, S. y Shafaghat, A. (2015). Studies on the antioxidant and antimicrobial activity and flavonoid derivatives from the fruit of *Trigonostadium brachytaenium* (Boiss.) Alava. *Industrial crops and Products*, 63, 114-118.
15. Akhlaghi, M., Abbasi, M., Safari, Y., Amiri, R. y Yoosefpour, N. (2018). Data set on the antibacterial effects of the hydro-alcoholic extract of *Ferula assafoetida* plant on *Listeria monocytogenes*. *Data in brief*, 20, 667-671.
16. Akthar, M. S., Degaga, B. y Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(1), 1-7.
17. Al-Mariri, A. y Safi, M. (2014). In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Iranian journal of medical sciences*, 39(1), 36.
18. Al-Rimawi, F., Abu-Lafi, S., Abbadi, J., Alamarneh, A., Sawahreh, R. y Odeh, I. (2017). Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA AND LC/MS and their antioxidant activity. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, 14(2), 130-141.
19. Alabri, T., Al Musalami, A., Hossain, M., Weli, A. y Al-Riyami, Q. (2014). Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. *Journal of King Saud University-Science*, 26(3), 237-243.
20. Alberti, A., Zielinski, A., Zardo, D., Demiate, I., Nogueira, A., y Mafra, L. (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food chemistry*, 149, 151-158.
21. Aleksic, V. y Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169(4), 240-254.
22. Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Hernández-Vargas, V., Ortega-Chávez, M., Orea-Lara, G., Díaz-Leon, A., Ávila-Reyes, J. y Muniz-Martinez, R. (2009). Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences*, 6(6), 1076.
23. Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Ávila-Reyes, J., Uribe-Soto, J., y González-Valdez, L. S. (2013). The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(03), 9.
24. Alves, P., Scatena, V. y Trovó, M. (2013). Anatomy of scapes, bracts, and leaves of *Paepalanthus* sect. *Diphyomene* (Eriocaulaceae, Poales) and its taxonomic implications. *Brittonia*, 65(2), 262-272.
25. Alvis, A., Martínez, W., y Arrazola, G. (2012). Obtención de extractos hidro-alcohólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como antioxidante natural. *Información tecnológica*, 23(2), 3-10
26. Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 99(3), 325-348.

27. Anulika, N., Ignatius, E., Raymond, E., Osasere, O. y Abiola, A. (2016). The chemistry of natural product: Plant secondary metabolites. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*, 4(8), 1-8.
28. Araldi, R., dos Santos, M., Barbon, F., Manjerona, B., Meirelles, B., de Oliva Neto, P., da Silva, P., dos Santos, L., Cherici, I. y de Souza, E. (2018). Analysis of antioxidant, cytotoxic and mutagenic potential of *Agave sisalana* Perrine extracts using Vero cells, human lymphocytes and mice polychromatic erythrocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 873-885.
29. Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. y Méndez-Acosta, H. (2016). Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse. *international journal of hydrogen energy*, 41(2), 897-904.
30. Arrizon, J., Hernández-Moedano, A., Oner, E. y González-Avila, M. (2014). In vitro prebiotic activity of fructans with different fructosyl linkage for symbiotics elaboration. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 9(3), 69.
31. Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A. y Monsan, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*, 122(1), 123-130.
32. Arya, V., Thakur, N. y Kashyap, C. (2012). Preliminary phytochemical analysis of the extracts of *Psidium* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(1), 1-5.
33. Asif, M. (2015). Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. *Chemistry international*, 1(1), 35-52.
34. Atkins, P. (2008). *Química física*. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
35. Autino, J., Romanelli, G. y Ruíz, D. (2013). *Introducción a la química orgánica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.
36. Ávila-Reyes, J., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., González-Valdez, L., Valencia del Toro, G. y Durán Páramo, E. (2010). Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels. *Food Research International*, 43(1), 296-300
37. Ávila-Fernández, Á., Cuevas-Juárez, E., Rodríguez-Alegria, M. E., Olvera, C. y López-Munguía, A. (2016). Functional characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on structurally diverse fructans. *Journal of applied microbiology*, 121(1), 263-276.
38. Ayaz, M., Junaid, M., Ahmed, J., Ullah, F., Sadiq, A., Ahmad, S. y Imran, M. (2014). Phenolic contents, antioxidant and anticholinesterase potentials of crude extract, subsequent fractions and crude saponins from *Polygonum hydropiper* L. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 145.
39. Ayyad, S. E. N., Katoua, D. F., Alarif, W. M., Sobahi, T. R., Aly, M. M., Shaala, L. A., y Ghandourah, M. A. (2015). Two new polyacetylene derivatives from the Red Sea sponge *Xestospongia* sp. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(11-12), 297-303.

40. Azeh, G., Tagbo, R., Chukwuekenzie, C., Unaegbu, M., Unachukwu, M. 2015. Comparative Antimicrobial Activity of Ethanol and Hexane Leaf Extracts of *Ficus Exasperata* on Five Microbial Isolates. *Global Journal of Medical Research*. 15(1): 21-28.
41. Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N. y Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, 117(4), 426-236.
42. Azwanida, N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat. Plants*, 4(3), 3-8
43. Baba, S. y Malik, S. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*, 9(4), 449-454.
44. Bagué, A. y Álvarez, N. (2012). *Tecnología farmacéutica*. España: Club Universitario.
45. Balasundram, N., Sundram, K. y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
46. Ballesteros, P., Claramunt, R., Sanz, D. y Teso, E. (2013). *Química orgánica avanzada*. España: UNED.
47. Barriada-Bernal, L., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J., Torres-Morán, M., González-Elizondo, M. y Herrera-Arrieta, Y. (2014). Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA-Journal of Food*, 12(2), 105-114.
48. Beelders, T., De Beer, D., Stander, M. y Joubert, E. (2014). Comprehensive phenolic profiling of *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. by LC-DAD-MS and-MS/MS reveals novel xanthone and benzophenone constituents. *Molecules*, 19(8), 11760-11790.
49. Belhadj, F., Somrani, I., Aissaoui, N., Messaoud, C., Boussaid, M. y Marzouki, M. (2016). Bioactive compounds contents, antioxidant and antimicrobial activities during ripening of *Prunus persica* L. varieties from the North West of Tunisia. *Food chemistry*, 204, 29-36.
50. Benzie, I., y Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
51. Bhatia, I., Satyanarayana, M., y Srinivasan, M. (1955). Transfructosidase from *Agave vera cruz* Mill. *Biochemical Journal*, 61(1), 171.
52. Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Job, N. y Tandon, P. (2015). Phyto-molecular profiling and assessment of antioxidant activity within micropropagated plants of *Dendrobium thysiflorum*: a threatened, medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 535-550.
53. Bianchi, E., y Cole, J. R. (1969). Antitumor agents from *Agave schottii* (Amaryllidaceae). *Journal of pharmaceutical sciences*, 58(5), 589-591.
54. Bimakr, M., Rahman, R., Taip, F., Ganjloo, A., Salleh, L., Selamat, J., Hamid, I. y Zaidul, I. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing*, 89(1), 67-72.

55. Bitencourt, R., Queiroga, C., Junior, Í. y Cabral, F. (2014). Fractionated extraction of saponins from Brazilian ginseng by sequential process using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 272-281.
56. Bondet, V., Brand-Williams, W., y Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
57. Botura, M. B., dos Santos, J. D., da Silva, G. D., de Lima, H. G., de Oliveira, J. V., de Almeida, M. A., Batatinha, M. J. y Branco, A. (2013). In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr.(sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192(1-3), 211-217.
58. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
59. Brena-Bustamante, P., Lira-Saade, R., García-Moya, E., Romero-Manzares, A., Cervantes-Maya, H., López-Carrera, M. y Chávez-Herrera, S. (2013). Aprovechamiento del escapo y los botones florales de *Agave kerchovei* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Botanical Sciences*, 91(2), 181-186.
60. Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(4), 221-247.
61. Cabello, R. (2008). *Microbiología y parasitología humana*. México, D.F: Panamericana.
62. Calange, F. (2011). *Hongos medicinales*. España: Editorial Mundi-Prensa.
63. Carmona, J., Morales-Martínez, T., Mussatto, S., Castillo-Quiroz, D. y Ríos-González, L. (2017). Chemical, structural and functional properties of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Revista mexicana deficiencias forestales*, 8(42), 100-122.
64. Carpentier, B., y Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology*, 145(1), 1-8.
65. Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J. y Jiménez, R. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17(2), 149-154.
66. Castillo, G. y Martínez, S. (2007). *Manual de fitoterapia*. Barcelona, España: ELSEVIER.
67. Castro-Franco, R., Meza-Herrera, A., Contreras-Quiróz, M. y Santos-García, J. (2001). Uso de fitoextractos en el control del crecimiento in vitro de bacterias enteropatógenas. *Revista de Chapingo serie zonas áridas*, 8(1), 96-99.
68. Causse, C. (2010). *Los secretos de la salud de los antioxidantes*. Editorial Hispano Europea.
69. Centurión-Hidalgo, D., Espinosa-Moreno, J., Mayo-Mosqueda, A., Frías-Jiménez, A. y Velázquez-Martínez, J. (2013). Antibacterial activity evaluation of hexanic extracts of edible palm inflorescences of Tabasco's mountains, México. *Plibotánica*, 31(1), 133-142.
70. Cerda-de los Santos, K. (2011) *Evaluación del contenido de fenólicos, actividad antioxidante y efectos antidiabéticos de extractos de jara- bes de agave (A. atrovirens Karw) (Tesis doctoral)*. Tecnológico de Monterrey, Monterrey.

