



TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *in vitro* DE DIFERENTES ESPECIES DE AGAVE

QUE PRESENTA:

DAVID RAMÍREZ ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN FLORENCIO GÓMEZ LEYVA

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. RAMÓN ENRIQUE ROBLES ZEPEDA

REVISORES DE TESIS:

DRA. IRMA GUADALUPE LÓPEZ MURAIRA
DRA. ANDREA PAOLA PALMEROS SUÁREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. DICIEMBRE, 2018.

**DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**
Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **26/Nov./2018**

No. DE OFICIO: DEPI/286/2018

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**ING. DAVID RAMÍREZ ALVARADO
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRÍA
PRESENTE**

Por este conducto, tengo el agrado de comunicarle que el Comité Tutorial asignado a su trabajo de tesis titulado **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *in vitro* DE DIFERENTES ESPECIES DE AGAVE"**, ha informado a esta División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPI), que están de acuerdo con el trabajo presentado. Por lo anterior, se le autoriza a que proceda con la impresión definitiva de su trabajo de tesis.

Esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro*



DR. ISAAC ANDRADE GONZÁLEZ
JEFE DE LA DEPI.



S.E.P
TECNM
14DIT0003B
IT TLAJOMULCO
DIV. DE ESTUDIOS
DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

C.c.p. L.I. Andrea Torres Rico.- Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
Expediente
IAG/mjvs.

Km. 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán – Mpio. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco
C.P. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. Tels. Conmut. (33) 3772-4426 ó 27 Ext. 7024
e-mail: depi_tlajomulco@tecnm.mx www.ittlajomulco.edu.mx

Dedicatoria

Con amor a mis padres y familia:

Ma. Guadalupe Alvarado A., y Reynaldo Ramírez A.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada durante el periodo de estudios

Dr Juan F. Gómez-Leyva por el gran apoyo recibido abriendo nuevos horizontes en la formación académica, y acompañado por una fructífera amistad

Dr Ramón E. Robles-Zepeda por su amplia disponibilidad para incorporarme a su centro de investigación enriqueciendo este trabajo

A compañeros, amigos y profesores del laboratorio de biología molecular y maestría que durante el periodo de formación brindaron momentos inolvidables

C. Lucio López Lomelí, productor de raicilla en Mascota Jal., por la valiosa cooperación y donación de material vegetal

Compañeros y profesores del laboratorio de investigación de productos naturales por su gran ayuda durante la estancia realizada en UNISON

A Janette Pérez por su enorme cariño e invaluable amistad

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *in vitro*
DE DIFERENTES ESPECIES DE AGAVE

David Ramírez Alvarado

Diciembre, 2018

Contenido general

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos	ii
Contenido general.....	iv
Lista de tablas y figuras.....	vi
Lista de abreviaturas y símbolos	vii
Resumen.....	viii
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	2
2.1 Generalidades de los agaves.....	2
2.2 Metabolismo secundario del género agave.....	7
2.3 Características generales de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> y <i>Heliopsis longipes</i>	11
2.4 Evaluación antiproliferativa <i>in vitro</i> de extractos vegetales.....	12
2.5 Generalidades del cáncer.....	15
2.6 Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	16
III. Objetivos.....	18
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	18
IV. Metodología.....	19
4.1 Sitios de estudio, colecta del material vegetal y obtención de extractos.....	19
4.2 Caracterización de los extractos	22
Análisis de carbohidratos en los extractos	22
Identificación de carbohidratos por cromatografía en capa fina	22
Cuantificación de azúcares reductores	23
Determinación de fitoquímicos	23
Estimación de fenoles totales	23
Estimación de saponinas	24
Cuantificación de sapogeninas esteroidales	24
Evaluación de la actividad antioxidante	25
Método DPPH	25
4.3 Evaluación biológica	25
Ensayo de viabilidad celular	27

Evaluación de actividad anti-inflamatoria	28
4.4 Análisis de datos	29
V. Resultados y discusión	30
VI. Conclusiones	67
VII. Literatura citada	68
ANEXOS	76

Lista de tablas y figuras

Tabla	Título	Página
Tabla 1	Clasificación y características de los agaves colectados.	33
Tabla 2	Resultados obtenidos de la cuantificación del análisis fitoquímico y azúcares reductores de jugos hidrolizados de agave, extractos de chilcuague y parota.	36
Tabla 3	Actividad antioxidante por DPPH de extractos hidrolizados de agaves.	39
Tabla 4	Valores de pH en jugos de agaves y de parota.	40
Tabla 5	Relación de las principales muestras de agave seleccionadas por un mayor contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante	40
Figura 1	Fotografías ilustrativas tomadas durante la colecta y tratamiento del material vegetal.	21
Figura 2	Perfil de monosacáridos y oligosacáridos por TLC presentes en los extractos hidrolizados.	34
Figura 3	Fotografías de las cuantificaciones colorimétricas en microplacas UV con los diferentes análisis de los extractos hidrolizados de agaves.	37
Figura 4	Perfil espectrofotométrico (450 a 700 nm) de saponinas totales presentes en extractos hidrolizados de agaves.	38
Figura 5	Plantas de agaves en su estado silvestre empleadas para su evaluación en modelo biológico.	41
Figura 6	Actividad antiproliferativa de extractos de Agaves sobre cuatro líneas celulares.	54
Figura 7	Extractos hidrolizados de pencas de agave no presentan actividad citotóxica sobre líneas celulares cancerosas (A-549, HeLa y RAW264.7) y líneas control (ARPE).	55
Figura 8	Extractos de raíz de <i>Heliopsis longipes</i> y frutos de parota presentan actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares ARPE, A-549, HeLa, y RAW264.7.	56-57
Figura 9	Actividad antiproliferativa de extractos de Parota y Chilcuague sobre cuatro líneas celulares.	58
Figura 10	Actividad antiinflamatoria de extractos de agave y chilcuague sobre RAW264.7 con inflamación previamente inducida por lipopolisacáridos de <i>E. coli</i> .	61
Figura 11	Viabilidad celular en ensayo antiinflamatorio con RAW264.7 a las 24 hrs previamente estimuladas con LPS.	62

Lista de abreviaturas y símbolos

DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DMEM	Dulbeccos' s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EH	Extracto hidrolizado de agaves
HeLa	Carcinoma cervical humano
ARPE-19	Epitelio pigmentado de la retina humana
RAW264.7	Macrofagos transformados por el virus de la leucemia abelson
A-549	Adenocarcinoma alveolar humano
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio
MS	Metabolitos secundarios
PBS 10X	Buffer fostato salino
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EQ	Equivalentes de quercetina
TLC	Cromatografía de capa delgada
cm	Centímetro
µl	Microlitro
g	Gramo
h	Hora
M	Molar
L	Litro
ml	Mililitro
mM	Milimol
mg	Miligramo
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos

Resumen

La caracterización fitoquímica de productos obtenidos de fuentes vegetales que son consumidos con propósitos medicinales respaldados con una evaluación mediante un modelo celular *in vitro* son la primer etapa para demostrar la efectividad biológica que podrían desempeñar en un modelo *in vivo*. El propósito de esta investigación fue determinar el contenido de fitoquímicos presentes en extractos de chilcuague, parota e hidrolizados de pencas de agaves para evaluar su actividad antiproliferativa y antiinflamatoria a diferentes concentraciones en líneas celulares. En dos municipios de Jalisco (Mascota y Tlajomulco de Zúñiga) se colectaron hojas de seis especies de agave: *Agave salmiana*, *A. tequilana*, *A. americana*, *A. inaequidens*, *A. maximiliana* y *A. rhodacantha* con variación de edad aproximada de 5 a 12 años, obteniendo diecisiete extractos hidrolizados (EH) mediante un tratamiento térmico y posteriormente fueron analizados en su versión cruda y una fracción precipitada, paralelamente un extracto por maceración en etanol de *Heliopsis longipes* y acuoso de frutos de *Enterolobium cyclocarpum* fueron incorporados. El perfil fitoquímico, actividad antioxidante y azúcares reductores fue analizado por espectrofotometría para cada extracto y por cromatografía en capa delgada los principales carbohidratos constituyentes de la bebida fueron identificados. La actividad antiproliferativa y antiinflamatoria del extracto de chilcuague, parota y de seis muestras de agave se evaluaron un panel de cuatro líneas celulares (ARPE, A-549, HeLa, y RAW264.7) que fueron expuestas a diferentes concentraciones (0, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados de este estudio demostraron variabilidad química intra en interespecífica en los agaves de las dos regiones. Los EH presentaron un pH entre 4.63 y 5.18, identificando por TLC glucosa, fructosa y sacarosa como los principales carbohidratos presentes. El contenido de fenoles totales oscila entre 291-84.3 mg/100 ml), sapogeninas 4.37-0.07 mg/100 ml), y una actividad antioxidante entre 7.83 y 3.81 $\mu\text{M/ml}$), azúcares reductores 3.22-0.86 g/100 ml) en EH, la mayor correlación encontrada fue para fenoles y actividad antioxidante con $r=0.42$. Ninguno de los extractos de agaves presentaron actividad atiproliferativa o antiinflamatoria. El extracto concentrado de raíz obtenido de *Heliopsis longipes* presentó actividad antiproliferativa y citotóxica sobre las cuatro líneas celulares, y alcanzado un IC_{50} de 95, 158.11, 189 y 247 $\mu\text{g/ml}$ sobre RAW264, HeLa, A-549 y ARPE. Mientras que para la muestra de parota colectada en Michoacán fue de 297.04 $\mu\text{g/ml}$ sobre A-549. Con respecto a la actividad antiinflamatoria sobre la línea celular RAW264.7 previamente inducida la inflamación por lipopolisacárido bacteriano obtenido de *E. coli* redujo la inflamación un 63 % a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Mediante pruebas fitoquímicas se encontró que los extractos de esta raíz poseen una importante cantidad de fenoles los cuales deberían ser estudiados al igual que los de parota. Este es el primer reporte en la evaluación de extractos hidrolizados de agave, no se presentó actividad antiproliferativa o antiinflamatoria, sin embargo, el producto debe ser considerado como una fuente de fitoquímicos y se sugiere profundizar en su estudio. Por primera vez con base a los resultados obtenidos se reporta actividad citotóxica de *Heliopsis longipes* e investigaciones posteriores serán necesarias para determinar el mecanismo biológico de acción.

Palabras Clave: variabilidad de fitoquímicos, chilcuague, antiproliferativo.

I. Introducción

El crecimiento poblacional se encuentra en aumento, y las necesidades por servicios básicos junto con los problemas de salud incrementan considerablemente. El cáncer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por el crecimiento descontrolado y anormal de células que afecta a millones de personas y ocasiona un gran número de decesos alrededor del mundo (OMS, 2018).

El género agave (*Agave* spp.) es una planta que tiene su origen en el continente americano y en México se encuentra la mayor diversidad y a lo largo del tiempo se han utilizado con múltiples propósitos. Por ejemplo infusiones por cocción, extractos por maceración y fracciones parcialmente purificadas obtenidas de raíces, aguamiel, flores y pencas han demostrado propiedades antioxidantes, antiproliferativas, desinflamatorias, antimicrobianas, entre otras (García et al., 2000; Yokosuka y Mimaki, 2009; Ahumada-Santos et al., 2013; Santos-Zea et al., 2016b). El contenido de compuestos fitoquímicos involucrados en dichas actividades biológicas difieren entre especies durante su maduración fisiológica experimentando cambios a través del tiempo de vida, mismos que son ocasionados por la diversidad genética e influencia de las condiciones ambientales donde se desarrollan (Rizwan et al., 2012; Santos-Zea et al., 2016c; Figueredo et al., 2018).

El principal atractivo industrial de los agaves es por la gran cantidad de carbohidratos que acumulan en la piña siendo aprovechados para la obtención de subproductos. Los azúcares son sometidos a procesos de hidrólisis con una posterior fermentación alcohólica para obtener bebidas comerciales, destacando el tequila, pulque y mezcal. Debido a las grandes cantidades de especies de agaves que se cosechan anualmente a lo largo del país para la producción de las bebidas, aproximadamente el 50 % del peso total de la planta se descarta. Grandes cantidades de hojas son desechadas cada ciclo a pesar de ser un reservorio importante de compuestos bioactivos con potencial aplicación en alimentos y en la industria farmacéutica (Nava-Cruz et al., 2015; López-Romero et al., 2017). Con base en lo anterior, en el presente estudio se llevó a cabo la cuantificación fitoquímica, evaluación antiproliferativa y antiinflamatoria de extractos hidrolizados de hojas de diferentes especies de agaves los cuales son principalmente destinados para la producción de raicilla en el municipio de Mascota Jalisco, bebida consumida por personas con propósitos medicinales relacionados para tratar o atenuar problemas relacionados con el cáncer. Así mismo, en los ensayos se incorporaron un extracto etanólico concentrado de Chilcuague (*Heliopsis longipes*), y extracto acuoso liofilizados de frutos de Parota (*Enterolobium cyclocarpum*).

