

Compuestos químicos, capacidad antioxidante y antimicrobiana de dos extractos metanólicos de hojas de *Agave angustifolia*

Chemical compounds, antioxidant and antimicrobial capacity of two methanolic extracts of *Agave Angustifolia* leaves

Julio César López-Romero^{1*} ,
Humberto González-Ríos² ,
Martín Valenzuela-Melendres² ,
Jesús Fernando Ayala-Zavala³ ,
Ana Guadalupe Meza-Callado¹ 

¹Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Caborca, 83600, Sonora, México.

²Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiázarán Rosas No.42, CP. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

³Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiázarán Rosas No.42, CP. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

*Autor de correspondencia:
julio.lopez@unison.mx

Artículo científico

Recibido: 06 de febrero 2023

Aceptado: 17 de noviembre 2023

Como citar: López-Romero JC, González-Ríos H, Valenzuela-Melendres M, Ayala-Zavala JF, Meza-Callado AG (2023) Compuestos químicos, capacidad antioxidante y antimicrobiana de dos extractos metanólicos de hojas de *Agave angustifolia*. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. III: e3644. DOI: 10.19136/era.a10nIII.3644

RESUMEN. *Agave angustifolia* es una planta utilizada en la medicina tradicional contra distintos padecimientos de salud; sin embargo, su uso principal es para la elaboración de bebidas alcohólicas. Durante este proceso se descartan las hojas, que representan el 50% del peso de la planta, considerándose como subproductos. Teniendo en cuenta los beneficios medicinales, estos subproductos pueden usarse para la elaboración de extractos mediante diversos métodos y evaluar su potencial biológico. El objetivo del estudio fue determinar el contenido de compuestos bioactivos, la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *A. angustifolia* obtenidos por dos métodos de extracción. Se realizaron extractos metanólicos de hojas de *A. angustifolia* a través del método de sonicación y Soxhlet. Se cuantificó el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, taninos hidrolizados y condensados, y saponinas. La capacidad antioxidante se evaluó mediante los métodos DPPH, ABTS y FRAP. La actividad bactericida se evaluó contra 10 patógenos a través del método de siembra en placa. Los resultados mostraron que el método de extracción no afectó ($p > 0.05$) la concentración de compuestos bioactivos. Se obtuvo un resultado similar en la capacidad estabilizadora de radicales ($p > 0.05$). Sin embargo, el poder reductor fue favorecido por el método de sonicación. Se observó que el extracto obtenido por el método Soxhlet incrementó la actividad antimicrobiana. *A. angustifolia* es una fuente potencial de compuestos bioactivos, los cuales no se modifican mediante los métodos de extracción utilizados, aunque su potencial biológico puede llegar a verse afectado.

Palabras clave: *Agave*, compuestos bioactivos, método de extracción, potencial biológico.

ABSTRACT. *Agave angustifolia* is a plant used in folk medicine against different health conditions; however, its main use as alcoholic beverages raw material. In this process, the leaves are discarded, representing 50% of the plant weight, which are considered byproducts. Considering the medicinal purposes, these byproducts could be used for extract obtention by using different methods and determining their biological potential. The objective of this study was to evaluate the content of bioactive compounds, the antioxidant, and the antimicrobial activity of *A. angustifolia* leaves extract obtained by two extraction methods. Methanolic extracts were performed from *A. angustifolia* leaves through sonication and Soxhlet methods. The content of total phenols, total flavonoids, hydrolyzable, condensed tannins, and saponins were quantified. Antioxidant capacity was evaluated by the DPPH, ABTS, and FRAP methods. Bactericidal activity was evaluated against 10 pathogens using the growth plate method. The obtained results showed that the extraction method did not affect ($p > 0.05$) the concentration of bioactive compounds. Similar results were obtained in the free radicals scavenged activity ($p > 0.05$). However, the reducing potential was increased by the sonication method. The extract obtained by the Soxhlet method increased the antimicrobial effect. *A. angustifolia* is a natural source of bioactive compounds, which, are not modified for the extraction methods tested, however, the biological potential could be affected.

Key words: *Agave*, bioactive compounds, biological potential, extraction methods.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento y control de padecimientos de salud se ha incrementado en los últimos años, esto debido a que actualmente muchas de las terapias actuales han perdido su eficacia, lo que dificulta el tratamiento de las enfermedades (Lu *et al.* 2020). En este contexto, se ha demostrado que los productos de origen natural, en particular las plantas, son una fuente potencial de compuestos químicos con potencial biológico, los cuales se han utilizado para el desarrollo de terapias farmacológicas contra distintos padecimientos de salud, denotando su importancia y abre la posibilidad de seguir analizando su potencial biológico (Shen 2015, Newman y Cragg 2016, Elshafie *et al.* 2023).

México se caracteriza por ser uno de los países con mayor diversidad botánica en el mundo conteniendo más de 30 000 especies de plantas (Calzada y Bautista 2020). Muchas de estas plantas han sido utilizadas a lo largo de la historia por distintos grupos étnicos para el tratamiento de diversos problemas de salud, mostrando una alta efectividad, incluso muchas de ellas siguen siendo utilizadas en la actualidad. Este tipo de efectos se han asociado a la presencia de compuestos bioactivos, tales como lignanos, flavonoides, alcaloides, saponinas, triterpenos y ácidos grasos (Jacobo-Herrera *et al.* 2016). Se estima que aproximadamente el 80% de la población mundial ha recurrido a este tipo de fuentes para tratar algún padecimiento de salud primario (Fatiha *et al.* 2021). En el caso particular de México, su diversidad botánica ofrece una gran oportunidad de seguir explorando el potencial biológico de las plantas medicinales, y de esta manera poder confirmar sus efectos benéficos (Rodríguez-Hernández *et al.* 2022).

