Tamiz fitoquímico y evaluación antioxidante de pencas de agave silvestre y espadín

R. Torres-Carrera[1]., I. Sánchez-Bazán[1]., J.A. Del Ángel-Zumaya[1]., G. Vivar-Vera[1]., F. E. González-Jiménez[1].

[1]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Avenida Oriente 6, N° 1009, Rafael Alvarado, C.P 94340 Orizaba, Veracruz., México.

**franciscogonzalez02@uv.mx*

***Área de participación**: Ingeniería Química*

Resumen

En este estudio se evaluaron los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de las pencas de agave silvestre (*Agave rhodacantha* Trel.) y agave espadín (*Agave angustifolia* Haw.) provenientes del estado de Oaxaca. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis proximal con el objetivo de identificar posibles diferencias en los metabolitos primarios. A través de extracción continua en equipo Soxhlet se obtuvieron extractos de diferente grado de polaridad (hexano-cloroformo-etanol:agua) para cada variedad de agave. Mediante un tamiz fitoquímico, se identificaron flavonoides, cumarinas, terpenos, triterpenos, fitoesteroles, glicósidos cardiotónicos, sin embargo, dependiendo de la polaridad del disolvente utilizado en cada extracto se puede observar diferentes perfiles de metabolitos. Finalmente, se evaluó el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de cada extracto utilizando el método DPPH. Los resultados demuestran que las pencas de agave de la variedad espadín, en comparación al agave silvestre, poseen mayor cantidad de metabolitos secundarios y mayor actividad antioxidante y contenido de fenoles totales.

***Palabras clave**: Agave rhodacantha, Agave angustifolia, DPPH, IC_{50}.*

Abstract

In this study, the secondary metabolites and antioxidant activity of wild agave (*Agave rhodacantha* Trel.) and agave espadín (*Agave angustifolia* Haw.) stalks from the state of Oaxaca were evaluated. First, a proximate analysis was carried out to identify possible differences in primary metabolites. Extracts of different polarity (hexane-chloroform-ethanol:water) were obtained for each agave variety by continuous extraction in Soxhlet equipment. Through a phytochemical sieve, flavonoids, coumarins, terpenes, triterpenes, phytosterols, and cardiotonic glycosides were identified; however, depending on the polarity of the solvent used in each extract, different metabolite profiles can be observed. Finally, the total phenolic content and the antioxidant capacity of each extract were evaluated using the DPPH method. The results show that the agave leaves of the espadin variety, in comparison with wild agave, have a higher amount of secondary metabolites and a higher antioxidant activity and total phenolic content.

***Key words**: Agave rhodacantha, Agave angustifolia, DPPH, IC_{50}.*

Introducción

En México, una de las industrias más importantes en términos económicos es la industria del tequila y mezcal, en la cual la materia prima es el agave y de esta planta solo se aprovecha la parte central conocida como “piña” la cual representa el 60% del total de la planta. El 40% restante corresponde a las pencas, las cuales carecen de uso o aplicación agroindustrial y únicamente son dejadas en los plantíos para su incorporación a la tierra y que puedan llegar a actuar como abono, o en el peor de los escenarios simplemente son desechadas generando un problema de contaminación [1].