II. Antecedentes

2.1 Generalidades de los agaves

El género agave (*Agave* spp.) es nativo del continente americano y se ha denominado a México como el centro de origen y diversificación, de acuerdo con las 200 especies descritas aproximadamente el 75% están distribuidas en los diferentes ecosistemas que se pueden encontrar a lo largo del país (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007).

Se caracterizan por ser plantas suculentas que presentan el metabolismo ácido de las crasuláceas (plantas CAM) y su principal característica es la fijación de CO₂ durante la noche. Estas plantas son capaces de adaptarse para sobrevivir en condiciones climáticas adversas por ejemplo toleran frío, calor y temporadas prolongadas de sequía en suelos áridos y semiáridos, inclusive pueden crecer en suelos pobres de nutrientes. En el reino vegetal diversas familias presentan este metabolismo y cerca del 7 % de estas plantas emplean esta ruta fotosintética (Silvera et al., 2010; Stewart, 2015).

El principal producto fotosintético del metabolismo primario que obtienen los agaves son los fructanos que son almacenados en la vacuola celular, estos polímeros de fructosa con o sin una unidad de glucosa interna o terminal generalmente presentan enlaces $\beta(2,1)$ y $\beta(2,6)$ (Mancilla-Margalli et al., 2007), sus principales funciones son para almacenar energía y actuar como osmoprotectores durante periodos de sequía. Este metabolismo les confiere la capacidad de adaptarse fácilmente a condiciones de estrés presentando la habilidad de cerrar estomas durante el día para evitar la pérdida de agua ocasionado por el calor y así eficientizar su contenido al máximo. Por otro lado, durante épocas de frío reducen el gradiente de presión de vapor entre las hojas y el ambiente, adquiriendo niveles más bajos de transpiración en comparación con diversas plantas que tienen el metabolismo C₃ y C₄, dichos parámetros bioquímicos los vuelven tolerantes a condiciones ambientales hostiles (Winter y Smith, 1996; Stewart, 2015).

Durante cientos de años estas plantas han sido explotadas. Dentro de las diversas finalidades para su aprovechamiento son empleadas como barreras naturales con importancia ecológica, para la generación de biocombustibles, son utilizadas como plantas de hornato para la decoración, se obtienen fibras naturales para la industria textil y en algunas regiones de México para la elaboración de cuerdas con fines de charrería, incluso son una fuente potencial de agua y nutrientes dentro de la ganadería. Para el aprovechamiento del ser humano representan una fuente de obtención de moléculas bioactivas, alimentos y la más importante para la obtención de bebidas alcohólicas (Pinos-

Rodriguez et al., 2006; Valenzuela-Zapata et al., 2011; Murillo-Alvarado et al., 2014; Nava-Cruz et al., 2015).

Debido a las múltiples características fisiológicas y bioquímicas antes mencionadas, y contemplando el amplio campo de aprovechamiento que exhiben los agaves con su amplia capacidad para adaptarse a diversos ambientes naturales (sequías, salinidad de suelos, incremento global de temperatura y escases de agua, baja disponibilidad de suelos cultivables) se les atribuye el nombramiento como un recurso fitogenético con un amplio nivel competitivo para su domesticación, explotación y reproducción controlada pensado en la importante derrama económica que pueden generar.

Como ya se había mencionado, el principal aprovechamiento a lo largo de la historia ha sido para la obtención de bebidas alcohólicas, estas plantas durante el transcurso de su vida acumulan azúcares masivamente en sus tejidos (principalmente en la "piña"), misma que es jimada y es el principal órgano de interés industrial. El proceso para la obtención de las bebidas se realiza de manera artesanal e industrial y durante estos procesos ocurren operaciones unitarias similares comenzando con el proceso de jimado de las piñas (cortar las hojas), seguido por hidrólisis de los azúcares mediante calor en hornos de mampostería o autoclaves industriales, después el proceso de extracción del jugo a partir de las piñas cocidas y una vez obtenidos los mostos hidrolizados son sometidos a procesos de fermentación y destilación para separar el producto alcohólico generado. Es importante considerar que para cada bebida alcohólica las prácticas culturales varían, y por tal motivo la calidad y cuerpo de los productos obtenidos difiere (Mahr, 2015).

La mayoría de agaves son plantas monocárpicas, es decir, sólo se reproducen una vez durante su vida como mecanismo programado antes de morir (Simcha, 2017), dependiendo de la especie y condiciones ambientales pueden tardar desde 6 hasta 12 años en llegar a la madurez, inclusive hay alguno que tarda de 40 a 50 años para lograrlo (*Agave deserti*), y la propagación de estos se puede dar por semillas, tallos vegetativos y por propágulos de la inflorescencia. Durante la etapa de madurez también se inicia el periodo de reproducción, algunos agaves comienzan con la formación del escape floral en la parte interna de la roseta mejor conocido como "quiate" requiriendo de una gran demanda energética, para esto, los fructanos que fueron acumulados durante su crecimiento son hidrolizados en carbohidratos solubles y empleados fisiológicamente como su fuente de energía (López y Mancilla-Margalli., 2007; Nava-Cruz et al., 2015).

Durante la práctica agronómica en las diferentes regiones productoras de bebidas alcohólicas en el país a una gran cantidad de los cultivos de agaves que serán destinadas para la obtención de bebidas se les jima (corta) el quiote, con la finalidad de preservar y concentrar la mayor cantidad de azúcares fermentables en la piña, maximizando la cantidad final de su principal producto fotosintético que representa el mayor interés con fines industriales.

Al existir especies cultivadas, semicultivadas y silvestres en los diferentes ecosistemas existentes, se puede encontrar una gran variedad de bebidas alcohólicas que tradicionalmente han sido consumidas desde las culturas prehispánicas de Mesoamérica, recordemos que México es el centro de origen y es donde antiguamente se comenzó con la elaboración de diversas bebidas regionales. Con la finalidad de proteger las zonas de producción, se ha obtenido el reconocimiento de denominación de origen del tequila en el año de 1974 y hasta la fecha algunas otras bebidas están en el mismo proceso por ejemplo la Raicilla que busca dicho nombramiento.

A lo largo del país, las bebidas alcohólicas son originarias de diferentes especies de agaves y representan una tradición importante y fuente de empleo para diversas comunidades. El *aguamiel* es consumido como una bebida nutracéutica de alto valor nutricional para personas con deficiencias nutrimentales y el producto obtenido de su fermentación mejor conocido como *pulque* también es consumido; otras bebidas alcohólicas típicas como agua de lechuguilla, mezcal, bacanora, sisal y raicilla son producidas en diferentes regiones empleando agaves específicos para la elaboración de cada una de ellas. Las piñas son el principal producto de interés obtenido de los agaves por ser la mayor reserva de carbohidratos, sin embargo las pencas (hojas) también representan un importante reservorio tanto del metabolismo primario como secundario. Dependiendo de la especie de agave adulto, en algunas de estas regiones son utilizadas tradicionalmente en la preparación de alimentos para conservar el calor generado durante su cocción, sin embargo una gran cantidad de toneladas son desperdiciadas durante el proceso de jima (Mahr, 2015; Escalante et al., 2016).

Diversos municipios de los estados de Jalisco, Nayarit, Guanajuato, Tamaulipas y Michoacán en conjunto han sido galardonados con la denominación de origen del tequila, es decir, sólo plantas cultivadas en esas regiones pueden ser empleadas para dicha producción siendo ésta la bebida con mayor impacto económico de esta especie, obtenida del *Agave tequilana* Weber var. Azul, que de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2012 es la única especie con la que se puede elaborar. Esta actividad industrial genera incrementos anuales en su demanda a nivel nacional e

internacional, promoviendo una derrama económica importante y la generación de fuentes de empleos.

Por otra parte, la importancia económica que representan las bebidas alcohólicas y la demanda nacional e internacional por sus productos en mercados de distribución actuales y emergentes provoca que algunas especies se encuentran amenazadas debido al incremento en su depredación y escasa reproducción silvestre, tal es el caso del *Agave inaequidens* Koch (también conocido regionalmente como Lechuguilla), una de las principales fuentes de materia prima para la obtención de "Raicilla" en Jalisco (López-Lomelí, 2016). En el estado de Jalisco se localiza la mayor producción anual en toneladas en gran parte por el *Agave tequilana*, seguido de Oaxaca y Nayarit con 6.5, 3.06 y 1.18 x 10⁵ toneladas anuales respectivamente.

Debido a la amplia distribución geográfica en las diferentes regiones del país donde se encuentran los agaves, Oaxaca es el estado con la mayor diversidad de especies encontrando un 23 %, mientras que en el Occidente de México a donde pertenece Jalisco específicamente en la Sierra Madre del Sur y al Eje Neovolcánico se pueden observar la mayor diversidad (García-Mendoza, 2004), en las que destacan el *Agave tequilana*, *Agave angustifolia*, *Agave maximiliana*, *Agave inaequidens* y *Agave valenciana*.

Específicamente en la región Occidental del estado de Jalisco los municipios de Mascota, Talpa de Allende, San Sebastian del Oeste, Atenguillo, entre otros; en conjunto conforman una zona productora de una bebida alcohólica denominada como "Raicilla", los primeros antecedentes para la elaboración coloquial de dicha bebida han sido registrados desde el siglo XVI. Es cuanto a sabor y fuente de obtención los procesos son muy similares comparado con el de otras bebidas alcohólicas como el mezcal y tequila, esta bebida se promueve durante su venta como un producto orgánico. Comparando esta bebida con las demás que compite, se emplean plantas silvestres como *Agave inaequidens*, *Agave maximiliana*, *Agave angustifolia* y *Agave rhodacantha*, dichas especie varían dependiendo del municipio donde se produzca y la cantidad de especies obtenidas en cada periodo de producción.

Actualmente existes esfuerzos en conjunto por promover su existencia e incursionarla en el mercado como una bebedida alterna de consumo para las personas amantes de productos alcohólicos artesanales, dicha difusión se debe principalmente a la creación de un consejo mexicano promotor

de la raicilla en la región con la finalidad de agrupar y asociar a los productores para incrementar las estrategias de producción y por consecuencia la disponibilidad y aceptabilidad de dicha bebida.

En cuanto al manejo agronómico de los subproductos de los agaves jimados empleados para elaborar la raicilla, como práctica cultural en dicha región y aprovechando las pencas de los agaves empleados para la elaboración de la bebida, tradicionalmente algunos productores de raicilla comercializan un jugo de agave que es producto de una hidrólisis generada por calor a partir de las hojas. Esta actividad consiste en aprovechar el horno después que se ha utilizado para cocer las piñas y el proceso para su obtención consiste en “*tatemar*” (cocer) las pencas. El calor generado en los hornos es aprovechado para introducir las pencas y el tiempo de exposición al calor es aproximado de 15 horas, después de esto se extrae el jugo en cual se embotella y se mantiene en congelación hasta su venta. El precio por litro de jugo se comercializa aproximadamente en \$200.00 M.N. Testimonios por parte de las personas que han consumido el jugo hidrolizado de las pencas de agave afirman que han presentado una respuesta positiva que impacta en la mejora de su salud, específicamente personas con problemas de cáncer o relacionados con inflamación muscular (López-Lomelí, 2016).

Desafortunadamente hasta la fecha no se cuenta con reportes relacionados con el consumo de este producto y su efecto en la salud humana. Atendiendo esta práctica cultural en la región de Mascota Jalisco, se decidió realizar la presente investigación en la cual se obtuvieron extractos hidrolizados de diversas especies de Agaves que fueron evaluados en ensayos biológicos con células. También se realizaron determinaciones químicas de los jugos hidrolizados para su caracterización fitoquímica determinando similitudes y diferencias en el seguimiento de los compuestos del metabolismo secundario. Los resultados obtenidos en este estudio relacionados a esta práctica son documentados por primera vez, y se podrá asociar algunos de los posibles beneficios del consumo de esta bebida.

Debido a que el tiempo de crecimiento es lento en todas las especies de agaves, se necesitan de varios años para alcanzar la madurez fisiológica, por tal motivo la biotecnología aplicada al género ha permitido incrementar su aprovechamiento y diversificar los productos obtenidos. Recientemente se ha utilizado como edulcorante y para sustituir grasas incorporando fructanos en matrices alimentarias, por ejemplo durante la preparación de galletas modificando el tipo (grado de polimerización: GP) y concentración de fructano sin afectar las propiedades reológicas.

Continuando con los hidratos de carbono y su presencia en los agaves, los fructanos han ganado terreno en el campo de la investigación y su consumo ha incrementado por ser considerados como alimentos funcionales específicamente por la actividad prebiótica que pueden generar, dicha actividad varía dependiendo de la especie y GP de los fructooligosacáridos empleados y hasta la fecha los principales fuentes de fructanos son *Agave salmiana* y *Agave tequilana*, mismos que actúan como fibra soluble en el aparato gastrointestinal llegando intactos hasta en el intestino grueso donde son aprovechados como alimento por bacterias, promoviendo directa o indirectamente beneficios a la salud (López-Velázquez, et al., 2015; Santiago-García, et al., 2017). Esta nueva fuente de aplicación representa para la industria de alimentos funcionales un campo de investigación en expansión para su aprovechamiento.