71. Cetin-Karaca, H. y Newman, M. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. *Food Bioscience*, (11), 8-16.
72. Chakraborty, D.D., Ravi, V. y Chakraborty, P. (2010). Phytochemical evaluation and TLC protocol of various extracts of *Bombax ceiba* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 1(8), 66-73.
73. Chang, C., Lin, C. y Lai, G. (2012). Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
74. Chavely, D., Sánchez, R., Narváes, C. y Restrepo, L., (2009). Extraction of compounds with antioxidant activity in guava (*Psidium guajava* L.) fruit produced in Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova* ,32(6), 146-157.
75. Chel, L., Corzo, L. y Bentacur, D. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, 227(1), 34-43.
76. Chen, C., Chan, H., Chu, Y., Ho, H., Chen, P., Lee, T., y Lee, C. (2009). Antioxidant activity of some plant extracts towards xanthine oxidase, lipoxygenase and tyrosinase. *Molecules*, 14(8), 2947-2958.
77. Chen, P. Y., Kuo, Y. C., Chen, C. H., Kuo, Y. H., y Lee, C. K. (2009). Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. *Molecules*, 14(5), 1789-1795.
78. Chen, P., Chen, C., Kuo, C., Lee, T., Kuo, Y. y Lee, C. (2011). Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. *Planta medica*, 77(09), 929-933.
79. Chen, R., Meng, F., Zhang, S., y Liu, Z. (2009). Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng. *Separation and Purification Technology*, 66(2), 340-346.
80. Chen, Y., Chen, X., Yu, F., Wu, M., Wang, R., Zheng, S., Han, D., Yang, Q., Kong, H., Zhou, F., Zhu, J., Yao, H. y Zhu, L. (2016). Serology, virulence, antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains circulating in southeastern China from 2009 to 2013. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(3), 258-e9.
81. Cheok, C., Salman, H. y Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
82. Cherrak, S., Mokhtari-Soulimane, N., Berroukeche, F., Bensenane, B., Cherbonnel, A., Merzouk, H. y Elhabiri, M. (2016). In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PloS one*, 11(10), e0165575.
83. Chevalier, M., Robert, F., Amusant, N., Traisnel, M., Roos, C. y Lebrini, M. (2014). Enhanced corrosion resistance of mild steel in 1 M hydrochloric acid solution by alkaloids extract from *Aniba rosaeodora* plant: Electrochemical, phytochemical and XPS studies. *Electrochimica Acta*, 131, 96-105.
84. Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y. y Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145-152.

85. Choi, I., Cha, H., y Lee, Y. (2014). Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*, 19(10), 16811-16823.
86. Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martínez, L. P., y Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytologist*, 209(2), 798-811.
87. CONABIO. 2008. Agave, mezcales y diversidad. [www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mezcales/mMapa.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mezcales/mMapa.html)
88. Contreras, M., Bribe, N., Gómez-Caravaca, A., Gálvez, J. y Segura-Carretero, A. (2017). Alkaloids profiling of fumaria capreolata by analytical platforms based on the hyphenation of gas chromatography and liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *International journal of analytical chemistry*, 2017.
89. Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M. y Radilla, C. (2014). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-212.
90. Cortés, L. y Basurto, F. 2009. Guía de colección Nacional de agaváceas y nolináceas del jardín botánico (Tesis profesional). UNAM, Facultad de Biología, México.
91. Cowan, M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 12(1), 564-582.
92. Coy, C., Parra, J. y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie raputia heptaphylla (rutaceae). *Revista elemento*, 4(1), 31-39.
93. Crow, W. y Price, J. (1949). Alkaloids of the Australian Rutaceae: Melicope fareana. II. Preliminary Examination of Melicopine, Melicopidine, and Melicopicine. *Australian Journal of Chemistry*, 2(2), 255-263.
94. Cruz A., Gómez C., Villagómez J., Chavarría N., Rodríguez J., Rangel E. y Castro J. (2013). Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central in México: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control*, 32(1), 289-295.
95. Cruz-Carillo, A., Rodríguez, N., Rodríguez, C. (2010). In vitro evaluation of the antibacterial effect of Bidens pilosa, Lantana camara, Schinus molle and Silybum marianum. *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Actualidad y Divulgación Científica*, 13(2), 117-124.
96. Cruz-Castillo, G., Torres-Lima, P., Alfaro-Chilmalhua, M., Albores-González, L. y Munguía-González, J. (2008). Lombricompostas y apertura de la espata en poscosecha del alcastraz "Green Goddess" (*Zantedeschia aethiopica* (L) K. Spreng) en condiciones tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(2), 207-212.
97. Cuellar, F., Ariza, E., Anzola, C. y Restrepo, P. (2013). Estudio de la capacidad antioxidante del Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh) durante la maduración. *Revista Colombiana de Química*, 42(2), 116-123.
98. Cushnie, T. y Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.

99. da Silva, B., de Sousa, A., Silva, G., Mendes, T. y Parente, J. (2002). A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(5-6), 423-428.
100. Dai, J., Ran, W., Xing, B., Gu, M., y Wang, L. (2006). Characterization of fulvic acid fractions obtained by sequential extractions with pH buffers, water, and ethanol from paddy soils. *Geoderma*, 135, 284-295.
101. Daniel, M. (2016). *Medicinal plants: chemistry and properties*. CRC Press
102. Darkwah, W., Ao, Y., Adinortey, M., Weremfo, A., Abrokwah, F. y Afriyie, E. (2018). Total Phenolic, Flavonoid and Alkaloid Contents, Oxidative DNA Damage Protective and Antioxidant Properties of Methanol and Aqueous Extracts of *Dioscorea rotundifolia* Whole Plant. *Free Radicals & Antioxidants*, 8(2).
103. Das, K., Dang, R., Sivaraman, G. y Ellath, R. (2018). Phytochemical Screening for Various Secondary Metabolites, Antioxidant, and Anthelmintic Activity of *Coscinium fenestratum* Fruit Pulp: A New Biosource for Novel Drug Discovery. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2).
104. de Campos, L., Leimann, F., Pedrosa, R., y Ferreira, S. (2008). Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, 99(17), 8413-8420.
105. De la Fé, C. y Cárdenas, M. (2014). Producción de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) una realidad en Santa Cruz del Norte, Mayabeque. *Cultivos tropicales*, 35(4), 5-12.
106. de Souza, V., Pereira, P., da Silva, T., de Oliveira Lima, L., Pio, R. y Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food chemistry*, 156, 362-368.
107. Delgado, M., Galleano, M., Añón, M. y Tironi, V. (2015). Amaranth peptides from simulated gastrointestinal digestion: antioxidant activity against reactive species. *Plant foods for human nutrition*, 70(1), 27-34.
108. Dewanjee, S., Kundu, M., Maiti, A., Majumdar, R., Majumdar, A. y Mandel, S. (2007). In vitro evaluation of antimicrobial activity of crude extract from plants *Diospyros peregrina*, *Coccinia grandis* and *Swietenia macrophylla*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(3), 773-778.
109. Díaz-Tenorioa, L., Carrasco-Romoa, E., Hernández-Cortés, M., Cira-Chávez, L. y Gassós-Ortega, L. Junio de 2015. Identificación electroforética de *Agave* spp. Presentes en el estado de Sonora: reconocimiento de especies potenciales productoras de metalotioneínas. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, México.
110. Díaz, P. y Luz, N. (2009). Interacciones moleculares y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. *Revista de estudios transdisciplinarios*, 1(2), 32-55.
111. Dif, M. (2016). Phenolic quantification and agave Americana leaves de geoclimatic area. *Advances in Environmental Biology*, 10(9), 194-200.

112. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. y Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
113. Do, Q., Angkawijaya, A., Tran-Nguyen, P., Huynh, L., Soetaredjo, F., Ismadji, S. y Ju, Y. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
114. Domingo, D., López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16(4): 385-393.
115. Downey, M. y Hanlin, R. (2016). Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 154-159.
116. Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., y Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141-149.
117. Dryhurst, G. (2015). *Periodate oxidation of diol and other functional groups: analytical and structural applications (Vol. 2)*. Elsevier.
118. Du Toit, P. y Schabort, J. (1978). An aminopeptidase from *Agave americana*, chemical properties of the enzyme. *Phytochemistry*, 17(3), 371-375.
119. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., y Mérillon, J. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.
120. e Silva, F., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F. y Miralles, B. (2017). Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 140-146.
121. Edeoga, H., Okwu, D. y Mbaebie, B. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.
122. Efferth, T. y Kuete, V. (2010). *Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products*. *Frontiers in pharmacology*, 1, 123.
123. Ekwenye, U. y Elegalam, N. (2005). Antibacterial activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Int J Mol Adv Sci*, 1, 411-416.
124. Eleazu, C., Eleazu, K., Awa, E. y Chukwuma, S. (2012). Comparative study of the phytochemical composition of the leaves of five Nigerian medicinal plants. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 3(2), 42-46.
125. Elekofehinti, O. (2015). Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants—A review. *Pathophysiology*, 22(2), 95-103.
126. Elias, R. J., Kellerby, S. S., y Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441.

127. Elisha, I., Botha, F., McGaw, L. y Eloff, J. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 133.
128. Elsie, B. H., Dhanarajan, M. S., y Sudha, P. N. (2011). In vitro Screening Of Secondary Metabolites And Antimicrobial Activities Of Ethanol And Acetone Extracts From Red Seaweed *Gelidium Acerosa*. *Journal Of Chemistry Research*. India: Department Of Bio-Chemistry, Jaya College of Arts and Science, Thirunindravur, TamilNadu, 2(2), 1-3.
129. Escamilla-Treviño, L. (2012). Potential of plants from the genus *Agave* as bioenergy crops. *BioEnergy Research*, 5(1), 1-9.
130. Eskander, J., Lavaud, C. y Harakat, D. (2010). Steroidal saponins from the leaves of *Agave macroacantha*. *Fitoterapia*, 81(5), 371-374.
131. Fallon, T. y Weng, J. (2014). A molecular gauge for nitrogen economy in plants. *Cell*, 159(5), 977-978.
132. Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M., Valentao, P., Andrade, P., González-Álvarez, J., y Pereira, J. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial crops and products*, 42, 126-132.
133. Fernández, L. (2008). Fitoquímica del *Agave salmiana* (Tesis de grado doctoral). Universidad de las Américas, Facultad de química y biología, Escuela de Ciencias. Puebla.
134. Figueredo, C., Villegas, J. y Nassar, J. (2011). Sincronía reproductiva interpoblacional de *Agave cocui* (Agavaceae) en Venezuela. *Revista de biología tropical*, 59(3), 145-148.
135. Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S., y Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.
136. Flores-Agüero, F., Peña-Aguilar, J., Bermúdez-Peña, C., y Nava-Galván, C. (2016). Alianzas estratégicas para el aprovechamiento de subproductos derivados del café. *Agronomía Colombiana*, 34(1Supl), S54-S57.
137. Flores, A., Castañeda, E., Sánchez, F., Romero, L., y Ruíz, J. (2010). Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el altiplano mexicano (Tesis de grado magisterial). Instituto tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Facultad de biología. Tlaxcala.
138. Fong, S., Mulyana, Y. y Girawan, D. (2016). Antibacterial Effect of *Pulsatilla chinensis* towards *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, and *Salmonella typhi*. *Althea Medical Journal*, 3(2), 292-297.
139. Formagio, A., Volobuff, C., Santiago, M., Cardoso, C., Vieira, M. y Valdevina, Z. (2014). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. *Antioxidants*, 3(4), 745-757.
140. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition*, 88(6), 587-605.
141. Franco, L., Matiz, G., Pájaro, I. y Gómez H. (2013). Actividad antibacteriana in vitro de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. Y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(3), 230-237.