Ante tal problemática, se han buscado alternativas para el aprovechamiento de estos residuos, además, se vuelve oportuno para los productores contar con una actividad alterna que les permita generar un valor agregado, así como incursionar en nuevos mercados y sectores estratégicos para los negocios [2].
Debido a la composición característica de la planta de agave, su uso y su aprovechamiento representa una alternativa productiva sostenible y sustentable, en regiones en situación de pobreza, mediante el desarrollo y aplicación de estrategias basadas en un sistema de manejo en campo y procesos específicos para la obtención de productos destinados a un mercado especializado [3].
Existen estudios donde se demuestra que ciertas especies de agave han sido empleadas tradicionalmente para el tratamiento de algunas enfermedades crónico-degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (como por ejemplo el cáncer, la diabetes y la hipertensión) [4], así como trastornos digestivos [5]. Además, algunas especies presentan actividad antihipertensiva y antifúngica [6].
En casos más específicos se sugiere que los fructanos de *Agave tequilana* se pueden utilizar como aditivos alimentarios [7], se ha demostrado que los hidrolizados de *Agave lechuguilla* tienen potencial para la producción de butanol utilizando un co-cultivo [8], se ha obtenido bioetanol mediante la sacarificación enzimática de pencas de *Agave salmiana* [9], también se ha demostrado el potencial del polisacárido de bagazo de *Agave salmiana* como estabilizador de emulsión natural y potenciador de la actividad antiinflamatoria tópica de la indometacina [10], de igual forma el uso de agavinas de *Agave angustifolia y Agave potatorum* en productos lácteos tiene un valor agregado como ingrediente funcional en la fabricación de productos prebióticos y simbióticos bajos en grasas [11] y las especies de *Agave angustifolia* y *Agave tequilana* son utilizadas para la elaboración de papel [12], entre otras.
Por tal motivo, en el presente trabajo se realizó el estudio fitoquímico y antioxidante de las variedades de agave espadín (*Agave angustifolia* Haw.) y silvestre (*Agave rhodacantha* Trel.) las cuales son utilizadas por productores del estado de Oaxaca en la producción de mezcal y que su residuo representa una oportunidad para plantear estrategias de aprovechamiento agroindustrial.

Metodología

Materiales

Se utilizaron pencas de agave de la variedad espadín y mexicano silvestre originarias de la localidad de El Trapiche, perteneciente al municipio de Santa Cruz Mixtepec, perteneciente al distrito de Zimatlán de Álvarez en el estado de Oaxaca. Los reactivos químicos utilizados fueron grado ACS. El DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) fue adquirido de Sigma-Aldrich®

Análisis proximal de pencas de agave

El análisis proximal se efectuó de acuerdo con lo establecido en la AOAC [13], en donde las pencas de agave fueron evaluadas en términos de 5 componentes: humedad, cenizas, grasas, fibra y proteínas.

Obtención de extractos

La obtención de extractos se realizó en un extractor automatizado (ECOSHEL modelo SZF-06C) empleándose la metodología descrita por Ulbrich-Talamantes [14]. 8 g de cada variedad de agave previamente molido se sometieron al proceso de extracción utilizando 3 disolventes con distinta polaridad (hexano, cloroformo y etanol:agua 1:1). El tiempo de extracción fue de 4 h para cada disolvente, es decir, el proceso de extracción fue un proceso continuo de 12 horas iniciando la extracción con el solvente de menor polaridad (hexano), posteriormente con el disolvente de polaridad intermedia (cloroformo) y finalizando con el disolvente de mayor polaridad (etanol:agua 1:1). Finalmente, los extractos se concentraron a un volumen final de 50 mL con ayuda de un rotavapor (marca IKA) acoplado a una bomba de vacío. Los extractos obtenidos fueron colocados en frascos ámbar y se almacenaron en refrigeración hasta su posterior uso [15].

Tamiz fitoquímico

El tamizaje o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales en la investigación fitoquímica. Permite determinar de manera cualitativa los principales grupos de constituyentes químicos que contiene una planta en cuestión y, sobre eso, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. A través de un tamiz fitoquímico se evaluó la presencia de diversos metabolitos secundarios en cada uno de los extractos obtenidos de las 2 variedades de pencas. Estos metabolitos secundarios se evaluaron de manera cualitativa y los resultados se expresaron a través de una escala que va desde la ausencia del