Es relevante considerar que no solo los productos del metabolismo primario (en este caso los fructanos) representan un campo de estudio en el género, el metabolismo secundario también es ampliamente investigado; por ejemplo las raíces, hojas, piña, el aguamiel e incluso las flores representan fuentes para la obtención de moléculas con interés científico y médico, principalmente de compuestos fitoquímicos con actividades biológicas en el ser humano.

2.2 Metabolismo secundario del género agave

Las plantas son biofábricas incansables que durante su periodo vegetativo acumulan una amplia cantidad de moléculas del metabolismo primario y secundario, cada una con interés fisiológico distinto y el ser humano que explota estos recursos se ve beneficiado por los productos naturales que obtiene.

A través del tiempo las plantas han desarrollado mecanismos adaptativos para sobrevivir en los diferentes ambientes que se desarrollan. Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos químicos sintetizados por las plantas con diversas finalidades y su biosíntesis representa una gran diversidad estructural en el reino vegetal mismos que son esenciales dentro de la supervivencia (Wink, 2016). Debido a esta amplia diversidad molecular, existen diferentes genes que están involucrados para codificar enzimas durante la biosíntesis del metabolismo secundario. Las principales rutas de biosíntesis de los MS incluyen a diferentes precursores del metabolismo primario, por ejemplo moléculas como Acetil-CoA, algunos aminoácidos como fenilalanina-tirosina, triptófano, lisina, ornitina e incluso glucosa y ácido quínico (Dewick, 2002).

Dentro de los mecanismos de generación de las diferentes familias de compuestos, los principales esqueletos de cada uno están sujetos constantemente a reacciones bioquímicas en las células vegetales para modificar su estructura, por ejemplo algunas de estas son: alquilación, descarboxilación, transaminación, glucosilación, oxidación y reducción. Fisiológicamente la producción, transporte y almacenamiento en las plantas son energéticamente muy costosos.

Algunos organelos celulares están en contacto directo durante esta ruta bioquímica, usualmente el citoplasma es el lugar para la síntesis de los MS, en algunos casos se desarrollan en los cloroplastos o vesículas y las vacuolas son el compartimento celular de varios metabolitos hidrofílicos como alcaloides, betalainas, flavonoides, saponinas, ácidos orgánicos, entre otros. Por otro lado, los MS lipofílicos no son almacenados en la vacuola, éstos se encuentran en conductos de resina, en escamas glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 2016).

Los MS se caracterizan por participar en múltiples funciones biológicas en las plantas, actúan como protectores naturales generados para el estrés oxidativo ocasionado por rayos UV, forman parte de compuestos para la señalización, es decir, para su polinización, promoviendo la dispersión de semillas por los animales e incluso actúan como mecanismos de defensa contra su depredación por herbívoros, bacterias, hongos e incluso contra plantas competentes en el ambiente donde crecen (Wink, 2010). A lo largo del tiempo el ser humano ha explotado los recursos naturales que otorga la naturaleza, el reino vegetal y la basta cantidad de compuestos que generan vuelve atractivas a las plantas como elementos de importancia económica.

Diversos miembros del género *Agave* spp. se han caracterizado por ser un amplio reservorio de compuestos provenientes del metabolismo secundario, dichas moléculas han sido asociados a diversas actividades biológicas, químicas y consumidas con propósitos medicinales desde tiempos precolombinos. Dentro del aprovechamiento industrial e integral por prácticas culturales del agave, las pencas (hojas) en algunos casos son utilizadas para obtener compuestos bioactivos que almacenan, dichos compuestos químicos han sido aislados y se ha demostrado que presentan actividades biológicas, por ejemplo citotóxicas, antiproliferativos, antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante, antiparasitario, entre otros (Sparg et al., 2004; Rizwan et al., 2012; Santos-Zea et al., 2012; Ahumada-Santos et al., 2013; Sidana et al., 2016).

Las diferentes actividades de los compuestos obtenidos a partir de los tejidos de agaves han sido asociados a los compuestos que pueden sintetizar, algunos de ellos son las saponinas, sapogeninas

esteroidales, flavonoides, esteroides, ácidos fenólicos, taninos y cumarinas volátiles. Este género se caracteriza por acumular en sus tejidos dichas moléculas (Yokosuka y Mimaki, 2009; Sidana et al., 2016), sin embargo las saponinas, sapogeninas y fenoles son las moléculas con mayor interés y más estudiadas del género por sus múltiples actividades biológicas demostradas.

Las saponinas son un vasto grupo de glucósidos que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Estas moléculas son solubles en agua y una característica peculiar para distinguirlas de los demás glucósidos es la capacidad que tienen para formar espuma (Sparg y van Staden, 2004). En la mayoría de los procesos de extracción se emplean equipos Soxhlet, por reflujo y maceración. La mayoría de saponinas presentes en agaves son solubles en solventes polares, por ejemplo metanol o combinación de metanol (o etanol) con agua, y para su análisis las saponinas presentes en extractos complejos pueden ser precipitadas agregando un exceso de acetona (Eskander et al., 2010; Cheok et al., 2014).

En este caso, la molécula Agavegenin D es el único compuesto perteneciente a las sapogeninas esteroidales del tipo espirostanol reportado en el género. Sin embargo, las sapogeninas que presentan un esqueleto furostanol y furoespirostanol no han sido reportadas. El esqueleto espirostanol tiene un anillo tetrahydrofurano (E) y un anillo tetrahydropirano (F) unido al carbono C-22, estos compuestos han sido aislados de hojas, flores, jugo de hoja, rizoma y cultivos de callos en plantas de agave. Las moléculas difieren una de otra en términos de la presencia o ausencia de insaturaciones en los anillos B o C, diferencian su configuración del Hidrógeno en el Carbono 5 y 25 (debido a las diferencias biogénicas), y métodos asociados a Resonancia Magnética Nuclear, Infrarrojo y Espectrometría de masas pueden detectar dichas estructuras (Sidana et al., 2016).

Por otra parte, la composición típica de las saponinas es la unión de una aglicona (también llamada sapogenina, es la parte hidrofóbica) y moléculas de azúcar (llamada glicona, es la parte hidrofílica). Específicamente en el género agave, las moléculas presentan residuos de carbohidratos con enlaces β -D-glucopiranosil, β -D-Galactopiranosil, β -D-xilopiranosil y α -L-ramnopiranosil. Las saponinas de agave se pueden clasificar de forma general como glucósidos de espirostanol o glucósidos de furostanol y difieren por el número de unidades de azúcar unidas, posteriormente podrían ser clasificadas como mono, di, tri, tetra, penta o hexaglucósidos. Si la molécula de saponinas presenta la unidad o unidades de azúcar en una sola posición, es llamada monodesmosídica, caso contrario a las bidesmosídicas en las cuales se localiza en dos diferentes posiciones de la aglicona (Sidana et al., 2016).

Los agaves sintetizan dichos compuestos principalmente para defenderse por el ataque de patógenos y herbívoros. Dependiendo de la composición química (incluida la presencia de aglicona), tipo de saponinas (numero de unidades de azúcar) y la fuente vegetal de obtención, estas moléculas pueden generar perturbaciones en las membranas celulares ocasionadas por el origen anfipático de las saponinas, dicha unión celular con la bicapa lipídica en ocasiones provoca la formación de poros celulares, genera vesículas e incluso forma complejos que intervienen con la funcionalidad de los dominios celulares y como resultado provoca disfuncionalidades biológicas (Augustin et al., 2011).

Múltiples estudios han demostrado que especies de agave presentan diferencias en la composición fitoquímica y tipo de saponinas, con base en esta variabilidad un estudio reciente conducido por Santos-Zea et al. (2016) analizaron 18 muestras de savia concentrada de agave y once saponinas esteroidales fueron identificadas por HPLC-MS-TOF, siendo Magueyosido B y kamogenin tetraglucósido las saponinas más abundantes identificadas, mientras que Eskander et al., (2010) reportaron una saponina espirostanol monodesmosídica a partir de las hojas de *Agave macroacantha*.

La composición de fenoles también difiere en la especie, y los procesos para su extracción han sido optimizados para aprovechar la mayor cantidad de fenoles de los tejidos vegetales. Dentro de estas variantes, Hamissa et al., (2012) modificaron las atmósferas de extracción empleando reactores, temperaturas y tiempos empleados. Debido a la múltiples procesos de extracción, una evaluación paralela de los antioxidantes se analizó para saber si se ha visto afectada.

Con base a la acumulación de compuestos de interés, la explotación industrial del tejido foliar representa aproximadamente el 50 % en peso seco y la cantidad de metabolito que se podría obtener representa un campo de aprovechamiento importante. Estas moléculas están asociadas por exhibir actividad antioxidante en modelos *in vitro*. En este aspecto, Rizwan et al. (2012) analizaron el contenido de fenoles y flavonoides a partir de hojas de *Agave attenuata*, la actividad antioxidante del extracto metanólico empleando diferentes fracciones con distintas polaridades, presentando capacidad de inhibir el radical DPPH en el rango de 73.97 % para metanol y 61.41 % para hexano respectivamente. Durante los ensayos de actividad biológica determinaron que la fracción de cloroformo presenta actividad hemolítica en 2.64 % y actividad antimicrobiana en un panel de bacterias y cepas de hongos.

Con el interés por determinar la variación respecto al contenido fenólico entre especies y diferentes sitios de colecta, Almaraz-Abarca et al., (2009) analizaron la composición en pencas, polen y flores empleando plantas adultas y jóvenes de *Agave duranguensis* y *Agave asperrima*. En el polen se determinaron 13 compuestos mientras que en las hojas un total de 32, determinando que son tejidos ricos en flavonoles específicamente derivados de kaempferol. Estos resultados confirman la variación en el contenido químico y características morfológicas entre la misma especie. Otras variedades como el *Agave tequilana* Weber, utilizado principalmente para obtención de tequila también es una fuente de fenoles, dos de los tres compuestos pertenecientes al grupo de homoisoflavanonas fueron identificados por primera ocasión en hojas y piñas (Morales-Serna et al. 2010).

El *Agave americana* es la especie más estudiada por su contenido fenólico, un estudio realizado por Narsi y Salem, (2012) reportan 7.7 g/kg de fenoles totales y 80 g/kg de saponinas ambas de materia seca, mientras que en otro estudio Hamissa et al., (2012) encontraron 4.49 y 12.30 mg/g de peso seco empleando diferentes temperatura de extracción correspondiente a 25 y 150°C respectivamente.

Existen múltiples especies de agave que se pueden encontrar en los diversos climas en México las respuestas químicas y bioquímicas en la acumulación difieren entre especies debido a la variación genética, incluso a condiciones de nutrición, estrés biótico y abiótico, lo que convierte al género *Agave* como un campo multifuncional de estudio.

2.3 Características generales de *Enterolobium cyclocarpum* y *Heliopsis longipes*

La especie *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb., mejor conocida en México como oreja de elefante, nacaste, huanacaxtle o parota, es un árbol integrante de la familia Fabaceae, caducifolio nativo del continente americano y su distribución geográfica abarca regiones tropicales y templadas de diversos países. Su distribución en México comprende gran parte del país (Naturalista, 2018).

Diversos usos a partir de la parota han sido reportados, la madera que produce es utilizada ampliamente en la construcción de habitaciones, implementos para el hogar y herramientas de trabajo, las gomas generadas son implementadas como adhesivos, mientras que las semillas son una fuente importante de proteínas con un 32-41 %, convirtiéndose en una excelente fuente de alimentación como forraje, y una amplia cantidad de saponinas que se encuentran en los frutos se utiliza como sustituto de jabón (Naturalista, 2018).

Los exudados en corteza, tronco, raíz y fruto son aprovechados con fines medicinales. Las infusiones son utilizadas con actividad depurativa, remedio para tratar bronquitis, resfríos, para diarrea y hemorroides. La composición química reporta alcaloides, fenoles, saponinas, taninos y en actividades biológicas se han reportado como antibacterial y antiproliferativo (Ojeda et al., 2015; Sowemimo et al., 2015).

Por otra parte, la especie *Heliopsis longipes* S.F. Blake, es conocida como raíz de oro, pelitre, chilcuán y el más popular como chilcuague; nombre que deriva de *chilmecatl* palabra con origen náhuatl, "Chilli" o "chili" que significa picante o picoso, y "mecatl" que significa cordel; es decir, raíces filiformes y de sabor pungente. Es una hierba endémica que se puede encontrar a la Sierra Gorda y Sierra Alvarez, área perteneciente a los municipios de Xichú, Victoria, Atarjea y San Luis de la Paz, lugares que comparten tradiciones de consumo y producción y las cuales convergen en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí (Cilia-López et al., 2008).

La raíz es el principal tejido con interés etnobotánico y en la medicina tradicional mexicana es utilizada para tratar dolor de encías como anestésico local, contra parásitos y como condimentos en los alimentos. Su uso se extiende hasta América del sur donde es utilizado debido a sus propiedades anti-inflamatorias y analgésicas.