El género *Agave* es endémico de México y está constituido por alrededor de 200 especies, de las cuales más del 70% se encuentran dentro del territorio nacional (López-Romero *et al.* 2018a). Estas plantas ayudan a disminuir la erosión del suelo, así como forman parte de las necesidades culturales y socioeconómicas de las zonas rurales (Torres-García *et al.* 2019). Una especie de interés es *Agave*

angustifolia, la cual se utiliza en la medicina tradicional a través del uso de sus hojas principalmente con, distintas finalidades, tales como: urticaria, lesiones y dolores internos, reumas, esguinces, fracturas de huesos, heridas, disentería, tos, psoriasis y espinillas (Hernández-Valle *et al.* 2014, Jiménez-Ferrer *et al.* 2022). Se han realizado pocos estudios para evaluar el potencial biológico de esta planta, entre las cuales se ha podido apreciar un potencial antioxidante, antimicrobiano, antiartrítico, inmunomodulador y antiinflamatorio (Monterrosas-Brisson *et al.* 2013, Hernández-Valle *et al.* 2014, López-Romero *et al.* 2018b, Ferrer *et al.* 2022). Lo anterior, se ha asociado a la presencia de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, terpenos, saponinas y ácidos grasos (López-Romero *et al.* 2018a, Jiménez-Ferrer *et al.* 2022).

Cabe destacar que la principal actividad económica que se genera con *A. angustifolia* es su uso en la elaboración de bebidas alcohólicas, en particular el bacanora, que cuenta con denominación de origen (Domínguez-Arista 2020). Durante el proceso de elaboración de esta bebida se descartan las hojas, que constituyen cerca del 50% del peso de la planta, las cuales terminan convirtiéndose en subproductos (Hernández-Valle *et al.* 2014, López-Romero *et al.* 2018a). Basándose en su uso tradicional, estos subproductos podrían ser utilizados para la elaboración de extractos dirigidos a algún potencial biológico y/o extracción de metabolitos secundarios (Bottone *et al.* 2019). No obstante, en el proceso de extracción pueden ser empleados diferentes métodos, los cuales pueden modificar el perfil y la concentración de compuestos químicos, y subsecuentemente el potencial biológico (Ingle *et al.* 2017). Esto puede ser de utilidad, ya que podría permitir eficientizar los procesos, al disminuir gastos y tiempos de operación (Abubakar y Haque, 2020). En este sentido, existe poca información sobre cómo los métodos de extracción podrían llegar a modificar el potencial biológico y el perfil de compuestos de subproductos de *A. angustifolia*. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el método de extracción afecta la concentración de metabolitos secundarios, el potencial antioxidante y antimicrobiano de dos extractos de *A.*

angustifolia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Las plantas de *A. angustifolia* utilizadas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Estas plantas, ya habían alcanzado su estado de madurez (entre siete y nueve años) (García *et al.* 2013). Se utilizó la metodología descrita por López-Romero *et al.* (2018b). Se escogieron solo las hojas de la planta, se cortaron en trozos pequeños y después se liofilizaron (Labconco Corp., Kansas City, MO). Finalmente, el material liofilizado fue molido a través de un molino Wiley (malla de 1 mm) con la finalidad de obtener un polvo fino.

Elaboración del extracto por el método de sonicación

Se utilizó 1 g de la harina de las hojas de *A. angustifolia*, el cual se mezcló con 10 mL de metanol y se homogenizó por 1 min a 13 000 rpm (Ultra-Turrax T25. Ika Works Inc., USA). Posteriormente, el extracto se sonicó por 15 min (Brason 2510 ultrasonic, Danbury, CT, USA) y se centrifugó a 17 664 x g durante 15 min a 20 °C (Beckman Coulter Avanti J-25i, California, USA). Se realizó una separación del precipitado, usándolo para repetir el proceso descrito. Los dos sobrenadantes obtenidos se combinaron y el solvente fue removido en un rotavapor (40 °C) en condiciones de vacío (Yahamoto, Japón). El extracto obtenido fue liofilizado y almacenado a -20 °C hasta su uso (López-Romero *et al.* 2018b).

Elaboración del extracto por el método Soxhlet

Se usaron 10 g de las hojas de *A. angustifolia* previamente molidas, usando metanol (100 mL) de manera continua durante 8 h. Posteriormente, el solvente fue removido en un rotavapor (40 °C) en condiciones de vacío, y el extracto obtenido se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta su análisis (Negi y Jayaprakasha 2001, con modificaciones).

Cuantificación de fenoles totales

Se mezclaron 15 μL de los extractos de *A. angustifolia* con 75 μL del reactivo de Folin Ciocalteu (relación 1:10 en agua destilada) y 60 μL de carbonato de sodio (7.5%), enseguida, se dejó incubar por 30 min en ausencia de luz. La absorbancia se midió a 765 nm en un lector de microplacas (Omega FLUOstar BMG LABTECH). Se reportaron los resultados como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG) g^{-1} de peso seco (p.s) (Singlenton y Rossi 1965).

Cuantificación de flavonoides totales

Se utilizaron tubos Eppendorf de 2 mL, en los cuales, se combinaron 100 μL de los extractos de *A. angustifolia* con 430 μL de nitrato de sodio (5%) y se dejaron incubar durante 5 min. A continuación, se introdujeron 30 μL de tricloruro de aluminio (10%) y 440 μL de hidróxido de sodio (1 mol L^{-1}). Finalmente, la absorbancia se obtuvo a 496 nm en un lector de microplacas (Omega FLUOstar BMG LABTECH) y los resultados se expresaron como mg equivalente de quercetina (mg EQ) g^{-1} p.s. (Chen *et al.* 2014).

Cuantificación de taninos hidrolizados

1 g de los extractos de *A. angustifolia* se mezcló con una solución de metanol-ácido sulfúrico (10:1 v/v) a 85 °C durante 20 h. Posteriormente, se aplicó el método de cuantificación de fenoles totales previamente descrito por Singlenton y Rossi (1965). Los resultados fueron reportados como mg EAG g^{-1} p.s.