142. Gajera, H., Gevariya, S., Hirpara, D., Patel, S. y Golakiya, B. (2017). Antidiabetic and antioxidant functionality associated with phenolic constituents from fruit parts of indigenous black jamun (*Syzygium cumini* L.) landraces. *Journal of food science and technology*, 54(10), 3180-3191.
143. García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, J. S., & Talavera-Magaña, D. (2010). El género agave spp. En México: Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 15(5), 109-129.
144. García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E., y García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 44-50.
145. García-Pedraza, L. G., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., Pinos-Rodríguez, J. M., Martínez, J. F., y Santoyo, M. E. (2009). Effects of Agave salmiana Otto ex Salm-Dick high-fructose syrup on non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 930-938.
146. García-Torres, D. E., Sotero Solís, V., Mancini, D. A. P., Torres, R. P., y Mancini-Filho, J. (2009). Actividad antioxidante de los extractos del chopé (*Gustavia augusta* L.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(3), 374-381.
147. García, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 2(87), 14-23.
148. García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. y Fernández-Bolaños, J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food chemistry*, 197, 554-561.
149. García, C., Alonso, E., Rodríguez, R., Martínez, A., Ramírez, P. y Moreno, A. (2009). Susceptibilidad in vitro de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a diferentes extractos vegetales. *Revista agraria*, 6(1), 19-23.
150. Garmus, T., Paviani, L., Queiroga, C., Magalhães, P. y Cabral, F. (2014). Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 86, 4-14.
151. Garmus, T., Paviani, L., Queiroga, C., y Cabral, F. (2015). Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 99, 68-75.
152. Garrido, G., Ortiz, M., & Pozo, P. (2013). Total phenols and flavonoids and antioxidant activity of *Lampaya medicinalis* F. Phil. leaf extracts. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 1(1), 30-38.
153. Gennaro, A. (2009). Remington Farmacia. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A.
154. Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J., Fernández-López, J., Muñoz, L. y Viuda-Martos, M. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(12), 4235-4242.

155. Gentry, H. (1982). *Agaves of continental North America*. Arizona, EUA: The University of Arizona Press.
156. Ghitescu, R., Volf, I., Carausu, C., Bühlmann, A., Gilca, I. y Popa, V. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics sonochemistry*, 22, 535-541.
157. González-Cruz, L., Jaramillo, E., Bernardino y A., Mora, R. (2011). Influence of plant age on fructan content in fructosyl transferase activity in *Agave atrovirens* karw leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(71), 15911-15929.
158. González-Cruz, L., Jaramillo-Flores, M., Bernardino-Nicanor, A. y and Mora-Escobedo, R. (2012). Influence of the harvest age on fructan content and fructosyltransferase activity in *Agave atrovirens* karw pine. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4(5), 110-119.
159. González-Jiménez, F., Hernández-Espinosa, N., Cooper-Bribiesca, B., Núñez-Bretón, L. y Reyes-Reyes, M. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 18(1), 16-21.
160. González, E. y Quiñónez, E. 2005. Falsa apendicitis *Yersinia enterocolitica*. *Revista digital universitaria*, 6(4), 1-9.
161. González, T. y Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México*, 47(5), 345-348.
162. Gu, T., Zhang, M., Tan, T., Chen, J., Li, Z., Zhang, Q. y Qiu, H. (2014). Deep eutectic solvents as novel extraction media for phenolic compounds from model oil. *Chemical Communications*, 50(79), 11749-11752.
163. Guillermo, L., Morón, A., Carinella, R. y Castillo, L. (2012). Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de Aloe vera sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 1(62), 73-78.
164. Gutiérrez Y., Miranda M., Varona N. y Rodríguez T. (2000). Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. *Rev Cubana Farm*, 34(1), 50-55
165. Guzmán, B., Cruz, D., Alvarado, J. y Mollinedo, P. 2013. Cuantificación de saponinas en muestras de Cañihua *chenopodium Pallidicaule* Aellen. *Revista Boliviana de Química*, 30(2), 131-136.
166. Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429.
167. Hafner, M., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Crews, C. y Krska, R. (2008). Stability and epimerisation behaviour of ergot alkaloids in various solvents. *World Mycotoxin Journal*, 1(1), 67-78.
168. Hagerman, A. y Butler, L. (1980). Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(5), 947-952.
169. Hahn, D. y Rooney, L. (1986). Effect of genotype on tannins and phenols of sorghum. *Cereal Chem*, 63(1), 4-8.

170. Hamissa, A., Seffen, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Perego, P. y Converti, A. (2012). Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food and bioproducts processing*, 90(1), 17-21.
171. Harborne, B. (1984). *Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis*. New York: Chapman and Hall.
172. Harzallah, A., Bhourri, A. M., Amri, Z., Soltana, H. y Hammami, M. (2016). Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 83, 255-267.
173. Háuad-Marroquín, L. A., Pérez-Liñán, A., Resendez-Pérez, D., Moreno, C., Lara Vásquez, S., y Lázaro López, D. (2010). Determinación química y estudio terapéutico de *Agave tequilana* weber. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 5, 254-265.
174. Hazen, T., Leonard, S., Lampel, K., Lacher, D., Maurelli, A. y Rasko, D. (2016). Investigating the relatedness of enteroinvasive *Escherichia coli* to other *E. coli* and *Shigella* using comparative genomics. *Infection and immunity*, 84(8), 2362-2371.
175. Hemalatha, R., Nivetha, P., Mohanapriya, C., Sharmila, G., Muthukumar, C. y Gopinath, M. (2016). Phytochemical composition, GC-MS analysis, in vitro antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. *Journal of food science and technology*, 53(2), 1189-1198.
176. Heng, L., Vincken, J., Hoppe, K., Van Koningsveld, G., Decroos, K., Gruppen, H., Boekel, A. V. (2006). Stability of pea DDMP saponin and the mechanism of its decomposition. *Food chemistry*, 99(2), 326-334.
177. Hernández, I. (2011). Estudio comparativo de cuatro métodos de extracción de compuestos fenólicos de bayas de *Vitis vinifera* (Grado máster). Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile, Chile.
178. Hernández, M. 2011. Photobucket. <http://smg.photobucket.com/user/centralauctions/media/agave/agavemaximiliana4.jpg.html>
179. Herrera, 2014. Botanical, *Agave salmiana*. <http://rickyglew.blogspot.mx/2014/02/agave-salmiana-ssp-crassispina.html>
180. Hess, H., Kreuzer, M., Diaz, T., Lascano, C., Carulla, J., Soliva, C. y Machmüller, A. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109(1-4), 79-94.
181. Hipólito, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*, 13(33), 13-18.
182. Hirner, A. (1992). Trace element speciation in soils and sediments using sequential chemical extraction methods. *International journal of environmental analytical chemistry*, 46(1-3), 77-85.
183. Hossain, M. y Shah, M. (2015). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 66-71.
184. Hossain, M., Al Kalbani, M., Al Farsi, S., Weli, A. y Al-Riyami, Q. (2014). Comparative study of total phenolics, flavonoids contents and evaluation of antioxidant and antimicrobial

- activities of different polarities fruits crude extracts of *Datura metel* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(5), 378-383.
185. Hossain, M., Brunton, N. y Rai, D. (2016). Effect of drying methods on the steroidal alkaloid content of potato peels, shoots and berries. *Molecules*, 21(4), 403.
186. Hosseinzadeh, H. y Younesi, H. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC pharmacology*, 2(1), 7.
187. Hu, J., Shi, X., Chen, J., Mao, X., Zhu, L., Yu, L. y Shi, J. (2014). Alkaloids from *Toddalia asiatica* and their cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities. *Food chemistry*, 148, 437-444.
188. Huang, Y., Wang, Y., Pan, Q., Wang, Y., Ding, X., Xu, K., Li, N. y Wen, Q. (2015). Magnetic graphene oxide modified with choline chloride-based deep eutectic solvent for the solid-phase extraction of protein. *Analytica chimica acta*, 877, 90-99.
189. Hwang, S., Yoon, W., Lee, O. H., Cha, S., y Dai Kim, J. (2014). Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food chemistry*, 146, 71-77.
190. Iannello, C., Bastida, J., Bonvicini, F., Antognoni, F., Gentilomi, G. y Poli, F. (2014). Chemical composition, and in vitro antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. *Natural product research*, 28(10), 704-710.
191. Ikawa, M., Schaper, T., Dollard, C. y Sasner, J. (2003). Utilization of Folin–Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1811-1815.
192. Irianda, A. (2010). Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos (Grado doctoral). Universidad politécnica de Valencia, Valencia, España.
193. Ishaq, M., Hussain, M., Siddique, M., Ali, G., Khattak, M. y Ahmad, S. (2014). In vitro phytochemical, antibacterial, and antifungal activities of leaf, stem, and root extracts of *Adiantum capillus veneris*. *The Scientific World Journal*, 2014.
194. Jajere, U., Hammuel, C., Mohammed, M., Okibe, P., Ali, E., Abubakar, A. y Aliyu, N. (2016). Phytochemical and toxicological studies of methanol extract of *Agave sisalana* (agaveceae). *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 132-142.
195. Jaramillo, C., Espinoza, A., D'Armas, H., Troccoli, L. y de Astudillo, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171-1184.
196. Jasim, H., Hussein, A., Hameed, I. y Kareem, M. (2015). Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *Solanum nigrum* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(4), 56-72.
197. Jasim, H., Hussein, A., Hameed, I. y Kareem, M. (2015). Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *Solanum nigrum* using gas