En diferentes regiones de México extractos de chilcuague también han sido evaluados por sus propiedades insecticidas para combatir plagas en cultivos de sorgo y en la composición de la raíz se ha determinado azúcares, flavonoides, terpenos y principalmente alcaloides, mientras que en las hojas contienen esteroides, terpenos y flavonoides, compuestos que están asociados a las diferentes actividades (Cilia-López et al., 2008; Hernández et al., 2009; Cilia-López et al., 2010; Martínez-Silva et al., 2016).

2.4 Evaluación antiproliferativa *in vitro* de extractos vegetales

Los productos naturales contienen una amplia variabilidad de compuestos químicos obtenidos de rutas pertenecientes al metabolismo secundario y pueden ser obtenidos a partir de plantas (diversos tejidos), productos marinos y cultivos bacterianos (Sarker y Nahar., 2012). Generalmente, la evaluación de extractos crudos a nivel laboratorio en modelos *in vitro* empleando cultivos celulares son el primer acercamiento para determinar si dichos extractos contienen moléculas con actividad antiproliferativa o citotóxica, entre otras. Una vez que se haya identificado una respuesta celular frente a dichos estímulos por parte de moléculas presentes en los extractos, posteriormente los

extractos crudos son sometidos a diversos métodos analíticos de purificación para determinar cual es la fracción o molécula que presenta la mayor actividad.

Históricamente, el consumo de plantas o subproductos de ellas son utilizadas con propósitos terapéuticos para controlar o atenuar problemas asociados con la salud. Esta actividad es originada por prácticas antiguas alrededor del mundo, mismas que se dieron desde el comienzo de las civilizaciones y que han utilizado especies vegetales originarias de su región y que por una observación empírica asocian su consumo con un efecto benéfico que impacta positivamente en su salud, estas actividades son heredadas generación tras generación, y quizá, la manera más utilizada es mediante la preparación de infusiones o mediante su consumo directo.

Gran parte de las evaluaciones realizadas en bioensayos están basados con células, receptores o enzimas que detecten respuestas bajo un estímulo celular y son originadas por las tradiciones que conservan diversas poblaciones o etnias. Estas investigaciones tienen como objetivo ser confirmadas o rechazadas bajo un apego estricto a la evaluación científica a nivel laboratorio para descubrir si dichas moléculas representan un interés comercial o social (Houghton, 2000).

Existen diferentes técnicas analíticas que permiten el aislamiento e identificación de moléculas, esto dependerá de su origen y de la accesibilidad a tecnologías disponibles. Los estudios metabolómicos son una herramienta biotecnológica que permite identificar las rutas de biosíntesis de los metabolitos presentes en los productos naturales y pueden describir su actividad biológica en células. Debido a que los organismos producen pequeñas cantidades de compuestos naturales, la búsqueda por mejorar los procesos y estrategias para el aislamiento e identificación de moléculas bioactivas están en constante progreso (Nguyen et al., 2012; Raftery, 2014).

Como se mencionó anteriormente, dichas variantes contemplan desde los solventes empleados originados por la solubilidad de los compuestos, los tiempos de extracción enfocándose en que permanezca la bioactividad de los compuestos, algunos otros contemplan etapas fisiológicas donde se sintetizan la moléculas de interés, también se evalúa la mayor producción del metabolito sometiendo a diversos tipos de estrés a las fuentes de obtención, además de contemplar si se deben proteger de la luz o de procesos térmicos (Bae et al., 2012).

Los bioensayos dirigidos para encontrar moléculas con capacidad citotóxica o antiproliferativa (viabilidad celular) obtenidas de las plantas son extensamente reportados alrededor del mundo (García-Solís et al., 2009; Rascón-Valenzuela et al., 2015; Torres-Moreno et al., 2015), y un evento

biológico ampliamente estudiado en la ciencia es la apoptosis o también conocida como muerte celular programada, término que fue usado por primera vez en el año de 1972. Este proceso se caracteriza por presentar cambios morfológicos en las células y los mecanismos funcionales bioquímicos que son dependientes de energía cambian radicalmente (Elmore, 2007).

Es por ello que la apoptosis es una vía compleja que incluye en su maquinaria biológica una cascada múltiple de señalizaciones donde participan activadores, efectores y reguladores que pueden ser detectados para evaluar y determinar el mecanismo de muerte cuando las células son expuestas a determinadas moléculas. Diversos ensayos pueden ser aplicados para determinar alteraciones citomorfológicas, fragmentación de ADN, la expresión de genes proapoptóticos o antiapoptóticos mediante PCR en tiempo real, microarreglos, detección del nivel de caspasas, ensayos mitocondriales, medición de sustratos clave e inhibidores, alteraciones membranales, entre otros (Elmore, 2007).

Para ejemplificar, diversos compuestos químicos como las saponinas y polifenólicos presentan actividad citotóxica, sin embargo no en todas las investigaciones se reporta el mecanismo exacto de cómo se genera la apoptosis. En lo que compete a la especie evaluada en esta investigación, los componentes químicos de diversos agaves han presentado actividades citotóxicas, y el primer reporte registrado fue realizado por Bianchi y Cole (1969) en el cual analizaron el efecto de saponinas del *Agave schottii* Engelm en cáncer de mama en un modelo murino administrando diferentes dosis de extracto obteniendo una incidencia del tumor en un 7 y 28 %, los extractos fueron obtenidos de inflorescencias sometidos a hidrólisis y separados por cromatografía en columna monitoreando la presencia de los compuestos por TLC. Por otra parte, Sáenz et al. (2000) evaluaron la actividad citostática empleando extractos de hojas por decocción a partir de *Agave intermixta* L. en células hepáticas (HEp-2), obteniendo un IC₅₀ de 68.032 µg/ml. Mientras que Yokosuka y Mimaki (2009) aislaron diferentes compuestos y los identificaron por resonancia magnética nuclear a partir de extractos metanólicos, en estos resultados las células de leucemia (HL-60) mostraron citotoxicidad a cuatro de los 15 compuestos evaluados con un IC₅₀ de 5.5, 9.4, 11.3 y 12.3 µg/ml respectivamente. Debido a estos antecedentes en la especie y asociando los testimonios de personas que aseguran presentar signos positivos que benefician su salud por consumir hidrolizados de pencas de agaves, se decidió realizar esta investigación.

2.5 Generalidades del cáncer

El cáncer es una de las enfermedades que mayor número de decesos ocasiona en el mundo, generalmente es una enfermedad que provoca un crecimiento y deseminación incontrolado de células anormales que no son reguladas por su ciclo biológico normal y tienen la capacidad de generarse en cualquier parte del organismo que invade (OMS, 2018).

Durante el año 2012, alrededor del mundo un total de 14.1 millones de nuevos casos fueron detectados y se proyecta que para el 2050 llegue a 27 con cerca de 17 millones de muertes. Según reportes publicados por la Organización Mundial de Salud (OMS) durante el 2012 se estima que en México la mayor incidencia de cáncer en hombres fue de próstata (17%) y en mujeres de pecho (15.8%). Esta enfermedad genera gastos millonarios para los gobiernos, por ejemplo en países desarrollados como Estados Unidos tan solo durante el 2010 el monto gastado fue cerca de 124.5 billones de dólares que incluye sólo para medicinas (Siegel et al., 2017; Islami et al., 2018). Existen diversos factores de riesgo internos y externos que están asociados para que se desencadene las enfermedades como la exposición a radiación, consumo de tabaco o alcohol, mutaciones durante el metabolismo, obesidad, predisposición genética, contaminación ambiental, factores reproductivos y hormonales. Las alternativas clínicas para controlar dicha enfermedad son mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, y en la mayoría de los casos el tratamiento es efectivo sólo si se cuenta con programas oportunos de diagnóstico.

Por otra parte, el estrés oxidativo está relacionado por contribuir como un factor que desencadena problemas de salud en la población mundial, y se define como una situación bioquímica que se caracteriza por el desequilibrio entre los radicales libres (principalmente las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), Nitrógeno, y los mecanismos de defensa antioxidante que están involucrados. Altos niveles de estas especies pueden interactuar con biomoléculas ocasionando daño celular lo que provoca alteraciones y cambios en sus funciones vitales (Viñas et al., 2012; Ichiishi et al., 2016).

Por los problemas antes mencionados es que las plantas continúan siendo un reservorio de compuestos bioactivos que sirven como modelo para descubrir moléculas citotóxicas que permitan producir análogos sintéticos para combatir el cáncer. Diversos compuestos han sido sintetizados a partir de plantas por ejemplo colchicina, ácido betulínico, silvestrol, elipticina, santonina, bruceantina, curcumina, entre otros. Actualmente un mayor número de grupos de investigación trabajan por determinar la relación estructura-actividad en su mecanismo de acción, y en diferentes

textos de divulgación científica se reporta hasta qué etapa llegan durante su análisis farmacológico (Srivastava et al., 2005; Khazir et al., 2014).

2.6 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

La inflamación es un mecanismo que se desencadena por defensa del cuerpo, y el sistema inmune es el encargado de reconocer cuando hay daño celular, irritantes, virus, bacterias o cualquier agente extraño que ponga en riesgo la integridad del ser vivo. Las enfermedades inflamatorias agrupan una gran variedad de trastornos y condiciones que se caracterizan por la inflamación, algunos ejemplos incluyen desde simples alergias, asma, enfermedades autoinmunes, enfermedad celíaca, hepatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, cáncer ó rechazo por trasplante, entre muchos otros (Knowles y Selby, 2005).

Los factores de riesgo que se describen el apartado 2.4 están relacionadas con el cáncer a través de los mecanismos de inflamación. El microambiente celular entre células cancerosas e inflamación están estrechamente ligados y han sido vinculados por numerosas líneas de investigación, principalmente se incluye a los factores de transcripción nuclear (NF- κ B), los transductores de señal y activadores de la transcripción 3 (STAT3), en conjunto estas dos vías están involucradas en la inflamación y se pueden activar por los factores de riesgo antes mencionados; segundo, una condición inflamatoria precede a la mayoría de los cáncer; tercero, NF- κ B y STAT 3 son constituyentes activos durante la enfermedad; y cuarto, ambos regulan genes asociados a tumorigénesis, entre otras vías de vinculación que podrían mencionarse entre ellas. Por tal motivo, la supresión de las rutas proinflamatorias son un objetivo que podría brindar la oportunidad para prevenir y tratar el cáncer (Aggarwal et al., 2009).

Las enfermedades cardiovasculares causadas principalmente por condiciones de inflamación exhorta a evaluar los efectos antiinflamatorios de moléculas o extractos naturales en modelos *in vitro*, por ejemplo empleando células (RAW 264.7) o directamente en modelos *in vivo* empleando ratones albinos o ratas Wistar, a los cuales previamente se les causan edemas en sus tejidos (Peanu et al., 1996; García et al., 2000; Paulino et al., 2008; Hernández-Valle et al., 2014).

En este contexto, el Óxido Nítrico (ON) es un regulador multifuncional celular de suma importancia debido a que está envuelto en respuestas inmunológicas sobre tejidos cardiovasculares y neuronales, y su efecto está relacionado con procesos patológicos como el asma e inflamación crónica. La vida media y acción biológica son muy cortas ya que es rápidamente oxidado en nitrito

y nitrato. Su actividad se da principalmente en la membrana del citoplasma y núcleo de la célula y ocurre en condiciones de inflamación. La síntesis resulta de la conversión del aminoácido L-Arginina a L-Citrulina mediado por la familia de isoformas conocidas como óxido nítrico sintasas (Gorocica et al., 1999; Lind et al., 2017).

La producción de ON se puede cuantificar por diferentes metodologías y un ensayo ampliamente utilizado es la formación de nitrito (NO_2^-) en medios de cultivo con células RAW264.7. Peter Griess en 1879 propuso una metodología que se basa en una reacción de diazotación (reacción entre una amina primaria aromática y NaNO_2 en presencia de HCl o H_2SO_4 para la formación de un sal de diazonio), dicho protocolo ha sufrido modificaciones. Con la ayuda de este sistema se detecta NO_2^- en experimentos biológicos con la previa generación de una curva de calibración (μM) con dicho compuesto.

Por otra parte, los macrófagos son células fagocíticas residentes en tejidos linfoides y no linfoides ampliamente versátiles adquiriendo diversas funciones en los tejidos y tipos de ambientes en los que se encuentran. Durante la respuesta inflamatoria juegan un papel central durante todas las etapas de su desarrollo y su función es reparar el tejido dañado (Geissmann et al., 2010; Dunster, 2016).

Los ensayos con macrófagos murinos RAW 264.7 inicialmente obtenidos de ratones infectados con el virus de la leucemia de Abelson son estimulados con diferentes lipopolisacáridos (LPS) bacterianos u otros obtenidos de goma xantana para la producción de ON, debido a que son extremadamente sensibles las células que son tratadas con LPS adquieren una morfología dendrítica y en diversos reportes se ha utilizado esta metodología (Saxena et al., 2003; Chen y Kang., 2013; Liu et al., 2017).