Cuantificación de taninos condensados

Se mezcló 1 g de los extractos de *A. angustifolia* con una solución de ácido clorhídrico-butanol (0.05:0.95) a 100 °C durante 3 h. Después, la absorbancia de la muestra fue medida a 555 nm en un lector de microplacas (Omega FLUOstar BMG LABTECH). Los resultados se reportaron como mg equivalente de cianidina (mg EC) g^{-1} p.s. (López-Romero *et al.* 2018b).

Cuantificación de saponinas

2 mL de los extractos de *A. angustifolia* se

hicieron reaccionar con 1 mL de una solución de ácido sulfúrico-agua destilada (1:1) y un mL de una solución de anisaldehído-metanol (0.005:1). Después, la muestra se puso en un baño de María (100 °C por 30 min), enfriada (5 °C) en un baño de agua helada por 10 min. Finalmente, la absorbancia se obtuvo a 430 nm (Omega FLUOstar BMG LABTECH) y los resultados se reportaron como mg equivalente de diosgenina (mg ED) g⁻¹ p.s. (Uematsu et al. 2000).

Evaluación de actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante en ambos extractos por las técnicas de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) y FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), tal como se describen a continuación:

Técnica de DPPH

20 µL de los extractos de *A. angustifolia* se mezclaron con 280 µL de una solución de DPPH (metanol, absorbancia 0.7 ± 0.02 a 515 nm). Después de 30 min en ausencia de luz se leyó la absorbancia a 515 nm en un lector de microplacas (Omega FLUOstar BMG LABTECH) y los resultados se reportaron como µmol equivalente de trolox (ET) g⁻¹ p.s. (Brand-Williams et al. 1995).

Técnica de ABTS

El radical ABTS.⁺ fue previamente preparado con la combinación de 88 µL de persulfato de potasio con 5 mL de una solución de ABTS (7 mM), la cual, se dejó incubada durante 16 h. Después, la absorbancia del radical se ajustó a 0.7 ± 0.02 a 734 nm (etanol). Posteriormente, cinco µL de los extractos de *A. angustifolia* se mezclaron con 245 µL del radical ajustado. La absorbancia se leyó a 734 nm (Omega FLUOstar BMG LABTECH) al minuto 1 y 6 de incubación. Los resultados se reportaron como µmol ET g⁻¹ p.s. (Re et al. 1999).

Técnica de FRAP

El reactivo de FRAP se preparó mezclando buffer de acetato (pH 3.6, 300 mM), 40 mM de TPTZ

(2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine; disuelto en HCl 40 mM) y cloruro de hierro 20 mM (disuelto en agua destilada) en una proporción de 10:1:1. Posteriormente, 20 µL de los extractos de *A. angustifolia* se hicieron reaccionar con 280 µL del reactivo de FRAP durante 30 min en ausencia de luz. La absorbancia fue medida a 630 nm (Omega FLUOstar BMG LABTECH) y los resultados fueron reportados como µmol ET g⁻¹ p.s. (Benzie y Strain 1996).

Cepas bacterianas utilizadas

Las cepas utilizadas fueron provistas por el Laboratorio de Tecnologías Emergentes del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Las cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *L. ivanovii* ATCC 19119, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, *S. epidermidis* ATCC 2228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *Salmonella* entérica serovar typhimurium ATCC 14028, *S. entérica* serovar choleraesuis ATCC 14029, *S. entérica* serovar seftenberg ATCC 8400 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10154 estuvieron preservadas a -80 °C en crioviales que contenía medio de cultivo líquido con glicerol (30%, v/v). Las cepas fueron reactivadas en caldo Mueller Hinton durante 24 h (37 °C) antes de su uso.

Determinación de la concentración mínima bactericida

Las cepas bacterianas fueron sembradas en caldo Mueller Hinton entre 16-18 h (37 °C) antes de uso. Después, las suspensiones bacterianas fueron ajustadas a 0.134 ± 0.02 (1.6 × 10⁶ células mL⁻¹) a una densidad óptica de 600 nm (caldo Mueller Hinton). Se prepararon soluciones de los extractos de *A. angustifolia* a concentraciones de 10 a 60 mg mL⁻¹ (disueltos en caldo Mueller Hinton), de las cuales se tomaron 20 µL y se mezclaron con 180 µL de los inoculados bacterianos ajustados (la mezcla se realizó en una microplaca), y la combinación se dejó incubada durante 24 h a 37 °C. En el experimento se utilizó como control positivo a gentamicina a una concentración de 12 µg/mL. Como control negativo se utilizó el caldo de Mueller Hinton. Posteriormente, se tomaron 10 µL de cada concentración de análisis y

se sembraron en agar cuenta en placa, los cuales se incubaron a 37 °C (24 h). La concentración mínima bactericida fue definida como la concentración que mostró ausencia de crecimiento bacteriano (López-Romero *et al.* 2018b).

Análisis estadístico

Las variables analizadas en el presente estudio fueron los distintos grupos de compuestos bioactivos cuantificados (fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados, taninos hidrosolubles y saponinas) y la actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP). Los resultados obtenidos fueron analizados a través de un análisis de varianza de una vía haciendo uso del programa estadístico NCSS, 2007. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey Kramer. El nivel de significancia en el error fue $p < 0.05$.

RESULTADOS

El contenido de compuestos bioactivos presentes en los extractos metanólicos de *A. angustifolia* obtenidos por los métodos de extracción de sonicación y Soxhlet se muestran en la Tabla 1. De manera general, se puede observar que la concentración de los distintos grupos de compuestos fenólicos cuantificados (fenoles totales, flavonoides totales y taninos) no presentaron diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los métodos de extracción utilizados. Sin embargo, los taninos hidrosolubles presentaron diferencia entre el método de extracción, donde el extracto obtenido por sonicación incrementa significativamente. A su vez, se obtuvo un comportamiento similar en el contenido de saponinas en ambos extractos analizados.