- chromatography mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(4), 56-72.
198. Jayaprakasha, G., Singh, R., y Sakariah, K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*, 73(3), 285-290.
199. Jeyaseelan, E., Tharmila, S., Santhuyaseelan, V. y Niranjana, K. (2012). Antibacterial Activity of Various Solvent Extracts of Some Selected Medicinal Plants Present in Jaffna Peninsula. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(4), 792-796.
200. Ji, X., Li, Y., Liu, H., Yan, Y. y Li, J. (2000). Determination of the alkaloid content in different parts of some *Mahonia* plants by HPCE. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 74(4), 387-391.
201. Jin, J. M., Liu, X. K., y Yang, C. R. (2003). Three new hecogenin glycosides from fermented leaves of *Agave americana*. *Journal of Asian natural products research*, 5(2), 95-103.
202. John, K., Ayyanar, M., Arumugam, T., Enkhtaivan, G., Jin, K. y Kim, D. (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of different solvent extracts from *Strychnos minor* Dennst leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 204-209.
203. Jones, J. y Dangel, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323.
204. Joshi, B., Sah, G., Basnet, B., Bhatt, M., Sharma, D., Subedi, K., Pandey, J. y Malla, R. (2011). Phytochemical extraction and antimicrobial properties of different medicinal plants: *Ocimum sanctum* (Tulsi), *Eugenia caryophyllata* (Clove), *Achyranthes bidentata* (Datiwan) and *Azadirachta indica* (Neem). *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(1), 1-7.
205. Junior, E. y Morand, C. (2016). Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health—A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 440-454.
206. Kabesh, K., Senthilkumar, P., Ragunathan, R. y Kumar, R. (2015). Phytochemical analysis of *Catharanthus roseus* plant extract and its antimicrobial activity. *Int J Pure Appl Biosci*, 3(2), 162-72.
207. Kähkönen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T. y Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962
208. Kamal, Z., Ullah, F., Ayaz, M., Sadiq, A., Ahmad, S., Zeb, A., Hussain, A. y Imran, M. (2015). Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *atriplex laciniata* L.: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biological research*, 48(1), 21.
209. Karamać, M., Kosińska, A., Rybarczyk, A. y R. Amarowicz. (2007). Extraction and chromatographic separation of tannin fractions from tannin-rich plant material. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4), 471-474.
210. Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simporé, J., Colizzi, V. y Traore, A. (2006). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African journal of biotechnology*, 5(2), 195-200.

211. Kasay, M., Huamán, J. y Guerrero, M. (2013). Estudio cualitativo y cuantitativo de taninos de *Oenothera rosea* L'her. Ex. Aiton. Revista Peruana de Química e Ingeniería Bioquímica, 16(1), 13-19.
212. Kasote, D., Katyare, S., Hegde, M. y Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. International journal of biological sciences, 11(8), 982.
213. Kasprzak, M., Erxleben, A. y Ochocki, J. (2015). Properties and applications of flavonoid metal complexes. RSC Advances, 5(57), 45853-45877.
214. Khallouki, F., Eddouks, M., Mourad, A., Breuer, A. y Owen, R. (2017). Ethnobotanic, Ethnopharmacologic Aspects and New Phytochemical Insights into Moroccan Argan Fruits. International journal of molecular sciences, 18(11), 2277.
215. Khanam, Z., Sam, K., Zakaria, N., Ching, C. y Bhat, I. (2015). Determination of polyphenolic content, HPLC analyses and DNA cleavage activity of Malaysian *Averrhoa carambola* L. fruit extracts. Journal of King Saud University-Science, 27(4), 331-337.
216. Khanam, Z., Wen, C., y Bhat, I. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wild *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali). Journal of King Saud University-Science, 27(1), 23-30.
217. Khatib, M., Pieraccini, G., Innocenti, M., Melani, F. y Mulinacci, N. (2016). An insight on the alkaloid content of *Capparis spinosa* L. root by HPLC-DAD-MS, MS/MS and <sup>1</sup>H qNMR. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 123, 53-62.
218. Kim, S., Para, P. y Ree, K. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy proteins isolate. J Agric Food Chem, 38(2), 651-656.
219. Kim, T., Silva, J., Kim, M. y Jung, Y. (2010). Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. Food Chemistry, 118(3), 740-746.
220. Kiranmai, M., Kazim, S. y Ibrahim, M. (2011). Combined wound healing activity of *Gymnema sylvestre* and *Tagetes erecta* linn. International Journal of Pharmaceutical Applications, 2(2), 135-140.
221. Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B. y Yankova, T. (2006). Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 20(11), 961-965.
222. Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. y Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 5(3), 127-134.
223. Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A. y Mimica-Dukic, N. (2016). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of ethnopharmacology, 178, 125-136.

224. Ko, S. (1992). Extract yields and saponin contents of red ginseng extracts prepared with various concentrations of ethanol. *Korean J Pharmacogn.*, 23, 24-28.
225. Koley, T., Kaur, C., Nagal, S., Walia, S. y Jaggi, S. (2016). Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1044-S1052.
226. Komape, N., Aderogba, M., Bagla, V., Masoko, P., y Eloff, J. (2014). Anti-bacterial and antioxidant activities of leaf extracts of *Combretum vendee* (combretaceae) and the isolation of an anti-bacterial compound. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5), 73-77.
227. Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. y Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. México: FAO Fiat Panis.
228. Kruk, J., Szymańska, R., Nowicka, B. y Dłużewska, J. (2016). Function of isoprenoid quinones and chromanols during oxidative stress in plants. *New biotechnology*, 33(5), 636-643.
229. Kujur, R., Singh, V., Ram, M., Yadava, H., Singh, K., Kumari, S., y Roy, B. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy research*, 2(4), 258.
230. Kumar, P., Sucheta, S., Deepa, V., Selvamani, P., y Latha, S. (2008). Antioxidant activity in some selected Indian medicinal plants. *African journal of Biotechnology*, 7(12).
231. Kumar, V., Abul, K., Fausto, N. 2010. Patología estructural y funcional. Editorial Elsevier. 7ma edición. Madrid, España. 651-660 p.
232. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4. *Nature*, 227(1), 680-5.
233. Laguna, A., Miranda, C. y González, H. (2012). Caracterización morfológica de *Encyclia adenocaula*. Texcoco, México: Imagen Digital.
234. Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., Torres, M. y Maestri, D. (2012). Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Argentin: Encuentro.
235. Lapornik, B., Prošek, M. y Wondra, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2), 214-222.
236. Leal-Díaz, A., Noriega, L., Torre-Villalvazo, I., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., López-Romero, P., Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Furuzawa-Carballeda, J., Velázquez-Vilegas, L., Ávila-Nava, A., Ordáz, G., Gutiérrez-Urbe, J., Serna-Saldivar, S. y Tovar, A. (2016). Aguamiel concentrate from *Agave salmiana* and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased *Akkermansia muciniphila* in C57BL6 mice. *Scientific reports*, 6, 34242.
237. Leal-Díaz, A., Santos-Zea, L., Martínez-Escobedo, H., Guajardo-Flores, D., Gutiérrez-Urbe, J., y Serna-Saldivar, S. (2015). Effect of *Agave americana* and *Agave salmiana* ripeness on saponin content from aguamiel (agave sap). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15), 3924-3930.

238. Lee, J., Mo, E., Choi, J., Jo, Y., Jang, H., Jeong, J., Jin, Q., Chung, H., Yeon, H. y Lee, M. (2016). Effect of Korean Red Ginseng extraction conditions on antioxidant activity, extraction yield, and ginsenoside Rg1 and phenolic content: optimization using response surface methodology. *Journal of ginseng research*, 40(3), 229-236.
239. Leonov, A., Arlia-Ciommo, A., Piano, A., Svistkova, V., Lutchman, V., Medkour, Y. y Titorenko, V. (2015). Longevity extension by phytochemicals. *Molecules*, 20(4), 6544-6572.
240. Leyton, M., Mellado, M., Jara, C., Montenegro, I., González, S., & Madrid, A. (2015). Free radical-scavenging activity of sequential leaf extracts of *Embothrium coccineum*. *Open Life Sciences*, 10(1).
241. Lima, V. N., Oliveira-Tintino, C. D., Santos, E. S., Morais, L. P., Tintino, S. R., Freitas, T. S., Geraldo, Y. S., Pereira, R. L., Cruz, R. P., Menezes, I. R. y Coutinho, H. D. (2016). Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial pathogenesis*, 99, 56-61.
242. Lira, R., Casas, A. y Blancas, J. (2016). *Ethnobotany of México: interactions if People and Plants in Mesoamerica*. New York, EU: Editorial Springer.
243. Llorent-Martínez, E., Spínola, V., Gouveia, S. y Castilho, P. (2015). HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Industrial Crops and Products*, 69, 80-90.
244. Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., y Simões, M. (2015). Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
245. López-Romero, J., Ayala-Zavala, J., Peña-Ramos, E, Hernández, J. y González-Ríos, H. (2018). Antioxidant and antimicrobial activity of *Agave angustifolia* extract on overall quality and shelf life of pork patties stored under refrigeration. *Journal of food science and technology*, 55(11), 4413-4423.
246. Lopez-Romero, J., González-Ríos, H., Borges, A. y Simões, M. (2015). Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
247. López-Romero, J., Ayala-Zavala, J., González-Aguilar, G., Peña-Ramos, E. y González-Ríos, H. (2018). Biological activities of *Agave* by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2461-2474.
248. Lou, S. N., Lai, Y. C., Hsu, Y. S., y Ho, C. T. (2016). Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. *Food chemistry*, 197, 1-6.
249. Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., y Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of food science*, 76(6), M398-403.
250. Lozano, M., García, S., Heredia, N. y Castro, R. (2011). Species of *Agave* induces morphological changes in *Aspergillus parasiticus* spore and *Aspergillus flavus* link ex fries. *Journal of food agriculture and environment*, 9(2), 768-771.