metabolito (-), escasa presencia del metabolito (+), presencia moderada del metabolito (++) y presencia abundante del metabolito (+++).
Los fenoles y taninos fueron identificados mediante la reacción con $FeCl_3$ al 5%. La presencia de estos compuestos se confirma con la formación de un precipitado de color azul-verde debido al ataque del ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo ocasionando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro [16].
Los flavonoides fueron determinados mediante la reacción con H_2SO_4 donde su presencia se confirma a través de la formación de una coloración amarilla-naranja [17].
Las cumarinas fueron determinadas mediante la adición de NaOH al 10% donde la aparición de una coloración amarilla que desaparece al acidular con HCl confirma que la prueba es positiva [18].
Los terpenos y terpenoides fueron determinados mediante el ensayo de Liebermann-Burchard interpretando como positivo el ensayo con la aparición de una coloración verde para el caso de los terpenos y la formación de un anillo de color azul-verde para el caso de los terpenoides;
Los triterpenos [19] fueron determinados mediante el ensayo de Salkowski donde la aparición de una coloración amarillo dorado indica la presencia de compuestos que poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y en posición 5-6 (triterpenos) [20].
Los glicósidos cardiotónicos fueron determinados mediante el ensayo de Keller-Killani donde la formación de un anillo de color marrón en la interfase provocada por la reducción de los desoxiazúcares con soluciones ácidas indica que la prueba es positiva [21].
Las saponinas fueron determinadas mediante el ensayo de formación de espuma el cual se basa en la disminución de la tensión superficial de este metabolito cuando se encuentran disueltas en agua y al momento de ser agitadas vigorosamente producen una espuma de manera abundante y estable [22].

Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el protocolo de análisis fue el siguiente: 100 µL de cada extracto fue mezclado con 100 µL de agua desionizada, 1000 µL del reactivo de Folin-Ciocaltau (2 M) y 800 µL de carbonato de sodio (7.5 %). La mezcla fue agitada durante 10 segundos con un vortex e incubada a 25 °C ± 2°C durante 30 min en oscuridad. Transcurrido el tiempo la absorbancia fue medida a 760 nm (Thermo Scientific modelo GENESYS 10S). Los resultados fueron expresados como la media ± DE (n=3) en mg equivalentes de ácido gálico/100 gramos de muestra [23].

Actividad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se determinó por el método del DPPH, utilizando la técnica descrita por González-Jiménez *et a*l. [23]. La solución madre de DPPH se preparó con 0.0025 g de DPPH aforados a 100 mL con metanol. Esta solución se almacenó en un frasco ámbar, evitando así su descomposición por contacto con la luz y se utilizó máximo 1 hora después de haber sido preparado. El ensayo se realizó utilizando 1950 µL de la solución de DPPH con 50 µL de cada uno de los extractos a distintas concentraciones. Esta mezcla se depositó en tubos de ensaye, y se dejó incubar durante 30 min en ausencia de luz. Transcurrido el tiempo, se procedió a medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific modelo GENESYS 10S) a 515 nm. Los resultados se expresaron de acuerdo con su IC_{50} (concentración inhibitoria media) [24].

Análisis estadístico

Las determinaciones fueron realizadas por triplicado realizando un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) utilizando el programa de Excel® para el procesamiento de los datos con un valor de significancia estadística de $p<0.05$ [25].

Resultados y discusión

Análisis proximal

En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos en el análisis proximal para ambas variedades de agave en estudio. En lo que respecta al contenido de cenizas, lípidos y proteínas, se determinó que no existen diferencias significativas, además el bajo contenido de proteína y lípidos coincide con lo reportado en otras variedades (*Agave angustifolia, Agave tequilana, Agave salmiana* y *Agave lechuguilla*) [12]. El contenido de fibra muestra que la variedad espadín es significativamente mayor (9.54%) a la variedad silvestre (6.30%) lo cual puede relacionarse con las condiciones climáticas en donde se cultiva cada agave [26]. Debido al contenido de fibra y a que las pencas se consideran un residuo agroindustrial en la producción de bebidas destiladas (mezcal o tequila

principalmente) se han realizado estudios de aprovechamiento de pencas como una fuente potencial para la elaboración de papel [12]. Con los resultados obtenidos en el presente estudio se confirma que ambas variedades podrían incluirse en dichas alternativas de aprovechamiento.

Tabla 1. Análisis proximal de las pencas de agave espadín y silvestre

Agave	Humedad (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)	Fibra (%)	Proteínas (%)
Espadín	82.91±0.15[a]	2.41±0.07[a]	0.21±0.01[a]	9.54±0.01[a]	1.43±0.01[a]
Silvestre	76.93±0.03[b]	2.50±0.05 [a]	0.20±0.04[a]	6.30±0.01[b]	1.37±0.10[a]

Resultados expresados como la media (n=3) ± desviación estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05).