Por otra parte, se determinó la actividad antioxidante de los dos extractos metanólicos obtenidos de hojas de *A. angustifolia* por distintos métodos (Figura 1) demostraron poseer capacidad para estabilizar radicales sintéticos, tales como el DPPH y ABTS. A su vez, se observa que el método de extracción no afectó ($p > 0.05$) la capacidad estabilizadora de radicales. Además, los extractos mostraron capacidad reductora de metales. Sin embargo, se observó

que el método de extracción afectó esta capacidad, de manera que la extracción por sonicación presentó ($p < 0.05$) mayor poder reductor.

Otra de las actividades biológicas evaluadas de los extractos de *A. angustifolia* obtenidos por los métodos de extracción de sonicación y Soxhlet fue la actividad antimicrobiana, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2. Se puede apreciar que el extracto obtenido por el método de Soxhlet resultó más eficaz para inhibir el crecimiento de los nueve patógenos analizados. A su vez, se observa que el extracto obtenido por el método de sonicación no presentó efecto letal en los microorganismos analizados a la concentración más alta evaluada (60 mg mL^{-1}), por lo cual, se podrían incrementar las concentraciones de trabajo en investigaciones futuras.

DISCUSIÓN

Los productos naturales han sido utilizados a lo largo de la historia como auxiliares en el tratamiento de diversas enfermedades, y un alto porcentaje de la población mundial los utiliza como tratamiento primario (Ntie-Kang *et al.* 2013). Con el desarrollo tecnológico, algunos de estos productos naturales son utilizados en el procesamiento de diversos productos alimentarios o bebidas, lo cual en ocasiones genera una gran cantidad de subproductos que llegan a alcanzar hasta el 50% de su peso (Ayala-Zavala *et al.* 2011). Normalmente, estos son desechados y no tienen valor agregado. Estos subproductos pueden ser aprovechados con diversos fines, como la extracción de compuestos químicos, los cuales son asociados con diversos efectos, y pueden llegar a tener distintas aplicaciones, como por ejemplo en la industria alimentaria y farmacéutica (O'Shea *et al.* 2012, Gullón *et al.* 2020).

Los extractos obtenidos de *A. angustifolia* mostraron poseer diferentes grupos de compuestos químicos, tales como compuestos fenólicos y saponinas. Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con los reportados para *A. angustifolia*, cuyos valores de fenoles totales se encuentran entre 0.5 a $21.7 \text{ mg EAG g}^{-1}$. A su vez, se observó que los valores de flavonoides (flavonoides totales:

Tabla 1. Composición fitoquímica de los extractos metanólicos de *A. angustifolia* obtenidos por el método de sonicación y método Soxhlet.

Compuestos cuantificados	AAM	AAMS
Fenoles totales (mg EAG g ⁻¹)	17.989 ± 0.42 ^a	17.325 ± 0.28 ^a
Flavonoides totales (mg EQ g ⁻¹)	11.729 ± 0.14 ^a	13.573 ± 2.01 ^a
Taninos condensados (mg EC g ⁻¹)	0.008 ± 0.0003 ^a	0.009 ± 0.0001 ^a
Taninos hidrosolubles (mg EAG g ⁻¹)	0.333 ± 0.004 ^b	0.091 ± 0.002 ^a
Saponinas (mg ED g ⁻¹)	9.016 ± 0.21 ^a	9.213 ± 0.28 ^a

AAM: extracto metanólico de *A. angustifolia* obtenido por el método de sonicación. AAMS: extracto metanólico de *A. angustifolia* obtenido por el método Soxhlet. Los valores para cada tratamiento se muestran como el valor promedio de tres experimentos ± la desviación estándar. Diferentes literales dentro de la misma fila, indica diferencia significativa ($p < 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer.

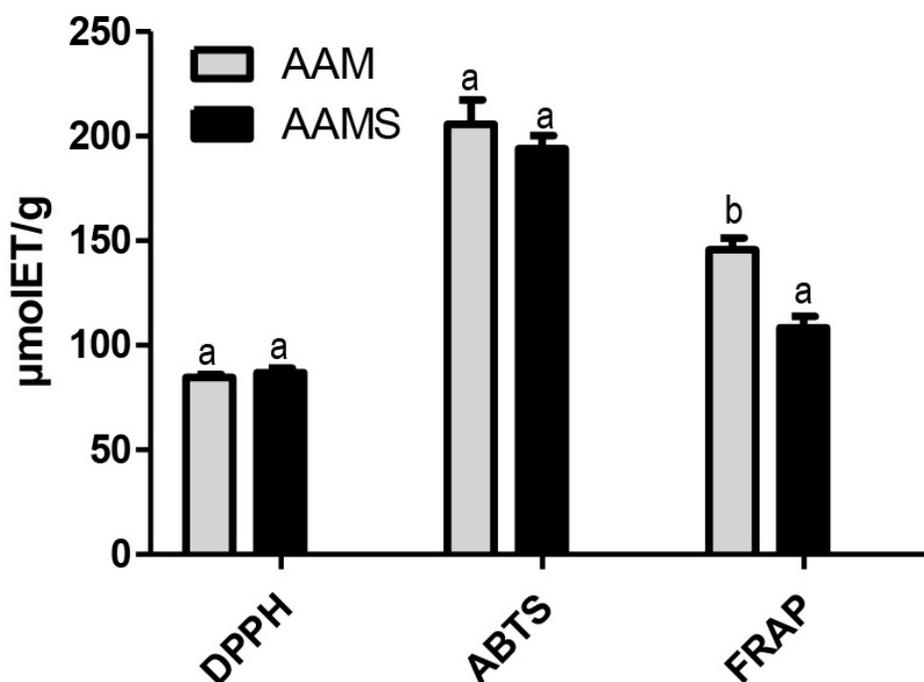


Figura 1. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *A. angustifolia* obtenidos por el método de sonicación y método Soxhlet. AAM: extracto metanólico de *A. angustifolia* obtenido por el método de sonicación. AAMS: extracto metanólico de *A. angustifolia* obtenido por el método Soxhlet. Los valores para cada tratamiento se muestran como el valor promedio de tres experimentos ± la desviación estándar. Diferentes literales entre barras de cada método antioxidante indica diferencia significativa ($p < 0.05$). Prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer.