251. Lozano, M., Ticona, E., Carrasco, C., Flores, Y., y Almanza, G. R. (2012). Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd. *Revista Boliviana de Química*, 29(2), 131-138.
252. Ma, C., Wang, C., Acevedo-Vélez, C., Gellman, S. y Abbott, N. (2015). Modulation of hydrophobic interactions by proximally immobilized ions. *Nature*, 517(7534), 347.
253. Mabrouki, L., Zougari, B., Bendhifi, M. y Borgi, M. A. (2015). Evaluation of antioxidant capacity, phenol and flavonoid contents of *Opuntia streptacantha* and *Opuntia ficus indica* fruits pulp. *Nature & Technology*, (13), 2.
254. Madrigal-Carballo, S., Haas, L., Vestling, M., Krueger, C. y Reed, J. (2016). Non-covalent pomegranate (*Punica granatum*) hydrolyzable tannin-protein complexes modulate antigen uptake, processing and presentation by a T-cell hybridoma line co-cultured with murine peritoneal macrophages. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(8), 960-968.
255. Maity, S., Das, K., y Mandal, N. (2016). To investigate which solvent extract (aqueous, methanol, acetone and hexane) of Apple banana is more potent content of phytochemical. *International Journal of physiology*, 1(1), 33-45.
256. Malinow, M., McLaughlin, P., Stafford, C., Livingston, A., Kohler, G. y Cheeke, P. (1979). Comparative effects of alfalfa saponins and alfalfa fiber on cholesterol absorption in rats. *The American journal of clinical nutrition*, 32(9), 1810-1812.
257. Mansour, M., Nagi, M., El-Khatib, A. y Al-Bekairi, A. (2002). Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell biochemistry and function*, 20(2), 143-151.
258. Mansour, R., Jilani, I., Bouaziz, M., Gargouri, B., Elloumi, N., Attia, H., Attia, H., Ghrabi-Gammar, Z. y Lassoued, S. (2016). Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*. *Cytotechnology*, 68(1), 135-142.
259. Marco, F., Mensa, L., Vila, J. y Ruiz, J. (2008). Quinolone resistance among *Shigella* spp isolated from travellers returning from India. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(3), 279-281.
260. Mardirossian, M., Grzela, R., Giglione, C., Meinel, T., Gennaro, R., Mergaert, P., y Scocchi, M. (2014). The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chemistry & biology*, 21(12), 1639-1647
261. Marinova, D., Ribarova, F. y Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the university of chemical technology and metallurgy*, 40(3), 255-260.
262. Markom, M., Hasan, M., Daud, W., Singh, H. y Jahim, J. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52(3), 487-496.
263. Marques, M., Freitas, R., Carlos, A., Siguemoto, É., Fontanari, G. y Arêas, J. (2015). Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. *Food chemistry*, 168, 288-293.

264. Martínez-Ramírez, A., Contreras-Esquivel, J. y Belares-Cerda, R. (2010). Extracción de polifenoles asistida por microondas a partir de *Punica granatum* L. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2(4), 234-238.
265. Martínez, M. (2011). Enfermedad diarreica aguda en niños. Agentes causales más comunes en una comunidad de Chalco Central. *Pediatría*, 38(3), 45-51.
266. Martínez, R. (2012). Botanic. <http://botanicmontserrat.blogspot.mx/2011/11/agave-americana.html>
267. Martini, L. (2017). A hedonic response to an assay made on octogenarians using cosmetics that promise to donate comfort, attractiveness and youth. *Our Dermatology Online*, 8(2), 156.
268. Masaoud, M., Ripperger, H., Porzel, A., y Adam, G. (1995). Flavonoids of dragon's blood from *Dracaena cinnabari*. *Phytochemistry*, 38(3), 745-749.
269. Masisi, K., Beta, T. y Moghadasian, M. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: a review on in vitro and in vivo studies. *Food chemistry*, 196, 90-97.
270. McMurry, J. (2012). *Química orgánica*. Editorial CENGAGE.
271. Medina-Galván, M. I., González-Cruz, L., Juárez-Goiz, J. M. S., y Bernardino-Nicanor, A. (2016). Propiedades nutraceuticas y nutricionales del escapo floral de *Agave salmiana*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1), 508-514.
272. Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R. y Abdelly, C. (2014). Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for science*, 8(3), 216-224.
273. Mehrotra, V., Mehrotra, S., Kirar, V., Shyam, R., Misra, K., Srivastava, A. K. y Nandi, S. P. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous extract of *Withania somnifera* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(1), 40-45.
274. Melton, C. 2008. Nature Photography. <http://www.nearfamous.com/Pages/NectarBats.html>
275. Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F. y Aguilar, C. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 445-450.
276. Mensor, L., Menezes, F., Leitão, G., Reis, A., Santos, T., Coube, C., y Leitão, S. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*, 15(2), 127-130.
277. Mercado-Mercado, G., De la Rosa, L., Wall-Medrano, A., López, J., Álvarez, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), 36-46
278. Mesa, A., Zapata, S., Arana, L., Zapata, I., Monsalve, Z., y Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1).

279. Meziyani, S., Oomah, B., Zaidi, F., Simon-Levert, A., Bertrand, C. y Zaidi-Yahiaoui, R. (2015). Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbial pathogenesis*, 78, 95-102.
280. Miranda, E., Espinosa, J., Centurión, D., Velázquez, J. y Alor, M. 2012. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friefrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(4), 354-361.
281. Mišík, V., Bezáková, L., Máleková, E., & Košťálová, D. (1995). Lipxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. *Planta medica*, 61(04), 372-373.
282. Mohammed, M., Osman, W., Garelnabi, E., Osman, Z., Osman, B., Khalid, H. y Mohamed, M. (2014). Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *J Phytopharmacol*, 3, 275-85.
283. Mokrani, A. y Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68-76.
284. Monroy, Y., Rodrigues, R., Sartoratto, A., y Cabral, F. (2016). Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol, and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 250-259.
285. Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología*, 29, 73-82.
286. Morais, D., Rotta, E., Sargi, S., Schmidt, E., Bonafe, E., Eberlin, M., Sawaya, A. y Visentainer, J. V. (2015). Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI (–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International*, 77, 392-399.
287. Morales-Luckie, R., Lopezfuentes-Ruiz, A., Olea-Mejía, O., Liliana, A., Sanchez-Mendieta, V., Brostow, W. y Hinestroza, J. (2016). Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Heterotheca inuloides* as reducing agent and natural fibers as templates: Agave lechuguilla and silk. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 429-436.
288. Morales-Pérez, E., Morales-Rosales, E., Franco-Mora, O., Pérez-López, D., González-Huerta y A., Urbina, E. (2014). Producción de flores de *Gerbera jamesonii* cv. “Dream” en función de los ácidos giberélico y salicílico. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 83(1), 333-340.
289. Moreau, R., Powella, M. y Singhb, V. (2003). Pressurized Liquid Extraction of Polar and Nonpolar Lipids in Corn and Oats with Hexane, Methylene Chloride, Isopropanol, and Ethanol.
290. Msaada, K., Jemia, M. B., Salem, N., Bachrouh, O., Sriti, J., Tammar, S., Bettaieb, I., Jabri, I., Kefi, F. y Marzouk, B. (2017). Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit varieties. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3176-S3183.

291. Muhacir-Güzel, N., Türkyılmaz, M., Yemiş, O., Tağı, Ş. y Özkan, M. (2014). Changes in hydrolysable and condensed tannins of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juices from sacs and whole fruits during production and their relation with antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 933-940
292. Mukarram, S., Sadiq, A., Hassan, S. y Khan, S. (2014). Extraction of saponins and toxicological profile of *Teucrium stocksianum* boiss extracts collected from District Swat, Pakistan. *Biological Research*, 47(1), 60-65.
293. Muñiz-Márquez, D. B., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., y Aguilar-González, C. N. (2013). Producción Artesanal del Aguamiel: Una Bebida Tradicional Mexicana. *Producción Artesanal del Aguamiel: Una Bebida Tradicional Mexicana*. Artisanal Production of Aguamiel: A Traditional Mexican Beverage. *Artisanal Production of Aguamiel: A Traditional Mexican Beverage*. *Revista Científica*, 5(10).
294. Muthukrishnan, S. y Manogaran, P. (2018). Phytochemical analysis and free radical scavenging potential activity of *Vetiveria zizanioides* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 1955-1960.
295. Muthusamy, V., Anand, S., Sangeetha, K., Sujatha, S., Arun, B. y Lakshmi, B. (2008). Tannins present in *Cichorium intybus* enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition. *Chemico-biological interactions*, 174(1), 69-78.
296. Nabi, S., Ahmed, N., Khan, M., Bazai, Z., Yasinzai, M. y Al-Kahraman, Y. (2012). In vitro antileishmanial, antitumor activities and phytochemical studies of methanolic extract and its fractions of *Juniperus Excelsa* Berries. *World Applied Sciences Journal*, 19(10), 1495-1500.
297. Nasri, S. y Salem, H. (2012). Effect of oral administration of *Agave americana* or *Quillaja saponaria* extracts on digestion and growth of Barbarine female lamb. *Livestock Science*, 147(1-3), 59-65.
298. Naufalin, R., y Herastuti, S. R. (2017). Antibacterial activity of *Nicolaia speciosa* fruit extract. *International Food Research Journal*, 24(1), 379.
299. Nava-Cruz, N., Medina-Morales, M., Martinez, J., Rodriguez, R. y Aguilar, C. (2015). *Agave* biotechnology: an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 35(4), 546-559.
300. Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., y Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*, 59(3), 181-196.
301. Nayak, B., Liu, R. y Tang, J. (2015). Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(7), 887-918.
302. Negri, R. (2015). Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia*, 106, 92-109.
303. Nicklisch, S. y Waite, J. (2014). Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins. *MethodsX*, 1, 233-238.
304. Nimse, S. y Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.