Tamiz fitoquímico

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del tamiz fitoquímico en cada uno de los 6 extractos (3 de variedad espadín y 3 de variedad silvestre).

En ambas variedades se logró identificar la presencia de flavonoides, cumarinas, terpenos, triterpenos, fitoesteroles, glicósidos cardiotónicos, sin embargo, dependiendo de la polaridad del disolvente utilizado en cada extracto (y la polaridad de los metabolitos) se puede observar diferentes perfiles de metabolitos. En lo que respecta a los flavonoides se observó una mayor presencia en la variedad espadín en comparación con la variedad silvestre y como era de esperarse a mayor polaridad del disolvente utilizado (etanol/agua>cloroformo>hexano) mayor fue la extracción de flavonoides. Respecto a las cumarinas, estas lograron identificarse en los 3 extractos de la variedad espadín, observándose una tendencia mayor en los extractos con menor polaridad (hexano y cloroformo) mientras que en la variedad silvestre únicamente se identificó en el extracto de cloroformo.

Respecto a los terpenos y triterpenos de manera general se identificaron en los extractos de mediana polaridad (cloroformo) de ambas variedades, sin embargo, se observa una mayor presencia en la variedad silvestre en comparación con la variedad espadín. Los fitoesteroles fue posible detectarlos en los extractos de etanol:agua en ambas variedades, esto se debe a su solubilidad en alcoholes la cual ha sido reportada [27]. También fue posible detectar en ambas variedades glicósidos cardiotónicos, siendo mayor su presencia en el extracto de cloroformo y a su vez mayor en la variedad espadín en comparación con la variedad silvestre. Finalmente, también se logró identificar saponinas en ambas variedades de agave y se observa una tendencia mayor en los extractos de menor polaridad (hexano y cloroformo), esto coincide con la baja polaridad de dichos compuestos reportada en la literatura [28].

Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados en los extractos de agave variedad espadín y silvestre

Metabolito	Agave Silvestre			Agave Espadín		
	H	C	E:A	H	C	E:A
Fenoles	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	+	++	-	+	+++
Cumarinas	-	+	-	++	++	+
Terpenos	-	++	++	-	+	-
Triterpenos	-	++	-	-	+	-
Terpenoides	-	-	-	-	-	-
Fitoesteroles	-	-	++	-	-	+++
Glicósidos cardiotónicos	-	++	+	-	+++	++
Saponinas	++	++	+	++	++	+

H: Hexano, C: Cloroformo, E:A: Etanol:Agua: (-) ausencia del metabolito; (+) escasa presencia del metabolito; (++) presencia moderada del metabolito; (+++) presencia abundante del metabolito.

En la literatura existen reportes de diversas especies del género Agave, donde se ha informado la presencia de saponinas, flavonoides y taninos principalmente en las pencas de agave de la variedad *Agave americana* [29] y en la variedad de *Agave lechuguilla* Torr [30]. El presente estudio permite explorar las posibilidades de aprovechamiento de las pencas de agave utilizadas en la industria del mezcal y tequila para obtener compuestos de interés industrial. Entre los metabolitos encontrados en este estudio, las saponinas tienden a ser las de mayor interés para ser utilizadas en la industria farmacéutica y química [31], pues presentan actividades biológicas antibacterianas [32], diuréticas [33] y molusquicidas [34] mientras que los flavonoides junto con las cumarinas poseen propiedades antioxidantes [35] y esto permite su aplicación en diversas áreas de la industria alimentaria y/o farmacéutica.

Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales mostró una correlación con los resultados obtenidos en el tamiz fitoquímico. En ambas variedades de agave no fue detectado contenido de fenoles totales en los extractos de hexano, lo cual es correlacionado con la baja polaridad del disolvente y por consiguiente la ausencia de compuestos fenólicos, los cuales han sido descritos como compuestos polares. En lo que respecta a los extractos de cloroformo fue posible cuantificar en la variedad silvestre 4.34 ±0.10 mg ácido gálico/100 g, mientras que en la variedad espadín se obtuvo 16.85 ±0.63 mg ácido gálico/100 g. Esto se correlaciona con los diversos metabolitos secundarios detectados mediante el tamiz fitoquímico, sin embargo, también es importante señalar que el método de Folin-Ciocalteu no es una medida absoluta de la cantidad de compuestos fenólicos ya que otras sustancias como ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, proteínas y otros compuestos presentes en los extractos pueden interferir [36]. Finalmente, en el extracto etanólico se cuantificó la mayor cantidad de compuestos fenólicos en ambas variedades de agave, en la variedad silvestre se obtuvo 204.26 ±11.34 mg ácido gálico/100 g mientras que en la variedad espadín se obtuvo la mayor concentración con 284.26 ±0.10 mg ácido gálico/100 g. De toda la gama de compuestos fenólicos, se ha informado que los flavonoides son los compuestos más importantes y principales responsables de las principales actividades farmacológicas [37], esto coincide con la cantidad de flavonoides detectados mediante el tamiz fitoquímico y que permite considerar oportunidades de aprovechamiento para ambas pencas.

Actividad antioxidante

La determinación de actividad antioxidante se realizó primero de manera cualitativa, en la cual se observó que los extractos de hexano y cloroformo de ambas variedades de agave no presentaron actividad antioxidante, esto puede deberse a que la mayoría de los metabolitos identificados en el tamiz fitoquímico pertenecientes a los extractos de baja y mediana polaridad (hexano y cloroformo, respectivamente), no cuentan con actividad antioxidante, como es el caso de los triterpenos, glicósidos cardiotónicos.
Por lo anterior, únicamente se procedió a determinar la actividad antioxidante en los extractos de etanol:agua de ambas variedades, los cuales debido principalmente a la presencia de flavonoides se les atribuye la capacidad antioxidante presentada. En la Figura 1 se muestran los gráficos obtenidos para calcula la IC_{50} de los extractos etanólicos de las variedades espadín y silvestre.

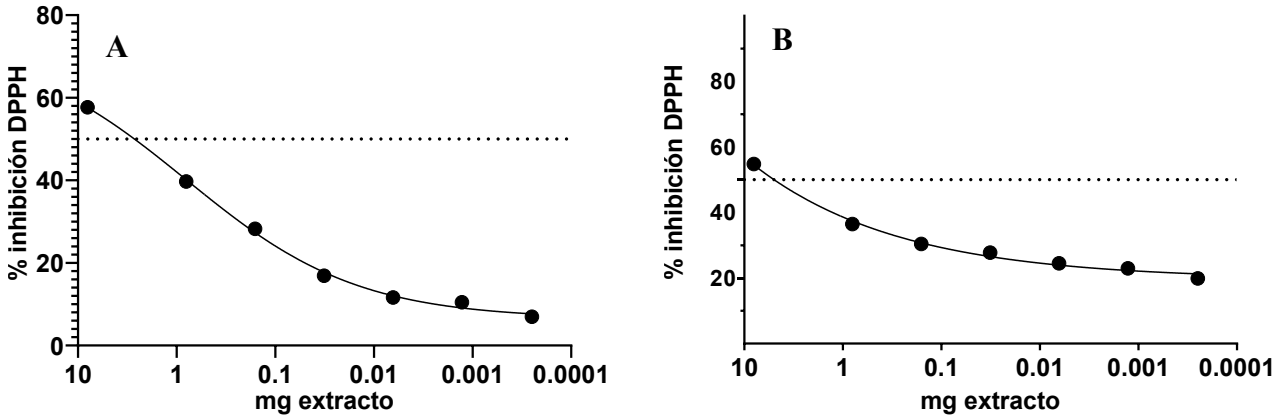


Figura 1. Inhibición del radical DPPH conforme a la concentración de extracto etanólico de variedad espadín (A) y variedad silvestre (B).