0.0025 a 0.015 mg EQ g⁻¹; flavonas y flavonoles: 8.5 mg ER g⁻¹; flavanonas y dihidroflavonoles: 38 mg EH g⁻¹, taninos (hidrolizables: 0.2 mg EAG g⁻¹; condensados: 0.003 mg EC g⁻¹) y saponinas (7.2 mg ED g⁻¹) fueron similares a los previamente reportados para esta planta (Ahumada-Santos *et al.* 2013, López-Romero *et al.* 2018b, Ibarra-Cantún *et al.* 2020).

Otros estudios han encontrado valores similares o pequeñas variaciones en la concentración de compuestos al evaluar el método de extracción por sonicación y el método Soxhlet en fuentes de tipo vegetal. Por ejemplo, Karabegovic *et al.* (2011), Cvatanovic *et al.* (2015) y Caballero-Galván *et al.* (2018) observaron que la concentración de compuestos bioactivos como los fenoles totales

y flavonoides totales no se vio afectado en extractos de *Artemisa vulgaris*, *A. campestris*, *Matricaria chamomilla* y *Coffea arábica* obtenidos por el método de extracción de sonicación y Soxhlet.

Tabla 2. Efecto bactericida (mg mL⁻¹) de los extractos metanólicos de *A. angustifolia* obtenidos por el método de sonicación y método Soxhlet.

Bacteria	AAM	AAMS
<i>L. monocytogenes</i>	NP	60
<i>L. ivanovii</i>	NP	40
<i>S. aureus</i>	NP	30
<i>S. epidermidis</i>	NP	30
<i>E. coli</i>	NP	60
<i>E. coli</i> O157:H7	NP	60
<i>S. entérica serovar typhimurium</i>	NP	60
<i>S. entérica serovar choleraesuis</i>	NP	60
<i>S. entérica serovar seftenberg</i>	NP	60
<i>P. aeruginosa</i>	NP	NP

AAM: extracto metanólico de *A. angustifolia* obtenido por el método de sonicación. AAMS: extracto metanólico de *A. angustifolia* obtenido por el método Soxhlet. NP: No presentó efecto bactericida a la dosis más alta evaluada (60 mg mL⁻¹). Cada experimento se realizó por triplicado. Control positivo: gentamicina a 12 µg/mL. Control negativo: caldo Mueller Hinton.

Lo anterior, evidencia que ambos métodos son eficientes para la extracción de fitoquímicos y sugieren que el metanol tiene alta capacidad de extraer a los metabolitos secundarios independientemente del método utilizado, lo cual es interesante, ya que podría eficientizar los procesos de extracción de compuestos bioactivos de fuentes vegetales.

Los compuestos químicos identificados en fuentes vegetales son asociados con diversas actividades biológicas, como por ejemplo antioxidante, antimicrobiana, anticancerígeno, antiinflamatoria, entre otras (Uwineza y Waśkiewicz 2020, da Silva *et al.* 2022). Una de las actividades biológicas más comúnmente reportadas es la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos de actividad antioxidante en el presente estudio concuerdan con los reportados para *A. angustifolia*, ya que se ha mostrado que extractos obtenidos de esta planta han exhibido capacidad para estabilizar al radical DPPH (IC₅₀: 62 a 378 mg mL⁻¹; 6 a 94.2 µmol ET g⁻¹) y ABTS (IC₅₀: 75 a 391 mg mL⁻¹; 239 µmol ET g⁻¹), además demostrar tener la habilidad de reducir metales a través del método FRAP (149 µmol ET g⁻¹) (Ahumada-Santos *et al.*

2013, López-Romero *et al.* 2018b, Ibarra-Cantún *et al.* 2020).

Se ha demostrado que al comparar el método de extracción por sonicación y Soxhlet sobre la actividad antioxidante de productos naturales, estos no tienden a afectar en gran medida esta actividad biológica. En este sentido, diferentes investigaciones reportaron que la capacidad de estabilizar radicales libres y reducir metales de extractos obtenidos de *Passiflora alata* Curtis, *M. chamomilla* L., *A. vulgaris*, *A. campestris* y *Rheum ribes* a través del método por sonicación y Soxhlet presentaron un comportamiento similar respecto a la capacidad antioxidante (Karabegović *et al.* 2011, Cvetanović *et al.* 2015, Pereira *et al.* 2017, Alkaya *et al.* 2019). Lo anterior, evidencia que ambos métodos pueden ser utilizados de manera eficaz para la obtención de extractos con potencial para estabilizar radicales y reducir metales, lo cual puede ser asociado con la capacidad del metanol para lixiviar a los compuestos con capacidad antioxidante (Oufnac *et al.* 2007).