Desde tiempos precolombinos estas prácticas han sido utilizadas en la medicina tradicional, tal es el caso de los extractos naturales obtenidos de plantas para combatir padecimientos asociados con la salud o simplemente prevenirlos, y como se mencionó en los antecedentes se abordó de manera breve mediante una introducción que resalta los aspectos más importantes en el estudio de las plantas y la evaluación de sus productos químicos en líneas celulares.

El género agave previamente ha sido reportado por presentar actividades biológicas asociadas a moléculas con propiedades antiinflamatorias ó antiproliferativas y para ejemplificar tal es el caso de *Agave angustifolia*, *Agave intermixta* y *Agave americana*. Al ser una especie con un amplio uso a lo largo

del país y de gran importancia económica, en este documento se abre una nueva etapa de análisis de los productos hidrolizados de pencas de agave los cuales son consumidos tradicionalmente por personas con problemas de salud que están relacionados al cáncer, y con estos resultados se sientan antecedentes de su evaluación.

Junto con los experimentos empleando agaves, también se sometieron a estudio extractos de raíz de *Heliopsis longipes* (popularmente conocido como chilcuague) y de frutos de *Enterolobium cyclocarpum*. (parota), mismos que son utilizados en la cultura mexicana con múltiples finalidades.

III. Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad antiproliferativa y antiinflamatoria *in vitro* de extractos hidrolizados obtenidos de hojas de diferentes especies de agave, frutos de *Enterolobium cyclocarpum* y raíz de *Heliopsis longipes*.

Objetivos Particulares

- ☀ Realizar la caracterización de los componentes fitoquímicos presentes en extractos hidrolizados a partir de hojas de agaves adultos por un tratamiento de hidrólisis, así como también a muestras de parota y chilcuague.
- ☀ Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de extractos crudos y fracciones ricas de saponinas en un panel de líneas celulares (HeLa, A-549, ARPE, y RAW264).
- ☀ Evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos sobre células murinas (RAW264).

IV. Metodología

La presente investigación que lleva el título **Evaluación de la actividad anticancerígena *in vitro* de diferentes especies de agave**, fue desarrollada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco (ITTJ), y se realizó una estancia en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales en la Universidad de Sonora (UNISON).

Durante la investigación, se evaluaron principalmente extractos hidrolizados por cocción de un jugo a partir de hojas de seis especies de agaves, también se incorporó un extracto etanólico concentrado de la raíz de chilcuague (*Heliopsis longipes*) obtenido por método Soxhlet, y un extracto acuoso por maceración de harina obtenida de frutos de parota (*Enterolobium cyclocarpum*).

4.1 Sitios de estudio, colecta del material vegetal y obtención de extractos

Se prepararon extractos a partir de hojas provenientes de agaves, raíz de chilcuague y frutos de parota, su composición fitoquímica fue determinada por métodos espectrofotométricos, mediante un ensayo biológico empleando un panel celular se evaluó la actividad antiproliferativa con cuatro líneas celulares y posteriormente la actividad antiinflamatoria sobre macrófagos.

En la investigación se incorporaron hojas de diecisiete plantas de agaves silvestres y semi-cultivados de seis especies: *Agave salmiana*, *A. tequilana*, *A. americana*, *A. inaequidens*, *A. maximiliana* (lechuguilla) y *A. rhodacanta*, las cuales fueron muestreadas entre las 10:00 y 14:00 horas en la región productora de raicilla en Mascota Jalisco con coordenadas 20°26'26.84"N, 104°44'15.48" O aleatoriamente en un radio aproximado de 800 metros durante el mes de Noviembre del 2016, parte del material vegetal de estudio fue donado por el productor de raicilla Lucio López Lomelí y con el apoyo de Carlos Cruz Gaspar se obtuvieron las tomas de muestras.

Un segundo sitio de colecta fue durante el mismo periodo en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jal. en cuatro zonas. Primero en la localidad de San Miguel Cuyutlán (20°24'1.70"N, 103°22'40.68"O), zona productora de bebidas alcohólicas y cuerdas de ixtle para charrería; una tercera fue en el "Cerro Viejo" (20°25'8.81"N, 103°25'45.99"O); (20°27'11.07"N y 103°25'44.35"O), y por último en el Instituto Tecnológico de Tlajomulco (20°26'35.83"N y 103°25'19.34"O).

Durante la colecta, debido a la variedad en tamaño y edad de los agaves se obtuvieron de tres a seis hojas de cada planta teniendo como criterio principal de selección que las pencas fueran de la parte central de la roseta, la edad aproximada de las plantas fue proporcionada por los productores

de cada sitio. La altitud de las regiones descritas donde se realizaron las colectas es de 1521 msms para Mascota, y en Tlajomulco 1681, 1873, 1561 y 1563 msnm respectivamente.

Las hojas colectadas se transportaron al laboratorio de biología molecular donde fueron lavadas con agua eliminando polvo y espinas para posteriormente ser cortadas en partes pequeñas de aproximadamente un cm², en la figura 1 se observan imágenes representativas de la metodología seguida. Los trozos pequeños fueron colocados en matraz Erlenmeyer y se sometieron a un proceso de autoclaveado en condiciones de 121°C y 29.8 psi durante 15 minutos en autoclave marca Felisa 399. Debido a que durante esta temporada no se produciría raicilla, mediante este tratamiento se trato de simular los procesos artesanales de hidrólisis de pencas para obtener el jugo que es comercializado, sin embargo un productor de raicilla donó una muestra de jugo que comercializa.

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, el producto obtenido por cocción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se sometió a un proceso de molienda en licuadora Osterizer Blender, el jugo obtenido se filtró con manta de malla eliminando las fibras de las pencas obteniendo los extractos hidrolizados (EH) que fueron analizados en las pruebas. Para eliminar los sólidos presentes en los EH, los productos se colocaron en tubos de 50 ml y fueron centrifugados a 11000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en centrifuga Eppendorf 5804 R. Una vez recuperado el sobrenadante se almacenaron a -20 °C hasta su uso (figura 1). Las evaluaciones de los agaves se desarrollaron con los EH, y en una segunda versión las saponinas fueron precipitadas del EH con un exceso de acetona como lo describe Eskander et al. (2010).

El extracto de la planta de chilcualgue (*Heliopsis longipes*) fue obtenido gracias a una valiosa donación por Rogelio Gómez Sánchez. Las raíces fueron colectadas en la comunidad del Álamo perteneciente a La Sierra Gorda municipio de Xichú Guanajuato durante junio del 2016. El proceso de extracción fue desarrollado con un equipo Soxhlet, 15 g de raíz y 150 ml de etanol al 96 % permanecieron a 65 °C durante dos horas. Una vez obtenido el extracto, se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente para obtener una pasta concentrada que se mantuvo refrigerada a 4 °C hasta su uso. El último extracto fue a partir de frutos maduros de parota (*Enterolobium cyclocarpum*) los cuales fueron colectados en los municipios de Colima, Colima y Uruapan Michoacán. La semilla fue separada y se redujo el tamaño de partícula utilizando un molino de mano. Cincuenta gramos de harina permanecieron en extracción con 950 ml de Agua a 4 ° durante cuatro días con agitación ocasional. Después se filtró con bomba de vacío y matraz kitasato (figura 1), el extracto obtenido se centrifugó y almacenó empleando la misma metodología seguida para los EH de agave.



Figura 1. Fotografías ilustrativas tomadas durante la colecta y tratamiento del material vegetal. A y B) Colecta de las pencas de agaves adultos en su estado silvestre. C) Ejemplo de Agave spp. al cual se le jimó la inflorescencia para destinar a la planta a producción de raicilla. D) Pencas colectadas y tratadas en laboratorio. E) Trozos de las pencas en matraz erlenmeyer antes de hidrolizar. F) Obtención de los jugos crudos que fueron hidrolizados en autoclave. G) Extractos hidrolizados para analizar. H) Donación de jugo que fue producido por proceso artesanal en Mascota Jalisco. I) Metodología para filtrar el extracto de parota. Fotografías: fuente propia.

4.2 Caracterización de los extractos

La caracterización y cuantificación fitoquímica de los extractos fue realizada en su versión completa (EH) y también a los que fueron precipitados con un exceso de acetona, a ensayos antiproliferativo y antiinflamatorio. Debido a que fueron una considerable cantidad de plantas muestreadas, el objetivo de las mediciones fitoquímicas fue para obtener un resultado general en cada EH como pruebas preliminares teniendo como criterio de selección el mayor contenido de fenoles, saponinas y actividad antioxidante. Los resultados obtenidos servirán para determinar y discutir el comportamiento de los fitoquímicos entre diferentes especies del mismo género, la relación entre edades y sitios de colecta. Para disminuir el número de muestras, las plantas que obtuvieron mayores concentraciones de estos compuestos fueron liofilizadas, posteriormente se prepararon las soluciones madre con DMSO a 80 mg/ml para los ensayos con células.

Análisis de carbohidratos en los extractos

Considerando la abundancia de carbohidratos en las plantas, a los extractos obtenidos se les cuantificó azúcares reductores por el método DNS y se obtuvo un perfil por cromatografía en capa fina (TLC) de los monosacáridos, oligosacáridos y fructooligosacáridos presentes en la bebida.

Identificación de carbohidratos por cromatografía en capa fina

La caracterización del perfil de carbohidratos de los extractos hidrolizados se analizó por cromatografía en capa fina empleando difenilamina y anilina, estos reactivos permiten distinguir entre cetosas (rojo) y aldosas (azul) por el color desarrollado.

Se utilizó el protocolo propuesto por Praznik et al. (2007) utilizando placas Del Merck No 60 HPTLC. Se aplicaron 0.5 µl de muestras en las placas por línea con una jeringa HAMILTON 7000. La fase móvil fue: A: 1-butanol: ácido acético: éter dietílico: agua de acuerdo a Holme (1998). Como estándar se utilizó glucosa, fructosa, sacarosa a 1.5 mg/ml (p/v).

Para visualizar los carbohidratos, se utilizó una solución reveladora de acuerdo a Reiffová y Nemcová (2006) que consiste en anilina, difenilamina, y ácido fosfórico diluidas en acetona. La placa se atomizó con la solución reveladora y después se calentó a 120°C hasta la aparición de las bandas monitoreando hasta la intensidad deseada, por último la placa se documentó para su análisis.

Cuantificación de azúcares reductores

Se preparó el reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en frasco color ámbar, disolviendo 75 g de Tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua destilada, agregando después 50 ml de hidróxido de sodio 2 M y 75 ml de agua destilada caliente, se adicionó 0.25 g de DNS, una vez disuelto se aforó a 250 ml. El reactivo se conservó a 4 °C hasta su uso. La curva de calibración se realizó con una solución de glucosa a una concentración de 1 a 10 mg/ml (0.1, 1, 2, 5, 7 y 10 respectivamente).

Se tomaron 100 µl de cada dilución y se hicieron reaccionar con 1 ml de reactivo DNS en tubos con rosca incubando en baño María a 100 °C durante diez minutos. Permanecieron diez minutos a temperatura ambiente y se colocaron 200 µl en microplaca (por triplicado), la lectura se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Determinación de fitoquímicos

Una vez obtenidos los extractos y soluciones madre (EH, precipitados con acetona, chilcuague y parota) se cuantificó el perfil fitoquímico y las mediciones se desarrollaron en espectrofotómetro para microplacas marca UV Multiskan™ GO (Thermo Scientific®). En cada curva de calibración fue empleado un estándar comercial puro y se prepararon las respectivas soluciones para obtener una curva de regresión lineal igual o mayor a 0.98 para cada método.

Estimación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó con el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo a la metodología descrita por Singleton y Rossi (1965) con modificaciones hechas por Ahumada-Santos et al. (2013). En cada tubo se colocaron 0.1 ml de las muestras a evaluar o soluciones diluidas del estándar (para obtener la curva de calibración utilizar diluciones de ácido gálico a 100, 200, 300, 400 y 500 µg/ml diluidas en etanol) con 0.79 ml de agua destilada, y 0.05 ml del reactivo de Folin Ciocalteu al 2 N. Los componentes de la reacción se mezclaron durante dos minutos a 40 °C protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 0.15 ml de NaCO₃ saturado al 15 % diluido previamente en agua (p/v). Los tubos se homogenizaron vigorosamente en agitador vortex y la mezcla permaneció en reposo durante 30 minutos a 40 °C. Doscientos microlitros de cada muestra por triplicado se leyeron a una absorbancia de 765 nm empleando agua como blanco. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (mEAG) por cada 100 ml de jugo.

Estimación de saponinas

La concentración de saponinas en los extractos se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Hiai et al. (1976). En este método, la vainillina y ácido sulfúrico reaccionan con sapogeninas esteroidales, saponinas, esteroides y durante la reacción generada las unidades de azúcar no afectan dicha medición. Se preparó una solución de vainillina al 8 % disuelta en etanol al 99.5 % (v/v). (preparar cada vez que se realice la determinación: 800 mg/10ml). Se prepararon 100 ml de Ácido sulfúrico al 72 % diluido en agua destilada (28 ml agua destilada estéril y 72 ml de ácido sulfúrico concentrado). Para preparar la mezcla, en tubos de ensayo se colocaron 0.5 mL de agua como blanco o solución de los extractos diluidos con etanol, 0.5 ml de solución de vainillina y cuidadosamente 5.0 ml de ácido sulfúrico, fueron agregados y mezclados en baño de agua fría a 4°C. Después la mezcla fue calentada en baño María a 60 °C durante 10 minutos, enseguida se dejó en baño de agua fría a temperatura ambiente. El blanco utilizado (agua ó etanol) reacciona y se observa un color amarillo intenso. Se realizó un espectro de absorción de 450 a 700 nm. Para determinar la mayor presencia de saponinas se graficaron los valores en el espectro de absorción antes mencionado y la muestra que presentaba mayor área bajo la curva confirmando por la intensidad de coloración desarrollada en la microplaca se determinó cuál era el extracto con mayor concentración de estos compuestos.