En la Figura 1A se observa el comportamiento de inhibición del extracto de la variedad espadín frente al radical DPPH, en ella se puede observar que presentó valores de inhibición en un rango de 57.68±0.23 % con 8 mg de extracto hasta 6.95±0.38 % utilizando 0.0012 mg de extracto. Con estos datos se obtuvo la IC_{50} de la variedad espadín, la cual fue establecida en 4.23 mg. Respecto a la variedad silvestre (Figura 1B) la IC_{50} obtenida fue de 7.16 mg con un rango de inhibición de DPPH de 54.78±0.48 % (8 mg extracto) a 19.86±0.14 % (0.0012 mg de extracto). En ambos extractos se encontró una capacidad de inhibición de DPPH dependiente de la concentración. Se sabe que la actividad antioxidante es el resultado de los efectos sinérgicos y antagonistas de las interacciones de diferentes compuestos [38] y en el presente trabajo se puede correlacionar la mayor capacidad antioxidante de la variedad espadín con los flavonoides detectados en el tamiz fitoquímico, dichos compuestos fitoquímicos han sido ampliamente reportados como los responsables de la actividad antioxidante y su potencial nutracéutico al ser relacionados directamente con sus actividades biológicas antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas por mencionar algunas [39] [40].

Trabajo a futuro

El tamiz fitoquímico fue una determinación cualitativa, por lo que se recomienda a futuro realizar una determinación cuantitativa mediante métodos cromatográficos con la finalidad de proponer aplicaciones de dichos compuestos como aditivos de interés en la industria alimentaria y/o farmacéutica.

Conclusiones

A través del tamiz fitoquímico se logró identificar que existen diferencias en los metabolitos secundarios presentes en las pencas de agave silvestre y agave espadín. Se demostró que la variedad espadín presentan una mayor actividad antioxidante (al presentar menor IC_{50}) lo cual se correlaciona con la mayor presencia de flavonoides los cuales son los principales compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante. Así mismo mediante el contenido de fenoles totales se evidenció que la mayor cantidad de compuestos fenólicos se encontraron en los extractos etanólicos, siendo mayor la concentración en la variedad espadín. Estos resultados permiten proponer el uso de las pencas de agave como prospectos para la extracción de metabolitos secundarios y aplicarlos en la industria farmacéutica y/o alimentaria en la obtención de aditivos debido a la capacidad antioxidante demostrada.
Este estudio permite contribuir al conocimiento acerca del aprovechamiento de los residuos generados por la industria mezcalera y tequilera para proponer alternativas de uso que proporcionen valor agregado a dicha industria.

Agradecimientos

Agradecemos a SOUTECH de México A.C. por proporcionar las diferentes pencas para el presente estudio. Así mismo agradecemos al laboratorio químico LADEQSA S.A de C.V por el apoyo técnico en el análisis de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos.

Referencias

[1] J. J. Cruz Faustino, P. Figueroa Castro, J. Á. Alcántara Jiménez, V. López Martínez and F. Silva García, “Vegetal synergists for trapping the adult of Scyphophorus acupunctatus Gyllenhal, in pheromone baited traps, in Agave Angustifolia Haw., in Morelos, Mexico”, Acta Zoológica Mexicana (nueva serie), vol. 35, pp. 1-9, 2019.
[2] L. Parra Negrete, P. Del Villar Quiñones and A. Prieto Rodríguez, "Extracción de fibras de agave para elaborar papel y artesanías", Acta Universitaria, vol. 20, pp. 77-83, 2010.
[3] J. Reyes-Díaz, A. Arzate-Fernández, J. Piña-Escutia and L. Vázquez-García, "Media culture factors affecting somatic embryogenesis in Agave angustifolia Haw", Industrial Crops & Products, vol. 108, pp. 81-85, 2021.
[4] L. Cornara, A. La Rocca, S. Marsili and M. Mariotti, "Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy)", Journal of Ethnopharmacology, vol. 125, no. 1, pp. 16-30, 2009.