El potencial antioxidante mostrado por los extractos de *A. angustifolia* pudiera ser asociado con los compuestos bioactivos presentes, en particular con los compuestos fenólicos, ya que diferentes estudios han demostrado una fuerte correlación entre estos compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante (López-Romero *et al.* 2022). La capacidad antioxidante de estos compuestos es asociada con su estructura (presencia de grupos catecol y cromanos), además que se ha observado que un factor importante que determina este potencial es la presencia de grupos hidroxilo en las estructuras de estos compuestos, los cuales, pueden actuar fácilmente como donadores de hidrógeno o electrones, lo que permite que puedan estabilizar radicales y reducir metales (Podsędek 2007, López-Romero *et al.* 2018b, López-Romero *et al.* 2022). Además, se ha observado que la presencia de dobles enlaces en estos compuestos le confiere una mayor estabilidad a los radicales fenólicos generados, debido al efecto de resonancia que se produce en la molécula (Podsędek 2007, López-Romero *et al.* 2018b, López-Romero *et al.* 2022). También, otro de los grupos de compuestos que pueden contribuir al potencial antioxidante de los

extractos obtenidos son las saponinas, los cuales han demostrado la capacidad de estabilizar radicales debido al potencial de donar hidrógeno o electrones (Xiong *et al.* 2012).

Basado en lo anterior, se puede sugerir que los extractos de *A. angustifolia* podrían actuar como inhibidores del proceso oxidativo, ya sea inhibiendo el proceso inicial o interrumpiendo el proceso oxidativo una vez iniciado. Esto podría tener interesantes implicaciones desde el punto de vista de salud, ya que es conocido que el proceso oxidativo está relacionado con el estrés oxidativo, el cual genera alteraciones en los componentes celulares, que en casos severos puede llegar a provocar daños al ADN, pudiéndose ver implícito en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, que son de las principales causas de muerte en el mundo (Leyane *et al.* 2022). También, los extractos de *A. angustifolia* podrían ser empleados en la industria alimentaria como inhibidores de procesos oxidativos, los cuales son uno de los principales factores que afecta la estabilidad y vida de anaquel de los alimentos (Abeyrathne *et al.* 2021). Esto, basado en un estudio previo que demostró que un extracto etanólico de *A. angustifolia* retardó procesos oxidativos en hamburguesas de res, extendiendo su vida de anaquel comparado con el testigo. Además, se observó que el extracto no afectó las características sensoriales (López-Romero *et al.* 2018b). Lo anterior, sugiere que esta fuente vegetal podría ser utilizada en distintas matrices alimentarias como por sus agentes antioxidantes.

Los extractos metanólicos de *A. angustifolia* afectaron el crecimiento de bacterias patógenas. En este sentido, Ahumada-Santos *et al.* (2013) reportaron el efecto inhibitorio de un extracto obtenido por sonicación (CMI: 15 mg mL⁻¹) contra *Streptococcus* del grupo A-4 y *Shigella dysenteriae*. En el mismo sentido, López-Romero *et al.* (2018b) observaron que un extracto etanólico (obtenido por sonicación) de *A. angustifolia* presentó efecto bactericida (CMB: 60 mg mL⁻¹) contra *S. epidermidis* y *E. coli*.

Por otra parte, los estudios realizados por Saad *et al.* (2014) y Dharmaratne *et al.* (2018) en donde se comparó el potencial antimicrobiano de extractos de *Persicaria odorata* y *Terminalia bellirica* obtenidos

por el método de sonicación y Soxhlet, se presentó que el extracto obtenido por el segundo método incrementó el potencial antimicrobiano contra bacterias Gram positivas, Gram negativas ATTC y aislados clínicos multidrogo resistentes. Esto podría ser asociado con la capacidad de este método para extraer de manera más eficiente compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana. Si bien el contenido de compuestos fenólicos en general fue similar en ambos tratamientos, estos podrían tener diferente perfil de compuestos y concentración, lo cual se ha demostrado previamente por Sharma *et al.* (2020). A su vez, se ha observado que el método Soxhlet puede favorecer la extracción de otros tipos de compuestos que pueden estar asociados con efecto antimicrobiano, como los terpenos (Falev *et al.* 2017, Sharma *et al.* 2020).

Se ha demostrado que la capacidad antimicrobiana de los compuestos fenólicos está directamente ligada con el número y ubicación de grupos hidroxilo, así como la presencia de grupos metoxilo y el grado de polimerización (Górniak *et al.* 2019, Biharee *et al.* 2020). Estos, pueden causar daño a la membrana, afectar la síntesis de la envoltura celular, inhibir la síntesis de ácidos nucleicos, cadena transportadora de electrones y ATP, lo cual lleva a la muerte bacteriana (Górniak *et al.* 2019, Biharee *et al.* 2020). Las saponinas también han demostrado un efecto antimicrobiano, cuya capacidad de dañar el interior de la bacteria se asocia a la capacidad de causar daño entre la pared y membrana bacteriana (generando una pérdida en la integridad), propiciando la fuga de componentes intracelulares y resultando en la muerte celular (Dong *et al.* 2020).

Actualmente, es conocido que la resistencia a los antimicrobianos representa un serio reto para el sector salud, ya que constituye una de las principales causas de muerte en el mundo. Aunado a ello, se estima que para el año 2050 estas se convertirán en la primera causa de muerte a nivel mundial (de Kraker *et al.* 2016). Esto revela, que las terapias antimicrobianas actuales están perdiendo su eficacia, por lo cual, es necesario buscar nuevas estrategias que puedan representar una alternativa para el sector farmacéutico (Chandra *et al.* 2017).

Basado en lo anterior, el presente estudio muestra información novedosa y original referente al efecto antimicrobiano de esta planta, ya que se reporta por primera ocasión el efecto antimicrobiano del extracto de hojas de *A. angustifolia* obtenido por el método Soxhlet, además de demostrar efecto antimicrobiano en primera instancia de *A. angustifolia* contra *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* entérica serovar typhimurium, *S. entérica serovar choleraesuis* y *S. entérica serovar seftenberg*, los cuales, son microorganismos de preocupación en la industria alimentaria y el área clínica. También se puede sugerir que este extracto pudiera ser empleado en el área alimentaria, donde muchos de los microorganismos probados (*E. coli*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*) representan un serio problema de seguridad alimentaria, ya que se ven implícitos en el desarrollo de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos cada año,

causando daño y/o muerte de consumidores (CDC 2022).