Cuantificación de sapogeninas esteroidales

La cuantificación de sapogeninas se desarrolló de acuerdo al protocolo propuesto por Baccou et al. (1977), con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se colocaron diferentes diluciones de diosgenina de 0-40 µg (sapogenina esteroideal) diluidas previamente por separado en 2 ml de acetato de etilo. Después se agregó 1 ml del reactivo A (consiste en 0.5 ml de anisaldehído y 99.5 ml de acetato de etilo) y 1 ml del reactivo C (consiste en 50 ml de ácido sulfúrico y 50 ml de acetato de etilo) y se agitaron cuidadosamente. Después se colocaron los tubos en baño María a 60 °C durante 10 minutos, posteriormente se dejó enfriar en baño de agua hasta llegar a temperatura ambiente y la medición se realizó por triplicado a 430 nm. Metodología opcional: es posible esta determinación sin la incubación de los tubos, el reactivo B (ácido sulfúrico concentrado) se puede utilizar después de colocar el reactivo C. Los resultados se expresan en mg equivalentes de diosgenina por cada 100 ml de jugo.

Evaluación de la actividad antioxidante

Múltiples ensayos son utilizados para medir el potencial antioxidante de bebidas, extractos de alimentos (frutas y hortalizas) y compuestos puros, los radicales reaccionan por mecanismos diferentes con cada muestra. Generalmente las bebidas o alimentos que se consumen son sometidas a evaluaciones para identificar su capacidad antioxidante, los métodos ABTS y DPPH son utilizados ampliamente para el análisis de alimentos funcionales principalmente asociados con un alto contenido de polifenoles. Estas dos metodologías están basados en la transferencia de electrones que puede ser observada visualmente por la decoloración de un oxidante (Floegel et al., 2011).

Una solución estándar de análogo sintético fue utilizada como control, trolox (0-800 μM) que fue diluido en etanol al 80 % y la curva de calibración se grafica en función de la dosis-respuesta en la inhibición del radical.

Método DPPH

El ensayo se desarrolló de acuerdo al método reportado por Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones hechas por Ahumada-Santos et al. (2013). En un tubo se colocaron 0.1 ml de las muestras, trolox o metanol al 80 % como blanco y fueron mezclados con 0.9 ml de DPPH preparado previamente en etanol a una concentración de 150 μM . La mezcla permaneció en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente de laboratorio ($\sim 25^\circ\text{C}$) durante 20 minutos, enseguida se midió la absorbancia a 515 nm.

4.3 Evaluación biológica

Líneas celulares

En el panel evaluado se utilizaron tres líneas celulares humanas y una línea murina; HeLa (carcinoma del cuello uterino humano), A-549 (adenocarcinoma alveolar humano), como línea control ARPE-19 (Epitelio pigmentado de la retina humana) y RAW264.7 (macrófagos murinos transformados por el virus Leucemia de Abelson). Las líneas fueron obtenidas de ATCC[®] (American Type Culture Collection). En los ensayos antiproliferativos de los extractos se utilizaron las cuatro líneas y para la actividad antiinflamatoria se utilizó la línea murina.

Preparación de medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las alícuotas proporcionadas en el laboratorio (viales en ultracongelación) de las diferentes células que permanecían a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mismas que estaban en contacto con DMSO y suero fetal bovino (proporción 1:4 v/v) fueron descongeladas rápidamente para mantener la viabilidad celular y posteriormente sembradas en matraces de cultivo celular de 25 cm^2 de superficie.

Las condiciones de crecimiento de los cultivos y placas de los ensayos incluían una atmósfera al 5% de CO_2 que permanecieron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una incubadora isotherm (Fischer Scientific) durante el desarrollo de todos los ensayos. Todos los materiales empleados durante los ensayos eran nuevos y/o estériles, según era el caso.

Las líneas celulares se cultivaron y mantuvieron en medio DMEM rico en glucosa que incluye asparagina, arginina HCl, bicarbonato de sodio (NaHCO_3), estos reactivos fueron diluidos en agua destilada y se ajustó el pH a 7.3, posteriormente el medio fue esterilizado con la ayuda de una bomba de vacío utilizando un sistema de filtración con membrana estéril en campana de bioseguridad, después el medio fue suplementado cuidadosamente con 1 % de piruvato de sodio (solución 100 mM), L-glutamina (0.75 % v/v) y como antibiótico se utilizó 1 % de penicilina-estreptomina. Dependiendo de las líneas celulares el medio fue suplemento con suero fetal bovino Gibco Life Technologies a 0, 5 y 10 % (D0F para los ensayos MTT, D5F para el cultivo de células humanas, D10F para RAW264.7 durante ensayos antiinflamatorios).

Preparación del reactivo MTT

La solución de MTT (Sigma Aldrich) fue suspendida en una solución de PBS 1X la cual fue esterilizada por filtración con membrana de poro con una apertura de $0.22\text{ }\mu\text{m}$, y la solución se preparó a una concentración de 5 mg/ml bajo condiciones de esterilidad con mínima exposición a la luz. Las alícuotas obtenidas fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz y descongeladas hasta su uso en los ensayos.

Conteo celular con azul de tripano

El conteo de las células viables se realizó en una cámara de Neubauer empleando colorante azul de tripano. Una vez obtenida una confluencia celular mayor al 80 % las células fueron despegadas con una solución de tripsina-EDTA (solución 0.25 %) y con la ayuda de un microscopio invertido se determinó si las células adherentes se despegaban evaluando el menor tiempo posible el contacto celular con las proteasas. El sobrenadante fue recuperado en un tubo falcon estéril y se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se deshecho y el paquete

celular obtenidos se suspendió cuidadosamente en 10 ml de medio fresco hasta que la suspensión fuera completamente homogénea. En un vial se colocaron 0.5 ml de la suspensión para el conteo celular, y la metodología consiste en tomar 20 μL de la suspensión y 20 μL del colorante (previamente preparado con 200 μL de Trypan Blue Solution 0.4 % Sigma y 800 μL de PBS 1X). Por método de exclusión de las células no viables se contaron las células en los cuadrantes de la cámara y mediante cálculos la densidad celular celular se ajustó a 1×10^4 células.

Ensayo de viabilidad celular

La actividad antiproliferativa de los diferentes extractos evaluados fue determinada por la medición de la viabilidad celular utilizando el ensayo MTT en microplacas de cultivo celular de 96 pozos. Este es un ensayo colorimétrico que emplea sal de tetrazolio y es utilizado ampliamente para la medición de citotoxicidad, viabilidad celular y estudios de proliferación en biología celular. El MTT en solución presenta una coloración amarilla y en contacto con células viables por acción de deshidrogenasas mitocondriales y agentes reductores generan un producto llamado formazan con coloración azul violeta y que es insoluble en agua (Stockert et al., 2012).

Durante los ensayos se utilizó la metodología propuesta por Rascón-Valenzuela et al. (2015). Cuando las células adherentes alcanzaron una confluencia de crecimiento aproximada del 80 %, se utilizó tripsina-EDTA (a 0.25 % v/v) para despegarlas de la base de los matraces de cultivo celular. Con la pipeta multicanal se tomaron 50 μL de las células (previamente ajustada su densidad por el conteo celular con azul de tripano a 1×10^4 en los 50 μL) y se sembraron por triplicado para cada extracto.

Después de haber permanecido durante 24 hr en incubación (a 37 °C y 5 % CO_2) para que las células se adhieran al fondo de los pozos, las células fueron estimuladas con 50 μL de los extractos a diferentes concentraciones reales en los pozos (50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, previamente diluidos con DMSO a una concentración de 80 mg/ml de muestras previamente liofilizadas) y fueron incubadas durante 48 hrs bajo las mismas condiciones.

De acuerdo al autor de la metodología seguida, en ensayos previos se observó que el DMSO al 2 % (v/v) es la máxima concentración permitida sin afectar la viabilidad celular. A las 24 horas y 43 horas de haber sido estimuladas, se obtuvieron microfotografías en microscopio invertido a diferentes ampliaciones. Al cabo de las 44 horas transcurridas de estimulación a las células se les retiró cuidadosamente el medio para no despegar las células y los pozos con las células fueron lavadas con 200 μL de PBS estéril 1X y nuevamente se retiró la solución con extremo cuidado. Cien

microlitros de medio fresco (D0F) y 10 μ L de la solución MTT (5 mg/ml) fueron agregados a cada pozo durante las últimas cuatro horas de incubación. Los cristales de formazan generados por las células que permanecían metabólicamente activas fueron disueltos con 100 μ L de isopropanol previamente acidificado (100 ml de alcohol isopropílico + 0.337 ml de ácido clorhídrico concentrado) con la ayuda de una pipeta multicanal.

El fondo exterior de las placas se limpió con algodón y alcohol al 70 %, y las absorbancias fueron medidas en lector ELISA de microplacas (Marca BioRad) a dos longitudes de onda, 570 y 630 nm. Los ensayos se realizaron tres veces para cada línea y extracto evaluado.

La viabilidad celular fue calculada respecto con las células control (células sin estímulo, sólo con medio DMEM que contenía DMSO 2 % v/v). Los extractos que presentaron actividad antiproliferativa se les determinó el IC₅₀ por regresión lineal.

Evaluación de actividad anti-inflamatoria

La cuantificación de óxido nítrico y viabilidad celular de las células fue determinado por medio del reactivo de Griess y por el ensayo MTT respectivamente. Las células RAW264.7 se trataron de la misma manera que las líneas humanas, se descongelaron, incubaron, crecieron y despegaron de las cajas con la misma metodología previamente descrita.

Durante el ensayo se siguió la metodología descrita por Paulino et al., (2008) con ligeras modificaciones. Las condiciones de crecimiento fueron en medio D10F a 37 °C y con una atmósfera de CO₂ al 5 %, de igual manera el conteo celular con azul de tripano fue como en los ensayos MTT por la metodología descrita previamente. En las placas se colocaron 100 μ L de las células con un aproximado de 50,000 células por pozo (es crucial sembrar relativamente la misma cantidad de células por pozo), permanecieron durante 24 hr en incubación, y a las células confluentes después se les agregaron 98 μ L de medio fresco D10F y fueron estimuladas con 2 μ L del lipopolisacárido (LPS) obtenido de *E. coli* (preparado previamente en DMEM) durante 24 horas para inducir la inflamación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 100 μ L del medio de cada pozo (Placa 1) y se transfirieron a una placa nueva (Placa 2: paso para cuantificar el óxido nítrico generado con el reactivo de Griess). En condiciones de oscuridad y empleando en todo momento puntas nuevas, se agregaron cuidadosamente 100 μ L del reactivo de Griess a cada pozo, la placa permaneció durante 10 minutos reaccionando protegido de la luz, posteriormente la placa se leyó en lector de

ELISA a 540 nm. Como controles se utilizaron 6 pozos para células con LPS y otras seis sin LPS, y tres pozos sin extracto, y con DMSO sin LPS.

Los extractos de agaves fueron evaluados en 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con el antecedente de que el extracto de chilcuague fue citotóxico a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la evaluación antiinflamatoria las concentraciones evaluadas para este último extracto fueron menores, quedando a 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

A la placa 1 se le realizó ensayo MTT, cuidadosamente fue retirado el medio y se prosiguió a lavar con PBS 1X (mismo procedimiento para la evaluación de actividad antiproliferativa, ver metodología anterior). Este ensayo de viabilidad celular se realiza para observar que el DMSO o extracto no están afectando a las células.

Previamente se preparó una curva de calibración con el reactivo de Griess y óxido nítrico como estándar, la curva fue generada con diferentes concentraciones de óxido nítrico (0.0005, 0.028, 0.097, 0.22, 0.48 y 0.92 μM) y los datos obtenidos en este ensayo se compararon con la curva de calibración. Los resultados se expresan en términos de porcentaje de actividad antiinflamatorios de los extractos sobre las células estimuladas por el LPS.

La producción de óxido nítrico (μM) por las células RAW264.7 fue determinada con base a la curva patrón. La diferencia de las células tratadas con LPS y la respuesta antiinflamatoria de los extractos evaluados sobre las células fue expresada en términos de porcentajes.

4.4 Análisis de datos

Cada cuantificación de fitoquímicos se reporta con su correspondiente desviación estándar, los ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra. En los ensayos biológicos fueron realizados por triplicado para cada extracto y línea celular, se representa el IC_{50} de los extractos.