[5] T. Paneque Escalona, M. Polanco Arias, C. Jiménez Nogueras and Y. Piquera Palomino, "Estudio etnofarmacológico de algunas especies endémicas de agave utilizados en la medicina tradicional", Revista Científica y Tecnológica UPSE, vol. 6, no. 2, pp. 57-66, 2019.
[6] S. Semenya, M. Potgieter, M. Tshisikhawe, S. Shava and A. Maroyi, "Medicinal utilization of exotic plants by Bapedi traditional healers to treat human ailments in Limpopo province, South Africa", Journal of Ethnopharmacology, vol. 144, no. 3, pp. 646-655, 2012.
[7] F. Rodríguez-González *et al*., "A rheological study of chicory and agave tequilana fructans for use in foods", LWT, vol. 115, pp. 108-137, 2019.
[8] A. Oliva-Rodríguez *et al*., "Clostridium strain selection for co-culture with Bacillus subtilis for butanol production from agave hydrolysates", Bioresource Technology, vol. 275, pp. 410-415, 2019.
[9] M. Láinez, H. Ruiz, M. Arellano-Plaza and S. Martínez-Hernández, "Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of Agave salmiana leaves comparing S. cerevisiae and K. marxianus", Renewable Energy, vol. 138, pp. 1127-1133, 2019.
[10] A. Jiménez-Rodríguez, E. Heredia-Olea, B. Barba-Dávila, J. Gutiérrez-Uribe and M. Antunes-Ricardo, "Polysaccharides from Agave salmiana bagasse improves the storage stability and the cellular uptake of indomethacin nanoemulsions", Food and Bioproducts Processing, vol. 127, pp. 114-127, 2021.
[11] P. Santiago-García, E. Mellado-Mojica, F. León-Martínez, J. Dzul-Cauich, M. López and M. García-Vieyra, "Fructans (agavins) from Agave angustifolia and Agave potatorum as fat replacement in yogurt: Effects on physicochemical, rheological, and sensory properties", LWT, vol. 140, 2021.
[12] E. Jiménez Muñoz, F. Prieto-García, J. Prieto Méndez, O. Acevedo Sandoval and R. Rodríguez Laguna, "Caracterización fisicoquímica de cuatro especies de agaves con potencialidad en la obtención de pulpa de celulosa para elaboración de papel", DYNA, VOL. 83, pp. 232-242, 2021.
[13] AOAC., 121st AOAC annual meeting. AOAC, 2007.
[14] A. Ulbrich Talamantes, "Caracterización proximal y fitoquímica del fruto Randia aculeata (crucetillo)", Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, 2016.
[15] A. Valadez-Villarreal, E. López-Hernández, R. García-Jiménez and F. L. Ruíz-Santiago, “Comparación de dos técnicas de extracción de fenólicos totales y capacidad antioxidante a partir de chipilín (Crotalaria maypurensis H. B. K.)”, Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, vol. 2, pp. 161-169, 2004.
[16] C. Coy Barrera, J. Parra and L. Cuca Suárez, "Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie raputia heptaphylla (rutaceae)", ELEMENTOS, vol. 4, no. 4, 2014.
[17] G. Castillo Olvera, D. Zavala Cuevas and M. L. Carrillo Inungaray, “Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas”, TLATEMOANI, vol. 24, pp. 71-86, 2017.
[18] M. Moncayo Luján, A. Moreno Reséndez, G. Galván Barrón, J. Reyes Carrillo and M. Carrillo Inungaray, "Antibacterial activity and phenolic content of propolis extracts obtained by different extraction methods", Nova Scientia, vol. 10, no. 20, pp. 397-412, 2018.
[19] A. Pandey and S. Tripathi, “Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug”, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, vol. 2, no. 5, pp. 66-67.
[20] A. Bermejo de Zaa, S. Pereira Cabrera, M. Cintra Jorge and G. Morales Torres, “Determinación de parámetros químico-físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de Melia azedarach L (Pursiana)”, Revista Habanera de Ciencias Médicas, vol. 13, no. 5, 2014.
[21] R. Yadav and M. Agarwala, “Phytochemical analysis of some medicinal plants”, Journal of Phytology, vol. 3, no. 12, pp. 10-14.
[22] P. Thangaraj, "Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products", 2016.
[23] F. González-Jiménez, J. Salazar-Montoya, G. Calva-Calva and E. Ramos-Ramírez, "Phytochemical Characterization, In Vitro Antioxidant Activity, and Quantitative Analysis by Micellar Electrokinetic Chromatography of Hawthorn (Crataegus pubescens) Fruit", Journal of Food Quality, vol. 2018, pp. 1-11, 2018.
[24] M. Jiménez Alcántara, "Determinación de la CI50 del 1,3-bis (4-fenil-1H-1, 2, 3-triazolil) -2- propanolol y su relación con NF-KB como blanco terapéutico en células con cáncer de mama.", Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México, 2018.
[25] L. Gómez-Flores, N. Martínez-Ruiz, I. Enríquez-Anchondo, F. Garza-Ocañas, J. Nájera-Medellín and M. Quiñónez-Martínez, "Análisis proximal y de composición mineral de cuatro especies de hongos