305. Nitiema, L., Savadogo, A., Simporé, J., Dianou, D. y Traore, A. (2012). In vitro antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. *Int J Microbiol Res*, 3(3), 183-7.
306. Noriega, L. (2008). *Listeria monocytogenes*: vieja bacteria, desafío permanente. *Revista Chilena de Infectología*, 25(5), 326-327.
307. Ocampo, R., Ríos, L., Betaneur, L. y Ocampo, D. (2008). Curso práctico de química orgánica, enfocado a biología y alimentos. Colombia: Editorial Universidad de Caldas.
308. Ohtsuki, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Kawahara, N., Goda, Y., Yamaguchi, N. y Ishibashi, M. (2004). New chlorogenic acid hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(14), 3841-3845.
309. Okeke, M., Iroegbu, C., Eze, E., Okoli, A. y Esimone, C. (2001). Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrinensis* for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 78(2-3), 119-127.
310. Okunade, A. L. (2002). *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*, 73(1), 1-16.
311. Oliveira, A., Sá, I., Pereira, D., Gonçalves, R., Andrade, P. y Valentão, P. (2017). Exploratory Studies on the in Vitro Anti-inflammatory Potential of Two Herbal Teas (*Annona muricata* L. and *Jasminum grandiflorum* L.), and Relation with Their Phenolic Composition. *Chemistry & biodiversity*, 14(6), e1700002.
312. Olvera-García, V., Granado-Serrano, A., Jove, M., Cassanye, A., Cardador-Martínez, A., Portero-Otin, M. y Serrano, J. (2017). Characterization of antioxidant properties and metabolite profile of *Agave atrovirens* extracts. *bioRxiv*, 184226.
313. Orestes, J., Meneses, A., Simonet, A., Macías, F., Nogueiras, C., Gómez, A. y Escario, J. (2008). Saponinas esteroidales de la planta de *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Revista de biología tropical*, 56(4), 45-56.
314. Orozco, A., Escareño, J., Vaquera, S. y Ramírez, M. (2011). Bactericidal evaluation total extracts of *Amaranthus hybridus* and *Ruta graveolens* transmitters applied to bacteria ETA's. *British Journal of Biomedical Science*, 63(2), 345-351.
315. Oueslati, S., Ksouri, R., Falleh, H., Pichette, A., Abdelly, C. y Legault, J. (2012). Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda frutescens* Forssk. *Food Chemistry*, 132(2), 943-947.
316. Ozlem, G. y Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231-258.
317. Pagliarulo, C., De Vito, V., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P. y Volpe, M. (2016). Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food chemistry*, 190, 824-831.
318. Pandey, A., y Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5).
319. Parra, A. 2013. Química orgánica ambiental. <http://www.ugr.es/~quiorred/qaamb/qaamb.htm>

320. Parveen, Z., Deng, Y., Saeed, M. K., Dai, R., Ahamad, W., y Yu, Y. H. (2007). Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi*, 127(8), 1275-1279.
321. Pascual, R. y Calderón, V. (2010). *Microbiología alimentaria*. Madrid, España: Díaz de Santos.
322. Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M., Carvalho, A., Domingues, V., Gomes, A., Becker, H., Longhinotti, E. y Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172, 462-468.
323. Pedras, M. S., y Yaya, E. E. (2015). Plant chemical defenses: are all constitutive antimicrobial metabolites phytoanticipins?. *Natural product communications*, 10(1), 209-218.
324. Pękal, A. y Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776-1782.
325. Peñarrieta, J., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. y Bravo, J. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
326. Pereira, G., Ribeiro, M., da Silva, B. y Parente, J. (2017). Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. *Marginata* and a preliminary investigation of its in vivo antiulcerogenic activity and in vitro membrane permeability property. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(18), 4345-4349.
327. Pereira, M., Justino, A., Martins, M., Peixoto, L., Vilela, D., Santos, P., Teixeira, T., da Silva, C., Goulart, L., Pivatto, M. y Espindola, F. (2017). Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial crops and products*, 97, 324-329.
328. Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.
329. Pérez, A., Calle, J., Simonet, A., Guerra, J., Stochmal, A. y Macías, F. (2013). Bioactive steroidal saponins from *Agave offoyana* flowers. *Phytochemistry*, 95, 298-307.
330. Pérez, A., Simonet, A., Calle, J., Pecio, L., Guerra, J., Stochmal, A. y Macías, F. A. (2014). Phytotoxic steroidal saponins from *Agave offoyana* leaves. *Phytochemistry*, 105, 92-100.
331. Pérez, M., Bone, E., Parra, J., Rosero, C. y Blanco, O. (2017). Determinación de componentes nutricionales presentes en las hojas secas de *Annona muricata* L. (Guanábana). *Cumbres*, 3(1), 09-16.
332. Perricone, N. (2004). *La promesa de la eterna juventud*. Barcelona, España: Robin Book.
333. Pinheiro, A., Monalise, A., Fett, R. y Block, J. (2009). Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts obtained by sequential extraction. *Grasas y Aceites*.
334. Pinos-Rodríguez, J., Zamudio, M., y González, S. (2008). The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African journal of animal Science*, 38(1), 43-50.

335. Porroche, E. (2013). La preferencia por lo natural. <http://sabahspa.es/blog/la-preferencia-por-lo-natural/>
336. Proença, S. y Sajo, M. (2008). Anatomy of the floral scape of Bromeliaceae. *Brazilian Journal of Botany*, 31(3), 399-408.
337. Puente-Garza, C., Espinosa-Leal, C. y García-Lara, S. (2018). Steroidal Saponin and Flavonol Content and Antioxidant Activity during Sporophyte Development of Maguey (*Agave salmiana*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(4), 287-294.
338. Puri, P., y Walker, W. H. (2016). The regulation of male fertility by the PTPN11 tyrosine phosphatase. In *Seminars in cell & developmental biology*, 59(1), 27-34.
339. Raaman, N. (2006). *Phytochemical techniques*. Nueva Delhi, India: Agencia de Nueva Delhi.
340. Rackova, L., Oblozinsky, M., Kostalova, D., Kettmann, V., & Bezakova, L. (2007). Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of Mahonia aquifolium extract and isoquinoline alkaloids. *Journal of Inflammation*, 4(1), 15.
341. Raisa, I., Jyothilakshmi, M. y Layha, M. (2015). Isolation and quantification of tannins from the root bark of *Clerodendrum infortunatum* linn. And assessment of their antioxidant potential and antiproliferative effect on HCT-15 cells. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(10), 170-175.
342. Ramakrishna, H., Murthy, S., Divya, R., MamathaRani, D., y Panduranga Murthy, G. (2012). Hydroxy radical and DPPH scavenging activity of crude protein extract of *Leucas linifolia*: A folk medicinal plant. *Asian J Plant Sci Res*, 2(1), 30-5.
343. Rao, S., Schwarz, L., Santhakumar, A., Chinkwo, K. y Blanchard, C. (2018). Cereal phenolic contents as affected by variety and environment. *Cereal Chemistry*, 95(5), 589-602.
344. Rauha, J., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. y Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology*, 56(1), 3-12.
345. Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Shah, S., y Harish, R. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. *Materials Letters*, 180, 264-267.
346. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
347. Reenu, J., Azeez, S., y Bhageerathy, C. (2015). In vitro antioxidant potential in sequential extracts of *Curcuma caesia* roxb. rhizomes. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 77(1), 41.
348. Rendón-Huerta, J. A., Juárez-Flores, B., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., y Delgado-Portales, R. E. (2012). Effects of different sources of fructans on body weight, blood metabolites and fecal bacteria in normal and obese non-diabetic and diabetic rats. *Plant foods for human nutrition*, 67(1), 64-70.

349. Reyes-Munguía, A., Azúara-Nieto, E., Beristain, C., Cruz-Sosa, F. y Vernon-Carter, E. 2009. Propiedades antioxidantes del maguey morado (*Rhoeo discolor*). *Journal of Food*, 7(3), 209-216.
350. Reynoso, S., García, J., López, W. y López, A. (2012). Identificación taxonómica de las especies de *Agave* utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas. México: Postal.
351. Rezgui, A., Mitaine-Offer, A., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P. y Lacaille-Dubois, M. (2016). Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stelzneri*. *Phytochemistry*, 123, 40-47.
352. Ribeiro, B., Alviano, D., Barreto, D. y Coelho, M. (2013). Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 736-743.
353. Ribeiro, B., Coelho, M. y Marrucho, I. (2013). Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. *European Food Research and Technology*, 237(6), 965-975.
354. Ringuelet, J. y Viña, S. (2010). *Productos naturales vegetales*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de la Planta.
355. Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. y Verde-Star, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. México: OmniaScience.
356. Rizwon, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-U-Haq, M. y De Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. *International Journal of molecular sciences*, 13(5), 6440-6451.
357. Roby, M., Sarhan, M., Selim, K., y Khalel, K. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
358. Rocha-Guzman, N., Gonzalez-Laredo, R., Gallegos-Infante, J. y Lares-Assef, I. (2007). Evaluación biológica del efecto de extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* sobre células transformados. aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios, Tellez-Luis, SJ, G. Bustos-Vazquez, GV De la cruz, (Eds.). Plaza y Valdes-UAT, 219-237.
359. Rodríguez-Rodríguez, J., Amaya-Guerra, C., Caballero-Mata, P., Alanís-Guzmán, M., Aguilera-González, C., Báez-González, J., Moreno, S. y Núñez-González, A. (2014). Optimización de un método para determinación de fitoesteroles y escualeno en ácidos grasos destilados usando la metodología de superficie de respuesta y su validación. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(4), 1-10.
360. Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(1), 464-475.
361. Rodríguez, S. y Nereyda, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos en la conservación de frutras y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
362. Rojas-Barquera, D., y Narváz-Cuenca, C. (2009). Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava*