V. Resultados y discusión

En el presente estudio se reporta la evaluación de extractos de hojas de agaves (de seis especies con edades entre 5 y 12 años), obtenidas de dos municipios de Jalisco (Mascota y Tlajomulco de Zúñiga), especies que son destinados principalmente para producir bebidas alcohólicas tradicionales como la raicilla y para la producción de cuerdas de ixtle en el caso de las colectadas en San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco.

Durante la evaluación se incorporaron dos plantas más, la primera fue una raíz endémica conocida como chilcuague (*Heliopsis longipes*) colectada en Xichú Guanajuato, y que recientemente ha llamado la atención por su composición química y su amplio campo de aplicación.

Una segunda muestra fue del fruto llamado parota (*Enterolobium cyclocarpum*) colectando en dos sitios Colima Colima y Uruapan Michoacán, este fruto ha sido utilizado como pienso para ganado y en usos tradicionales en la medicina antigua, el principal uso que se le da a la planta es por la preciada madera del árbol siendo ampliamente valorada y utilizada por su importancia comercial.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar extractos crudos de agaves en búsqueda de actividad antiproliferativa sobre células cancerosas, relacionando dicho objetivo por una práctica cultural que se realiza específicamente por parte de los pobladores de Mascota Jalisco.

En esta región del Estado se produce una bebida alcohólica llamada raicilla obtenida a partir de diferentes especies de agaves por ejemplo: *Agave inaequidens*, *A. maximiliana*, *A. angustifolia* y *A. rhodacantha*, y en época de cosecha después de jimar las piñas, las hojas de estos agaves son aprovechadas, pasan a ser colectadas y transportadas a los sitios de trabajo donde son "tatemadas" por calor (hidrólisis) inmediatamente después que se han sacado las piñas de los hornos artesanales de mampostería. De las hojas obtienen jugo hidrolizado por un proceso de prensado, esta practica la realizan con la finalidad de extraer un jugo de agave de las pencas para embotellarlo, congelarlo, y posteriormente comercializarlo durante diversas etapas del año, siendo su principal mercado para personas que buscan productos alternos para consumir.

En una acercamiento con un productor de raicilla, hacía hincapié de diversos testimonios de personas que afirman que por el consumo de esta bebida se atenúan algunos problemas de salud relacionados con el grave problema de cáncer, y el uso tradicional que normalmente se le da a esta bebida en la región es como un remedio para atenuar ciertos malestares.

Con base en la basta literatura consultada disponible dentro del género agave se propone una hipótesis que está asociada con una liberación de componentes químicos almacenados en las hojas de los agaves hacia el jugo hidrolizado los cuales probablemente son los responsable de presentar

actividades biológicas que se ven reflejadas y relacionadas con un efecto positivo en la salud de los consumidores.

Esta práctica cultural en la importante zona productora de raicilla nos llevó a plantear los objetivos específicos de la investigación que incluyen conocer la composición fitoquímica, antioxidante y determinar mediante cromatografía en capa fina los carbohidratos en la bebida. En conjunto, se decidió realizar una comparación de diversas plantas originarias en la región de Mascota e incorporar plantas colectadas en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, sometiendo a los mismos procesos y determinaciones para conocer la variabilidad entre zonas de producción y especies. Cabe resaltar que todas las plantas evaluadas fueron muestreadas en una etapa de vida adulta y la mayoría crecieron en un medio ambiente silvestre, contemplando que en esta etapa las plantas son propicias a ser jimadas debido a que ya alcanzaron la mayor acumulación de azúcares en la piña para su jima y las hojas ya no representan un tejido relativo de importancia.

Respecto a los ensayos biológicos desarrollados se siguió la metodología descrita en el documento (ver apartado IV) para demostrar si el uso tradicional que se le da a esta bebida es verídico y comprobable por el método científico, es importante resaltar que en el panel celular se incorporaron cuatro líneas celulares las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de los extractos.

Con los resultados obtenidos de estos experimentos se genera información como un antecedente llevando la evaluación del producto (jugo hidrolizado) a una escala de laboratorio acerca de esta práctica, y así establecer bases para el estudio de esta bebida que es producida y consumida en esta región, respecto a los extractos de chilcuague y parota servirán para futuras investigaciones de acuerdo con la composición y actividad reportada.

Durante la búsqueda de antecedentes dentro de la basta literatura disponible de los agaves, no existen documentos o análisis que reporten información relacionada al tema en la evaluación de productos obtenidos de agaves por tratamientos térmicos tan "agresivos", los cuales pudieran ser comparables con nuestro resultados. Tomando en cuenta que en esta investigación difiere de las prácticas metodológicas que normalmente se realizan durante el tratamiento para la obtención de los extractos de los productos naturales (en especial dentro del género agave), sin embargo este reporte es el inicio para descubrir si detrás de esta práctica cultural y la creencia que es un auxiliar durante su consumo por personas que son tratadas por radioterapia para combatir el cáncer (ateuar ciertos malestares), o para quienes presentan problemas inflamatorios musculares.

Por otra parte, en los resultados también se obtuvo un panorama general intra e inter específico de las hojas de agave al darle seguimiento a un grupo de compuestos ampliamente estudiado dentro del género como lo son los metabolitos secundarios, estos datos son reportados como equivalentes sintéticos de compuestos puros que están presentes en diferentes concentraciones en los jugos hidrolizados. Estos datos aportan información acerca del comportamiento de los metabolitos secundarios en una etapa fisiológica adulta en los agaves, y determinan su abundancia en el jugo después de haber sido sometidos a un proceso de hidrólisis por cocción. Durante la caracterización fitoquímica de los extractos, también se decidió estudiar la composición de los carbohidratos mediante cromatografía en capa fina (TLC), y su respectiva cuantificación de los azúcares reductores disponibles en la bebida, este dato provee un valor aproximado de la concentración y tipo de carbohidratos (respecto al grado de polimerización) presentes en las muestras.

Obtención y rendimiento de los extractos hidrolizados

En la tabla 1 se agrupan los sitios de colectas en los dos municipios y los rendimientos de jugo que es posible obtener después de haber sido hidrolizados. Durante el análisis se incorporaron seis especies de agave que se colectaron en cinco sitios de dos municipios de Jalisco (un total de 16 plantas y un producto donado), en total se analizaron 17 extractos hidrolizados (EH) obtenidos de agaves.

La distribución es de la siguiente manera. Siete muestras pertenecen a Tlajomulco de Zúñiga (de las cuales tres fueron de San Miguel Cuyutlán, dos fueron obtenidas del cerro conocido como "Cerro viejo", uno obtenido del ITTJ, y el último de una plantación común). Las otras nueve muestras fueron obtenidas en su estado silvestre en el municipio de Mascota (estas últimas, plantas silvestres a las que se les cortó la inflorescencia mismas que son destinadas para elaboración de raicilla).

En la tabla 1 también se agrupan los datos generales tomados de las muestras sometidas al análisis, se observa el número progresivo asignado, el sitio de colecta (ver punto 4.1 para coordenadas exactas), la especie y una edad aproximada de la planta dato que fue obtenido por los productores de cada región. Se reporta un promedio de la longitud y peso de las hojas colectadas (un mínimo de 3), y por último la cantidad del EH que se obtuvo después de someter a hidrólisis las pencas (valor expresado en L) y el rendimiento en porcentaje (valor obtenido dividiendo el peso de la hoja y el volumen de líquido obtenido). El criterio para homogenizar la colecta de las pencas de agaves, fue considerando que todas las hojas fueran obtenidas de la parte central de la roseta de cada planta visitada.

En la tabla 1 se obtiene el rendimiento de los jugos hidrolizados. El contenido de agua en las hojas varía entre un 25.6 % a 78.2 %, las especies que presentaron el menor y mayor porcentaje fueron *Agave americana* y *A. maximiliana*, respectivamente. El rendimiento que se puede obtener de jugo hidrolizado es variante entre especies, el volumen mínimo de 0.28 L para muestra 16 correspondiente para *A. rhodacantha* y el máximo es de 2.05 L para la Muestra 16 que pertenece para *A. salmiana*. Debido a una gran cantidad de fibra específicamente en *A. tequilana*, fue a la única muestra que se se le agregó agua destilada para poder obtener muestra de jugo.

Los valores más bajos en cuanto a rendimiento de jugo corresponden a la muestra 1 y 15 probablemente por la edad de la planta, ambas con 12 años. Caso contrario con la muestra 12, que fue la que presentó el mayor porcentaje de jugo, llegando hasta 56.6 %. En general, se observa una disminución de peso en plantas con mayor edad, esto influencia los rendimiento en la obtención de jugo potencialmente comercializado aunado a que llevan un proceso térmico al que son sometidas.

Existe variación intra e inter especies, debido a la edad fisiológica, a que las condiciones de clima varían entre las regiones por el contenido de agua en los tejidos (temporada de lluvia o sequía) cantidad de fibras, demandas energéticas, o nutrición de la planta.

Tabla 1. Clasificación y características de los agaves colectados.

Muestra (M)	Sitio de Colecta	Especie de Agave	Edad (años)	Hoja*		Rendimiento EH	
				Longitud (cm)	Peso (kg)	L	%
1	S.M.C.	<i>salmiana</i>	12	93	1.460	0.39	26.0
2	S.M.C.	<i>salmiana</i>	10	85	0.80	0.38	47.5
3	S.M.C	<i>salmiana</i>	10	108	1.57	0.51	32.8
4	CVT	<i>salmiana</i>	12	118	1.61	0.51	31.0
5	CVT	<i>maximiliana</i>	10	122	2.30	1.80	78.2
6	ITT	<i>americana</i>	6	117	1.95	0.50	25.6
7	HEU	<i>tequilana</i>	5	106	0.38	0.12	31.5
8	MCT	<i>salmiana</i>	10	155	3.14	2.05	65.2
9	MCT	<i>inaequidens</i>	10	122	1.37	0.49	35.7
10	MCT	<i>inaequidens</i>	10	96	0.98	0.50	51.5
11	MCT	<i>maximiliana</i>	10	90	0.83	0.25	30.1
12	MCT	<i>maximiliana</i>	8	108	1.06	0.61	56.6
13	MCT	<i>inaequidens</i>	10	105	1.26	0.60	48.0
14	MCT	<i>Rhodacantha??</i>	13	135	1.42	0.50	35.2
15	MCT	<i>inaequidens</i>	12	122	1.99	0.59	29.6
16	MCT	<i>rhodacantha</i>	10	85	0.78	0.28	35.8
17**	MCT	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	1.00	-

Las colectas fueron realizadas en dos municipios de Jalisco. Abreviaturas: SMC= San Miguel Cuyutlán, ITT= Instituto Tecnológico de Tlajomulco, HEU= Hacienda Eucaliptos, MCT= Mascota, E.H.= Extracto hidrolizado, y N.I.= sin información. Durante la colecta de las hojas, la planta M4 fue la única que presentaba inflorescencia.

Debido que la muestra M7 no liberó jugo, se le agregó agua destilada para obtener el EH, misma relación peso/volumen.

*Los valores reportados de longitud y peso son promedios de tres a seis pencas colectas.

**M17: Muestra que corresponde a la donación por un productor de raicilla que obtuvo artesanalmente en hornos de mampostería y forma parte de un lote de bebidas que comercializa.

Resultados de la investigación

En la tabla 2 se reportan los valores de fitoquímicos y azúcares reductores cuantificados por métodos de espectrofotometría de cada grupo de metabolitos secundarios (MS) de interés para esta investigación. En este proyecto la metodología para la obtención de los extractos evaluados difiere con las prácticas tradicionales de maceración o por reflujo con solventes para su obtención, los resultados obtenidos se comparan con reportes de especies de agaves que en su mayoría conservan los sistemas normales de extracción, e inclusive con datos de plantas en etapas jóvenes.

En este trabajo se observó una variabilidad intra e inter específica de los diversos extractos sometidos al análisis fitoquímico (ver tabla 2), y los resultados de cuantificación arrojan diferentes concentraciones de compuestos para los extractos hidrolizados (EH).

Respecto al perfil de carbohidratos las bebidas fueron analizadas por TLC (ver figura 2 A) y una respectiva cuantificación de azúcares reductores por el método colorimétrico DNS (tabla 2). Mediante el perfil desarrollado en el TLC, en general se identifican carbohidratos simples como glucosa (g), fructosa (f) y sacarosa (s), en menor medida se observa la presencia de oligosacáridos de diferente grado de polimerización (GP: 3, 4 y 5). Se puede observar homología en el tipo de carbohidratos en las especies de los dos municipios. En la muestra 17 (hidrolizado donado por un productor de raicilla y comerciante de la bebida), se observa un mayor incremento de carbohidratos en la bebida (específicamente f y s), mientras que la M8, M9 y M10 presentan una disminución de los carbohidratos. La M7 presenta menor cantidad de g y f (*Agave tequilana*) con un ligero incremento de carbohidratos con un GP mayor.