CONCLUSIONES

Los resultados indican que los extractos de *A. angustifolia* son una fuente prometedora de compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos y saponinas, los cuales podrían estar relacionados con el potencial antioxidante y antimicrobiano de esta planta. Por su parte, el método de extracción Soxhlet parece favorecer el potencial antimicrobiano de los extractos. Por lo tanto, estos extractos podrían utilizarse para obtener fracciones o compuestos purificados que pudieran aplicarse en distintas áreas, como es el caso de la industria alimentaria y farmacéutica.

LITERATURA CITADA

- Abeyrathne EDNS, Nam K, Ahn DU (2021) Analytical methods for lipid oxidation and antioxidant capacity in food systems. *Antioxidants* 10: 1-19. DOI: 10.3390/antiox10101587
- Abubakar AR, Haque M (2020) Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 12(1): 1-10. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
- Ahumada-Santos YP, Montes-Avila J, de Jesús Uribe-Beltrán M, Díaz-Camacho SP, López-Angulo G, Vega-Aviña R, López-Valenzuela JA, Heredia JB, Delgado-Vargas F (2013) Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products* 49: 143-149.
- Alkaya DB, Seyhan SA, Ozturk BN (2019) Influence of extraction method on antioxidant properties of *Rheum ribes* root extract. *Ovidius University Annals of Chemistry* 30: 44-47.
- Ayala-Zavala JFN, Vega-Vega V, Rosas-Domínguez C, Palafox-Carlos H, Villa-Rodríguez JA, Siddiqui MW, González-Aguilar GA (2011) Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International* 44: 1866-1874.
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Biharee A, Sharma A, Kumar A, Jaitak V (2020) Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia* 146: 1-22. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104720.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.

- Bottone A, Cerulli A, D'Urso G, Masullo M, Montoro P, Napolitano A, Piacente S (2019) Plant specialized metabolites in hazelnut (*Corylus avellana*) kernel and byproducts: an update on chemistry, biological activity, and analytical aspects. *Planta Medica* 85: 840-855.
- Caballero-Galván AS, Restrepo-Serna DL, Ortiz-Sánchez M, Cardona-Alzate CA (2018) Analysis of extraction kinetics of bioactive compounds from spent coffee grounds (*Coffea arabica*). *Waste and Biomass Valorization* 9: 2381-2389.
- Calzada F, Bautista E (2020) Plants used for the treatment of diarrhoea from Mexican flora with amoebicidal and giardicidal activity, and their phytochemical constituents. *Journal of Ethnopharmacology* 253: 112676. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112676.
- Chandra H, Bishnoi P, Yadav A, Patni B, Mishra AP, Nautiyal AR (2017) Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials-a review. *Plants* 6: 1-11. DOI: 10.3390/plants6020016.
- Chen L, Xin X, Yuan Q, Su D, Liu W (2014) Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 180-188.
- Cvetanović A, Švarc-Gajić J, Mašković P, Savić S, Nikolić L (2015) Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products* 65: 582-591.
- CDC (2022) Foodborne outbreaks. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/lists/outbreaks-list.html>. Fecha de consulta: 6 de enero de 2023.
- da Silva RF, Carneiro CN, de Sousa CBDC, Gomez FJ, Espino M, Boiteux J, Fernández MA, Silva MF, Dias FDS (2022) Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. *Microchemical Journal* 175: 1-21.
- de Kraker ME, Stewardson AJ, Harbarth S (2016) Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS Medicine* 13: 1-6. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002184.
- Dharmaratne M, Manoraj A, Thevanesam V, Ekanayake A, Kumar NS, Liyanapathirana V, Abeyrathe E, Ratnayake-Bandara BM (2018) *Terminalia bellirica* fruit extracts: *in-vitro* antibacterial activity against selected multidrug-resistant bacteria, radical scavenging activity and cytotoxicity study on BHK-21 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18: 1-12. DOI: 10.1186/s12906-018-2382-7.
- Dong S, Yang X, Zhao L, Zhang F, Hou Z, Xue P (2020) Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products* 149: 1-14. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112350.
- Domínguez-Arista DR (2020) Bacanora, mezcal of Sonora: From clandestinity to Denomination of Origin. *Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional* 30(56): 1-23. DOI: 10.24836/es.v30i56.958 e20958
- Elshafie HS, Camele I, Mohamed AA (2023) A Comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1-20. DOI: 10.3390/ijms24043266.
- Fatiha EB, Lamade VM, Fabre H, Charlot D (2021) Reflection on medicinal plants, especially antivirals and how to reconsider ethnobotany as an interesting way for health preservation. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 15: 10-32.
- Falev DI, Kosyakov DS, Ovchinnikov DV, Shestakov SL (2017) Subcritical extraction of birch bark pentacyclic triterpenes. *Russian Chemical Bulletin* 66: 875-881.