- L.) cultivadas en Colombia Vitamin C, total phenolic compounds and antioxidant activity in guava (*Psidium guajava* L.) fruits from Colombia. *Química Nova*, 32(9), 2336-2340.
363. Romero-López, M., Osorio-Díaz, P., Flores-Morales, A., Robledo, N. y Mora-Escobedo, R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during in vitro fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 281-292.
364. Rosas, A., Sánchez, E., García, S., Heredia, N. y Bhatnagar, D. (2011). Extracts of *Agave americana* inhibit aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *World Mycotoxin Journal*, 4(1), 37-42.
365. Roumeas, L., Aouf, C., Dubreucq, E. y Fulcrand, H. (2013). Depolymerisation of condensed tannins in ethanol as a gateway to biosourced phenolic synthons. *Green Chemistry*, 15(11), 3268-3275.
366. Roy, H., Chakraborty, A., Bhanja, S., Nayak, B., Mishra, S. y Ellaiah, P. (2010). Preliminary phytochemical investigation and anthelmintic activity of *Acanthospermum hispidum* DC. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2(5), 217-221.
367. Ruíz, C., Díaz, C., Anaya, J. y Rojas, R. (2013). Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1), 29-36.
368. Ruíz, G., Constantino, F., Quintana, J., Cedillo, C. y Urquiza, O. (2008). Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda. *Patología veterinaria de México*, 39(2), 145-160.
369. Ruíz, J. y Roque, M. (2009). Antimicrobial activity of four plants from Peruvian north-east. *Ciencia e Investigación*, 12(1), 41-47.
370. Ruíz, S., Venegas, E., Ruidías, D., Horna, L. y López, W. (2013). In vitro antioxidant capacity of total flavonoids obtained from leaves of *Sambucus peruviana* H.B.K (sauco) from Huamachuco city. *Revista Farmaciencia*, 1(2), 57-64
371. Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B. y Ayed, N. (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial crops and Products*, 40, 239-246.
372. Sacconnay, L., Ryckewaert, L., dos Santos Passos, C., Guerra, M. C., Kato, L., de Oliveira, C., Hneriques, A., Carrupt, P., Simoes-Pires, C. y Nurisso, A. (2015). Alkaloids from *Psychotria target sirtuins*: in silico and in vitro interaction studies. *Planta medica*, 81(06), 517-524.
373. Sáenz, M. T., Garcia, M. D., Quilez, A., y Ahumada, M. C. (2000). Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L.(Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L.(Vitaceae). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(7), 552-554.
374. Sagrillo, M., Garcia, L., de Souza Filho, O., Duarte, M., Ribeiro, E., Cadoná, F. y da Cruz, I. (2015). *Tucuma* fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food chemistry*, 173, 741-748.

375. Saheed, S. y Tom, A. (2016). Research Article Antimicrobial and Antidiarrheal Activities of *Pelargonium luridum* (Andrews) Sweet Root Extracts. *Pharmacologia*, 7, 202-210.
376. Salazar-Pineda, D., Castro-Alarcon, N., Moreno-Godinez, M., del Pilar Nicasio-Torres, M., Perez-Hernandez, J. y Alvarez-Fitz, P. (2017). Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of Extracts and Fractions from *Agave cupreata*. *International Journal of Pharmacology*, 13, 1063-1070.
377. Salinas, D., Arteaga, G., León, I., Dorado, O., Valladares, G. y Navarro, V. 2009. Actividad antimicrobiana de las plantas medicinales de la reserva de la biosfera Sierra de Huautla en Morelos. *Polibotánica*, 28(2), 134-145.
378. Salusu, H., Ariani, F., Obeth, E., Rayment, M., Budiarmo, E., Kusuma, I. y Arung, E. (2017). Phytochemical screening and antioxidant activity of selekop (*Lepisanthes amoena*) fruit. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 39(2), 214-218.
379. Sanjukta, S. y Rai, A. (2016). Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 1-10.
380. Santhi, K. y Sengottuvel, R. (2016). Qualitative and quantitative phytochemical analysis of *Moringa concanensis* Nimmo. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 5(1), 633-640.
381. Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A., Cortés-Ceballos, E. y Gutiérrez-Urbe, J. (2012). *Agave* (*Agave* spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8(3), 1-14.
382. Santos, J., Branco, A., Silva, A., Pinheiro, C., Neto, A., Uetanabaro, A. P., Queiroz, S. y Osuna, J. (2009). Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).
383. Santos, J., Vieira, I., Braz-Filho, R., y Branco, A. (2015). Chemicals from *Agave sisalana* biomass: isolation and identification. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8761-8771.
384. Santos, M. y Gonçalves, É. 2016. Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 7-14
385. Santos, S., Ruíz, V., Gutiérrez, M., Jiménez, H. y Aguirre C. 2006. Quiote *Agave* lechuguilla, una fuente importante como alimento nutritivo. *Revista Latinoamericana de Química*, 38(7), 11-13.
386. Sarbadhikary, S, Bhowmik, S., Datta, B. y Mandal, N. (2015). Antimicrobial and antioxidant activity of leaf extracts of two indigenous angiosperm species of Tripura. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(8), 643-655.
387. Sarshar, S., Sendker, J., Qin, X., Goycoolea, F. M., Karam, M. A., Habibi, M., Bouzari, S., Dobrindt, U. y Hensel, A. (2018). Antiadhesive hydroalcoholic extract from *Apium graveolens* fruits prevents bladder and kidney infection against uropathogenic *E. coli*. *Fitoterapia*, 127(1), 237-244.
388. Sati, O. P., Pant, G., Miyahara, K., & Kawasaki, T. (1985). Cantalasonin-1, a novel spirostanol bisdesmoside from *Agave cantala*. *Journal of Natural Products*, 48(3), 395-399.

389. Scartezzini, P. y Speroni, E. (2000). Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), 23-43.
390. Schofield, P., Mbugua, D. y Pell, A. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1-2), 21-40.
391. Semenya, S., Potgieter, M., Tshisikhawe, M., Shava, S., y Maroyi, A. (2012). Medicinal utilization of exotic plants by Bapedi traditional healers to treat human ailments in Limpopo province, South Africa. *Journal of ethnopharmacology*, 144(3), 646-655.
392. Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z. y Ercisli, S. (2009). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1).
393. Sewlikar, S. y D'Souza, D. (2017). Antimicrobial Effects of Quillaja saponaria Extract Against Escherichia coli O157: H7 and the Emerging Non-O157 Shiga Toxin-Producing E. coli. *Journal of food science*, 82(5), 1171-1177.
394. Shafique, S., Shafique, S. y Ahmad, A. (2018). Biochemical and molecular screening of varieties of chili plants that are resistant against Fusarium wilt infection. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8(1), 12-19.
395. Shahidi, F. y Chandrasekara, A. (2015). Processing of millet grains and effects on non-nutrient antioxidant compounds. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 345-352).
396. Sharapin, N. (2010). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia: CAB.
397. Shene, C., Reyes, A., Villarroel, M., Sineiro, J., Pinelo, M. y Rubilar, M. (2009). Plant Location and Extraction Procedure Strongly Alter the Antimicrobial Activity of Murta Extracts. *European Food Research and Technology*, 228(2), 467-475.
398. Shi, C., Che, M., Zhang, X., Liu, Z., Meng, R., Bu, X., Ye, H. y Guo, N. (2018). Antibacterial activity and mode of action of totarol against Staphylococcus aureus in carrot juice. *Journal of food science and technology*, 55(3), 924-934.
399. Shikano, I. (2017). Evolutionary ecology of multitrophic interactions between plants, insect herbivores and entomopathogens. *Journal of chemical ecology*, 43(6), 586-598.
400. Shoaib, M., Shah, S., Ali, N., Shah, I., Ullah, S., Ghias, M., Nawaz, M., Gul, F., Akhtar, S., Ullah, A., Akbar, W. y Ullah, A. (2016). Scientific investigation of crude alkaloids from medicinal plants for the management of pain. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 170-178.
401. Shukla, S., Park, J., Kim, D., Hong, S., Lee, J., y Kim, M. (2016). Total phenolic content, antioxidant, tyrosinase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of water soluble extracts of noble starter culture Doenjang, a Korean fermented soybean sauce variety. *Food Control*, 59, 854-861.
402. SIAP. 2015. Cierre de la producción agrícola por cultivo y por estado. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/ientidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp)
403. Sidana, J., Singh, B., y Sharma, O. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22-46.

404. Siddhapura, S., Maharshi, A., y Thaker, V. (2011). Varietal difference in antifungal activity of some species of Agave. Archives of phytopathology and plant protection, 44(2), 135-141.
405. Silva-Montellano, A., y Eguiarte, L. (2003). Geographic patterns in the reproductive ecology of Agave lechuguilla (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. II. Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. American Journal of Botany, 90(5), 700-706.
406. Singh, P., Tanwar, N., Saha, T., Gupta, A. y Verma, S. (2018). Phytochemical Screening and Analysis of Carica papaya, Agave americana and Piper nigrum. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 7(2), 1786-1794.
407. Singleton, V., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol, 299(1), 152-178.
408. Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M. y Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. Industrial Crops and Products, 53, 46-54.
409. Smolskaitė, L., Venskutonis, P., y Talou, T. (2015). Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. LWT-Food Science and Technology, 60(1), 462-471.
410. Snyder, L., Kirkland, J., Glajch, J. 1997. Practical HPLC method development, 2da ed., John Wiley and Sons, USA.
411. Soto M. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de Piper peltatum L. y Piper aduncum L. procedentes de la región Amazonas. In Crescendo Institucional, 6(1), 105-116.
412. Soto-García, M. y Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de Pinus durangensis y Quercus sideroxyla. Maderas. Ciencia y Tecnología, 18(4), 701-714.
413. Soto, R., Lugo, E. C., Díaz, L., y Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de "agave lechuguilla" Torrey. e-Gnosis, 3.
414. Srinivasan, M. y Bhatia, I. (1953). The carbohydrates of Agave vera cruz Mill. Bioquímica, 55(1), 286-289.
415. Srinivasan, M. y Bhatia, I. (1954). The carbohydrates of Agave vera cruz Mill. 2. Distribution in the stem and pole. Bioquímica, 56(1), 256-259.
416. Sruthi, D. y Zachariah, T. (2017). In vitro antioxidant activity and cytotoxicity of sequential extracts from selected black pepper (Piper nigrum L.) varieties and Piper species. International Food Research Journal, 24(1).
417. Stanojević, L., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Čanadanovic-Brunet, J. y Tumbas, V. (2009). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of Hieracium pilosella L. extracts. Sensors, 9(7), 5702-5714.
418. Subramanian, S. S. y Nair, A. G. (1970). Chlorogenin and kaempferol glycosides from the flowers of Agave americana. Phytochemistry, 9(5), 2582-2588.