ectomicorrízicos silvestres de la Sierra Tarahumara de Chihuahua", TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 22, 2019.

[26] N. Bautista D. and G. Arias A., "Estudio químico bromatológico de aguamiel de Agave americana L. (Maguey)", Ciencia e Investigación, vol. 11, no. 2, pp. 46-51, 2008.

[27] R. Hernández-Soto, G. Sandoval-Fabian, M. Estarrón-Espinoza and A. Cardador-Martínez, "Cuantificación de fitoesteroles en residuos industriales derivados de la molienda húmeda de maíz", Journal of Food, vol. 9, no. 2, pp. 102-108, 2011.

[28] M. López Luengo. “Saponósidos”. OFFARM, vol. 20, no. 6, pp 124-129, 2001.

[29] D. Veni, "Investigation of phytochemical and anti-bacterial activity on agave americana methanolic extract for medical applications", International Journal of Pharma and Bio Sciences, vol. 8, no. 3, 2017.

[30] M. Mendez *et al*., "Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria", Industrial Crops and Products, vol. 37, no. 1, pp. 445-450, 2012.

[31] R. Aboutalebi and A. Monfared, "Saponin Terpenoids; A Brief Review of Mechanisms of Actions and Anti-cancerous Effects", American Chemical Science Journal, vol. 12, no. 2, pp. 1-8, 2016.

[32] A. Nur, A. Noorshilawati and M. Rosminah, "Molluscicidal activity of entada rheedii stem bark methanolic extract against paddy pest pomacea canaliculata (golden apple snail)", Malaysian Journal of Analytical Science, vol. 21, no. 1, pp. 46-51, 2017.

[33] O. Omodamiro, P. Unekwe, I. Nweke and M. Jimoh, “Evaluation of diuretic activity of etanol extract and its fractions of Agave sisalana”, Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 2, no. 1, pp. 2239-2687.

[34] A. Ibrahim, M. Abdel-Gawad, H. El-Nahas and N. Osman, "Studies on the molluscicidal activity of agave angustifolia and pittosporum tobira on schistosomiasis transmitting snails", Journal of the Egyptian Society of Parasitology, vol. 45, no. 1, pp. 133-141, 2015.

[35] S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras and M. J. Tuñón, “Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes”, Nutrición Hospitalaria, vol. 17, no. 6, pp. 271-278.

[36] J. Vulic, J. Čanadanović-Brunet, G. Ćetković et al., “Antioxidant and cell growth activities of beetroot pomace extracts,” Journal of Functional Foods, vol. 4, no. 3, pp. 670–678, 2012.

[37] A. T. Refaat, A. A. Shahat, N. A. Ehsan et al., “Phytochemical and biological activities of Crataegus sinaica growing in Egypt,” Trop. Med., vol. 3, no. 4, pp. 257–261, 2010.

[38] O. Ighodaro and O. Akinloye, "First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid", Alexandria Journal of Medicine, vol. 54, no. 4, pp. 287-293, 2018.

[39] T. Bahorun, F. Trotin and J. Vasseurt, "Comparative polyphenolic productions in Crataegus monogyna callus cultures", Phytochemistry, vol. 37, no. 5, pp. 1273-1276, 1994.

[40] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun and H. Corke, "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer", Life Sciences, vol. 74, no. 17, pp. 2157-2184, 2004.