- García HC, Enríquez-del Valle JR, Velasco Velasco VA, Luna JR, Virginia G, Ángeles C. García DE (2013). Nutrimientos y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 1161-1173.
- Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J (2019) Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews* 18: 241-272.
- Gullón P, Gullón B, Romaní A, Rocchetti G, Lorenzo JM (2020) Smart advanced solvents for bioactive compounds recovery from agri-food by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology* 101: 182-197.
- Hernández-Valle E, Herrera-Ruiz M, Rosas Salgado G, Zamilpa A, Arenas Ocampo ML, Jiménez Aparicio A, Tortoriello J, Jiménez-Ferrer E (2014) Anti-inflammatory effect of 3-O-[(6'-O-palmitoyl)- β -D-glucopyranosyl sitosterol] from *Agave angustifolia* on ear edema in mice. *Molecules* 19: 15624-15637.
- Ibarra-Cantún D, Ramos-Cassellis ME, Marín-Castro MA, Castelán-Vega RDC (2020) Secondary metabolites and antioxidant activity of the solid-state fermentation in apple (*Pirus malus* L.) and agave mezcalero (*Agave angustifolia* H.) bagasse. *Journal of Fungi* 6: 1-13. DOI: 10.3390/jof6030137.
- Ingle KP, Deshmukh AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC (2017) Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6: 32-36.
- Jacobo-Herrera NJ, Jacobo-Herrera FE, Zentella-Dehesa A, Andrade-Cetto A, Heinrich M, Pérez-Plasencia C (2016) Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 179: 391-402.
- Jiménez-Ferrer E, Vargas-Villa G, Martínez-Hernández GB, González-Cortazar M, Zamilpa A, García-Aguilar MP, Arenas-Ocampo ML, Herrera-Ruiz M (2022) Fatty-Acid-Rich *Agave angustifolia* Fraction Shows Antiarthritic and Immunomodulatory Effect. *Molecules* 27: 1-14. DOI: 10.3390/molecules27217204.
- Karabegović I, Nikolova M, Veličković D, Stojičević S, Veljković V, Lazić M (2011) Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 19: 504-511.
- Leyane TS, Jere SW, Houreld NN (2022) Oxidative stress in ageing and chronic degenerative pathologies: molecular mechanisms involved in counteracting oxidative stress and chronic inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1-28. DOI: 10.1016/S1004-9541(11)60013-X.
- Lopez-Romero JC, González-Ríos H, Borges A, 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: 1-9. DOI: 10.1155/2015/795435.
- López-Romero JC, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA, Peña-Ramos EA, González-Ríos H (2018a) Biological activities of Agave by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98: 2461-2474.
- López-Romero JC, Ayala-Zavala JF, Peña-Ramos EA, Hernández J, González-Ríos H (2018b) 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: 4413-4423.
- López-Romero JC, Torres-Moreno H, Vidal-Gutiérrez M, Cabrera-Cabrera G, Robles-Zepeda RE, Rodríguez-Martínez KL, Ortega-García J, Villegas-Ochoa MA, Salazar-López NJ, Dominguez-Avila A, Gonzalez-Aguilar GA (2022) *Caesalpinia palmeri*: first report on the phenolic compounds profile, antioxidant and cytotoxicity effect. *Chemistry and Biodiversity* 19: 1-12. DOI: 10.1002/cbdv.202200631.

- Lu S, Qiu Y, Ni D, He X, Pu J, Zhang J (2020) Emergence of allosteric drug-resistance mutations: new challenges for allosteric drug discovery. *Drug Discovery Today* 25: 177-184.
- Monterrosas-Brisson N, Ocampo MLA, Jiménez-Ferrer E, Jiménez-Aparicio AR, Zamilpa A, Gonzalez-Cortazar M, Tortoriello J, Herrera-Ruiz M (2013) Anti-inflammatory activity of different *Agave* plants and the compound Cantalasonin-1. *Molecules* 18: 8136-8146.
- Negi P, Jayaprakasha G (2001) Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extracts. *European Food Research and Technology* 213: 484-487.
- Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 79: 629-661.
- Ntie-Kang F, Lifongo LL, Mbaze LM, Ekwelle N, Owono Owono LC, Megnassan E, Judson PN, Sippl W, Efang SMN (2013) Cameroonian medicinal plants: a bioactivity versus ethnobotanical survey and chemotaxonomic classification. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 1-18. DOI: 10.1186/1472-6882-13-147.
- OMS (2021) patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. Organización Mundial de La Salud. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>: text=Helicobacter%20pylori%2C%20Staphylococcus%20aureus%2C%20Streptococcus, riesgo%20la%20salud%20de%20la. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2022.
- O'Shea N, Arendt EK, Gallagher E (2012) Dietary fiber and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.002>.
- Oufnac DS, Xu Z, Sun T, Sabliov C, Prinyawiwatkul W, Godber JS (2007) Extraction of antioxidants from wheat bran using conventional solvent and microwave-assisted methods. *Cereal Chemistry* 84: 125-129.
- Pereira MG, Hamerski F, Andrade EF, Scheer ADP, Corazza ML (2017) Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata Curtis*) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids* 128: 338-348.
- Podsędek A (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology* 40: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.023>.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Rodríguez-Hernández AA, Flores-Soria FG, Patiño-Rodríguez O, Escobedo-Moratilla A (2022) Sanitary Registries and Popular Medicinal Plants Used in Medicines and Herbal Remedies in Mexico (2001-2020): A Review and Potential Perspectives. *Horticulturae* 8: 1-18. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050377>.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Sharma Y, Velamuri R, Fagan J, Schaefer J (2020) Full-spectrum analysis of bioactive compounds in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) as influenced by different extraction methods. *Molecules* 25: 1-21. DOI: 10.3390/molecules25204599.
- Shen B (2015) A new golden age of natural products drug discovery. *Cell* 163: 1297-1300.
- Torres-García I, Rendón-Sandoval FJ, Blancas J, Moreno-Calles AI (2019) The genus *Agave* in agroforestry systems of Mexico. *Botanical Science* 97: 263-290.

Uematsu Y, Hirata K, Saito K, Kudo I (2000) Spectrophotometric determination of saponin in *Yucca* extract used as food additive. *Journal of AOAC International* 83: 1451-1454.

Uwineza PA, Waśkiewicz A (2020) Recent advances in supercritical fluid extraction of natural bioactive compounds from natural plant materials. *Molecules* 25(17): 1-23. DOI: 10.3390/molecules25173847.

Xiong SL, Hou DB, Huang N, Li A (2012) Preparation and biological activity of saponin from *Ophiopogon japonicus*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6: 1964-1970.