419. Sudha, G., Vadivukkarasi, S., Shree, R. y Lakshmanan, P. (2012). Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 661-668.
420. Sultana, B., Anwar, F., y Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167-2180.
421. Swathi, S. (2016). Phytochemical screening and TLC studies of *Moringa oleifera* extract: their antibacterial and antioxidant activities. *Int J Curr Pharm Res*. 8(1), 46-49.
422. Szakiel, A., Pączkowski, C. y Henry, M. (2011). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, 10(4), 471-491.
423. Taiz, L., Zeiger, E. (2010). *Fisiología vegetal*. USA: Book Print.
424. Tansaringkarn, S. y Ruangrunsi, N. (2008). Screening for free radical scavenging activity from ethanolic extract of mimosaceous plants endemic to Thailand. *J Health Res*, 22(2), 55-59.
425. Taroco, R., Sejia, V. y Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En: Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. *Temas de bacteriología y virología médica*. Uruguay: Editorial FEMUR.
426. Tatiya, A., Tapadiya, G., Kotecha, S., y Surana, S. (2011). Effect of solvents on total phenolics, antioxidant and antimicrobial properties of *Bridelia retusa* Spreng. stem bark.
427. Toribio, M., Oriani, D. y Skliar, M. (2004). Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis* y *Centaurea calcitrapa*. *Ars Pharmaceutica*, 45(4), 335-341.
428. Torres-Fuentes, C., del Mar Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M. y Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194-202.
429. Tovar-Robles, C., Perales-Segovia, C., Nava-Cedillo, A., Valera-Montero, L., Gómez-Leyva, J., Guevara-Lara, F., Hernández-Duque, J. y Silos-Espino, H. (2011). Effect of aguamiel (Agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science, North America*, 10(2), 106-110.
430. Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., Hajlaoui, H. y Abdelly, C. (2010). Solvent Effects on Phenolic Contents and Biological Activities of the Halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*, 43(3), 632-639.
431. Tsoi, B., Yi, R., Cao, L., Li, S., Tan, R., Chen, M., Li, X., Wang, C., Li, Y., Kurihara, H. y He, R. (2015). Comparing antioxidant capacity of purine alkaloids: A new, efficient trio for screening and discovering potential antioxidants in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 176, 411-419.
432. Turkmen, N., Sari, F., y Velioglu, Y. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food chemistry*, 99(4), 835-841.
433. Ullah, N., Parveen, A., Bano, R., Zulfiqar, I., Maryam, M., Jabeen, S., Liaqat, A. y Ahmad, S. (2016). In vitro and in vivo protocols of antimicrobial bioassay of medicinal herbal extracts: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 8(6), 660-667.

434. UNIBIO: colecciones biológicas. 2010.  
<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AGA1020173>
435. Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., y Venkitanarayanan, K. (2014). Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. *BioMed research international*, 2014.
436. Uribe, J. A., Santos-Zea, L., y Saldivar, S. R. (2017). U.S. Patent No. 9,585,928. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
437. Valle Jr, D., Andrade, J., Puzon, J., Cabrera, E. y Rivera, W. (2015). Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 5(7), 532-540.
438. Vargas, C. (2009). Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del Agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*) (Tesis de posgrado, magisterial). Instituto Politécnico Nacional. Michoacán, México.
439. Vega-Menchaca, M., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., Morales-Rubio, M. E., Núñez-González, M., Rivera-Guillén, M., Serrano-Gallardo, L. y Rivas-Morales, C. (2013). Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) IM Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(2), 24-30.
440. Veiga, R., De Mendonça, S., Mendes, P., Paulino, N., Mimica, M., Lagareiro Netto, A., Lira, I., López, B., Negrao, V. y Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of applied microbiology*, 122(4), 911-920.
441. Ventura, C., Martínez, N., Basurto, M. y Pérez, R. (2010). Los compuestos esteroidales o saponinas en la planta del desierto (*Yucca shidigera*) y sus aplicaciones. *Aventuras del pensamiento*, 5(8), 16-18.
442. Verástegui, Á., Verde, J., García, S., Heredia, N., Oranday, A. y Rivas, C. (2008). Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1249-1252.
443. Verástegui, M., Sánchez, C., Heredia, N. y García-Alvarado, J. (1996). Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(3), 175-177.
444. Verduzco, J., Predo, C. y Mercado, R. (2008). Caracterización e identificación taxonómica del Maguey. *Producción y aprovechamiento de plantas en el noroeste de México*, 4(2), 233-240.
445. Victório, C., Lage, C. y Kuster, R. (2010). Flavonoids extraction From *Alpinia zerumbet* (pers.) Burt et smith leaves using different procedures. *Eclética química*, 35(1), 35-41.
446. Voravuthikunchai, S., Lortheranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S. y Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 49-54.

447. Wadood, A., Ghufran, M., Jamal, S. B., Naeem, M., Khan, A. y Ghaffar, R. (2013). Phytochemical analysis of medicinal plants occurring in local area of Mardan. *Biochem Anal Biochem*, 2(4), 1-4.
448. Wafa, B., Makni, M., Ammar, S., Khannous, L., Hassana, A. B., Bouaziz, M., Eddine N. y Gdoura, R. (2017). Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 123-131.
449. Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Maier, C. y Stevens, J. (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food chemistry*, 192, 156-162.
450. Weng, X. y Gordon, M. (1992). Antioxidant activity of quinones extracted from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(8), 1331-1336.
451. Weng, Y., Yu, L., Cui, J., Zhu, Y. R., Guo, C., Wei, G., Duan, J., Yin, Y., Guan, Y., Wang, Y., Yang, Z., Xi, M. y Wen, A. (2014). Antihyperglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of total saponins extracted from *Aralia taibaiensis* in experimental type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(3), 553-560.
452. Wina, E., Muetzel, S. y Becker, K. (2005). The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production. *J. Agric. Food Chem*, 53(21), 8093-8105.
453. Wink, M. (2017). The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. In *Insect-Plant Interactions* (1992) (pp. 139-174). CRC Press.
454. Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(9), 1874-1905.
455. Xiao, W., Han, L., & Shi, B. (2008). Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. *Separation and Purification Technology*, 62(3), 614-618.
456. Xie, J. y Schaich, K. (2014). Re-evaluation of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4251-4260.
457. Xie, J., Dong, C., Nie, S., Li, F., Wang, Z., Shen, M. y Xie, M. (2015). Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. *Food chemistry*, 186, 97-105.
458. Xylia, P., Chrysargyris, A., Botsaris, G. y Tzortzakis, N. (2018). Mint and pomegranate extracts/oils as antibacterial agents against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* on shredded carrots. *Journal of Food Safety*, 38(1), 38(1), 1-8.
459. Yadav, B., Yadav, R., Yadav, R. y Garg, M. (2016). Antioxidant activity of various extracts of selected gourd vegetables. *Journal of food science and technology*, 53(4), 1823-1833.
460. Yadav, U., Ayre, B. y Bush, D. (2015). Transgenic approaches to altering carbon and nitrogen partitioning in whole plants: assessing the potential to improve crop yields and nutritional quality. *Frontiers in plant science*, 6, 275.

461. Yang, C. R., Zhang, Y., Jacob, M. R., Khan, S. I., Zhang, Y. J., y Li, X. C. (2006). Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(5), 1710-1714.
462. Yang, D., Xie, H., Jia, X. y Wei, X. (2015). Flavonoid C-glycosides from star fruit and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 16, 204-210.
463. Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1), 59-66
464. Yokosuka, A., Jitsuno, M., Yui, S., Yamazaki, M., y Mimaki, Y. (2009). Steroidal glycosides from *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Journal of natural products*, 72(8), 1399-1404.
465. Yokozawa, T., Chen, C., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. y Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical pharmacology*, 56(2), 213-222.
466. Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., Liang, Y. y Zhao, S. (2016). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1216-1223.
467. Yumar, E. y Cabrera, L. (2012). Inhibition of *Escherichia coli* isolated from milks of bovine with subclinical mastitis using aqueous extract from the Neem leaves in Valledupar Colombia. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2), 22-33.
468. Zeb, A., Sadiq, A., Ullah, F., Ahmad, S. y Ayaz, M. (2014). Investigations of anticholinestrase and antioxidant potentials of methanolic extract, subsequent fractions, crude saponins and flavonoids isolated from *Isodon rugosus*. *Biological research*, 47(1), 76.
469. Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R. y Aktumsek, A. (2015). Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: a phytochemical study. *Industrial Crops and Products*, 70, 1-6.
470. Zhang, H., Wang, G., y Dong, J. (2015). Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(1), 1-5
471. Zhang, X., Liu, L., y Lin, C. (2014). Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste. *Food Hydrocolloids*, 39, 10-18.
472. Zhao, J., Wang, Y., Yang, Y., Zeng, Y., Wang, Q., Shao, Y., Mei, L., Shi, Y. y Tao, Y. (2017). Isolation and identification of antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory compounds from fruit juice of *Nitraria tangutorum*. *Food chemistry*, 227, 93-101.
473. Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., y Świeca, M. (2016). The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi journal of biological sciences*, 23(5), 628-633.
474. Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., y Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.
475. Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C. y Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, 196, 885-896.