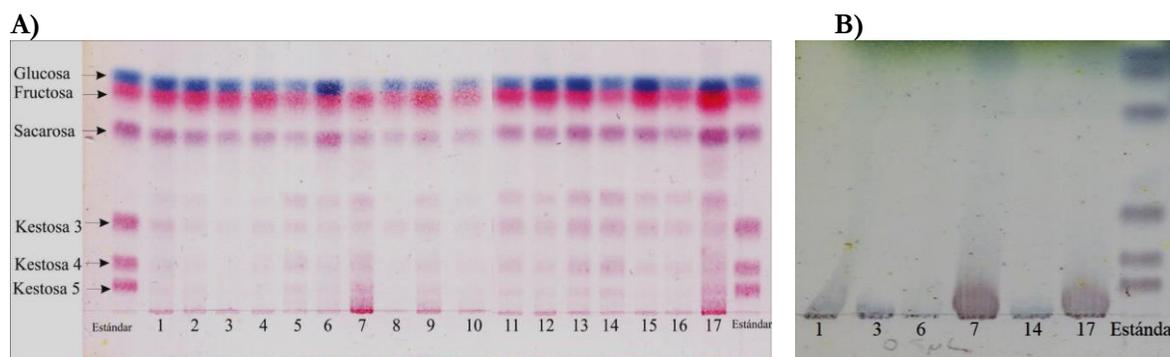


Figura 2. Perfil de monosacáridos y oligosacáridos por TLC presentes en los extractos hidrolizados. **A)** Extractos hidrolizados crudos. **B)** Extractos que fueron precipitados con un exceso de acetona. Los números (1-17) representan los EH (para mayores detalles de las especies ver tabla 1). Los estándares incluyen Glucosa (g), Fructosa (f), Sacarosa (s), y Kestosas de diferente grado de polimerización (GP3, GP4 y GP5).

Los carbohidratos en los EH se analizaron simultáneamente mediante una cuantificación de azúcares reductores y con respecto al perfil identificado por TLC. La mayor cantidad de azúcares reductores es para M17 (muestra del jugo donado), seguido de M6 (*A. americana*), M15 (*A. inaequidens*), M12 (*A. maximiliana*) con 3.22, 2.02, 2.01 y 1.72 g/100 ml de jugo equivalentes a glucosa. Mientras que los extractos que presentaron las más bajas concentraciones son M5 (*A. maximiliana*), M3 (*A. salmiana*), M14 (*A. rhodacantha*) con 0.52, 0.78, 0.94 g/100ml de jugo respectivamente.

En el TLC desarrollado se identifican los principales carbohidratos presentes en la bebida (ver figura 2, inciso A). Se determinó que el hidrolizado es rico en azúcares (monosacáridos como glucosa y fructosa, y disacáridos como sacarosa) y por la facilidad de fermentar se recomienda conservarlo en congelación para prolongar su disposición de consumo. En la figura 2 B, se anexa el TLC de los extractos de agaves que fueron precipitados por un exceso de acetona y se observa una ligera presencia de carbohidratos después de haber sido precipitados.

Continuando con el análisis de los resultados obtenidos del perfil fitoquímico, en la tabla 2 se reportan las concentraciones para cada metabolito cuantificado presente en 100 ml de bebida. Los EH de pencas de agaves mostraron valores diferentes en las cuantificaciones del perfil.

En términos generales con respecto a la presencia de fenoles, en los tejidos foliares de los agaves se observaron diferencias muy marcadas. Por el método de Folin Ciocalteu se determinaron los fenoles totales (FT), y los valores que se reportan son equivalentes a ácido gálico (AG) esto mediante la preparación previa de una curva de calibración con concentraciones conocidas del análogo sintético. Los valores entre las dos regiones oscilaron entre 291 y 84.3 mg/100 ml de jugo valores para M6 (*A. americana*) y para M5 (*A. maximiliana*) respectivamente.

Las plantas obtenidas de Mascota (*A. inaequidens*, *A. maximiliana*, *A. rhodacantha* y *A. salmiana* con edades entre 8 y 13 años) mostraron una mayor similitud respecto a la concentración de fenoles con valores entre 110 y 187 mg/100 ml, y dentro de estas la muestra 14 presentó la mayor concentración con 187 mg/100 ml que corresponde a *A. rhodacantha*. Con respecto a las plantas de Tlajomulco las concentraciones presentaron mayor variabilidad, es decir, desde 84 hasta 291 mg/100 ml de jugo hidrolizado, siendo el *A. maximiliana* el de menor *A. americana* el de mayor concentración.

El orden descendiente de los extracto que presentan un mayor índice para fenoles es para: M6, M7, M14, M1 y M17 con 291, 194, 187, 175 y 150 mg/100 ml, siendo el *A. americana* el que presentó

mayor cantidad, mientras que la muestra 2 y 5 las más bajas con 84.3 y 86 mg/100 ml las cuales se pueden confirmar por un menor color desarrollado en las placas de TLC (ver figura 3B).

También se determinó la presencia de saponinas y sapogeninas por pruebas colorimétricas. Para determinar la mayor presencia de saponinas y seleccionar las muestra de agave con mayor concentración se eligieron mediante una lectura en espectrofotométrico de acuerdo al protocolo reportado por Hiai et al. (1976). La muestra 1, 7, 9 y 17 que corresponden para *A. salmiana*, *A. tequilana*, *A. inaequidens* y la muestra donada por el productor de raicilla. En la figura 3E se puede detectar un incremento en coloración con estas muestras. Respecto a las sapogeninas esteroidales, los valores detectados que se comparan con el análogo sintético diosgenina se encuentran entre 0.07 y 4.37 mg ED/100 ml de jugo. Las muestras que presentaron una mayor cantidad es de 4.37, 3.16, 2.23 y 1.93 para la muestra 1, 4, 14 y 17 mientras que las muestras más bajas son de 0.07, 0.10, 0.14 para las muestras 2, 15 y 16. Respecto a los agaves de Mascota, presentaron concentraciones bajas, a excepción de la muestra 14 y 17, esta última corresponde a la muestra donada para este estudio. En cambio, las plantas de Tlajomulco presentaron concentraciones superiores. En la figura 3 se pueden observar fotografías tomadas a las microplacas que son representativas de los ensayos colorimétricos desarrollados en este estudio, los incisos A-E corresponde a los extractos crudos hidrolizados de agaves, y los incisos F y G son la cuantificación de las muestras precipitadas.

Tabla 2. Cuantificación del perfil fitoquímico y azúcares reductores de jugos hidrolizados de agave.

Muestra	Fenoles totales mgEAG/100 ml	Sapogeninas mgED/100 ml	Azúcares reductores gEG/ 100 ml	Saponinas
1	175±2.42 h	4.37±0.02 k	0.97±0.05 ef	++
2	86.0±0.76 a	0.07±0.01 a	1.00±0.02 f	+
3	117±0.22 c	1.16±0.02 f	0.78±0.03 c	+
4	119±0.16 cd	3.16±0.02 j	1.27±0.05 h	+
5	84.3±0.40 a	0.14±0.005 b	0.52±0.02 a	+
6	291±1.68 k	1.21±0.02 g	2.02±0.07 k	+
7	194±2.01 j	0.55±0.01e	0.85±0.05 cd	+++
8	142±0.21 f	0.15±0.003 bc	0.65±0.02 b	+
9	148±0.49 fg	0.31±0.02 d	1.60±0.05 i	++
10	135±0.39 e	0.29±0.01d	1.14±0.02 g	+
11	116±0.19 bc	0.30±0.02 d	1.31±0.04 h	+
12	132±0.33 e	0.19±0.01c	1.72±0.04 j	+
13	146±0.67 fg	0.16±0.01 bc	1.71±0.01 j	+
14	187±0.61 i	1.93±0.04 h	0.94±0.02 ef	+
15	124±0.83 d	0.10±0.008 a	2.01±0.04 k	+
16	110±0.41 b	0.14±0.005 bc	0.92±0.02 de	+
17	150±5.77 g	2.23±0.06 i	3.22±0.07 l	+++

Las nomenclatura 1 al 17 corresponden a muestras de los jugos hidrolizados de pencas de agave, para mayores detalles ver Tabla 1. La cuantificación de fitoquímicos se expresa en valores por cada 100 ml de jugo en los extractos hidrolizados. Abreviaturas donde EAG (equivalentes ácido gálico), ED (equivalentes diosgenina) y EG (equivalentes glucosa). La presencia de saponinas se determinó por un perfil cualitativo en presencia. (+) Poca. (++) Mediana. (+++) Bastante. Los datos son la media de tres mediciones y se expresan con su respectiva desviación estándar.

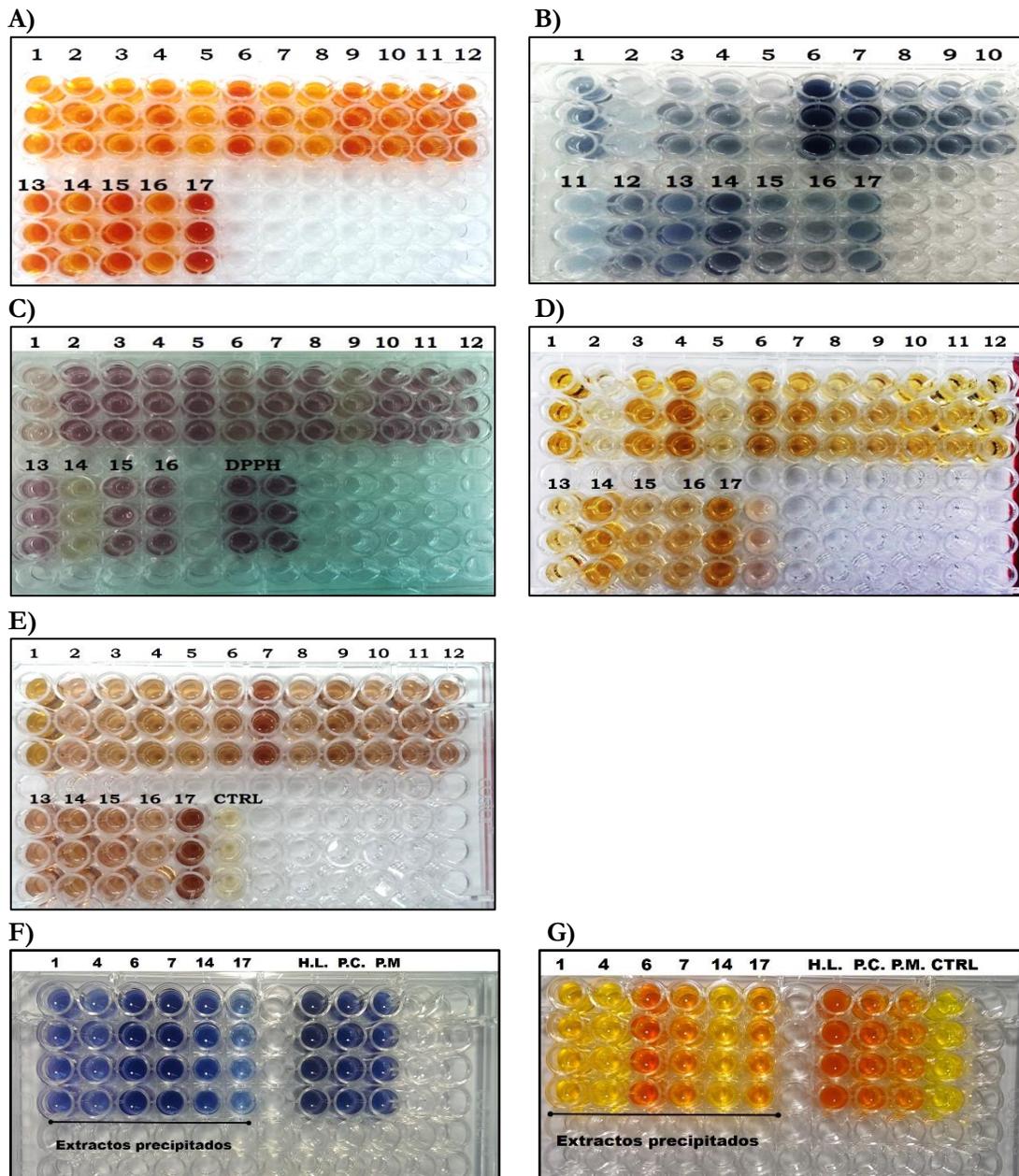


Figura 3. Fotografías de las cuantificaciones colorimétricas en microplacas UV con los diferentes análisis de los extractos hidrolizados de agaves, chilcuague y parota. **A y G)** Azúcares reductores por DNS. **B y F)** Polifenoles totales por Folin-Ciocalteu. **C)** Actividad antioxidante por DPPH. **D)** Sapogeninas esteroidales. **E)** Saponinas Totales. Los número que se incluyen en cada imagen corresponden a los extractos hidrolizados de agaves, para un mayor detalle revisar la tabla 1. El análisis de cada extracto fue realizado por triplicado. Abreviaturas: H.L. *Heliopsis longipes*, P.C. Parota Colima, y P.M. Parota Michoacán. En las figuras A, B, D, E, F y G a un mayor cambio en intensidad del color, representa una mayor concentración para el extracto evaluado, en cambio en la figura C, a menor decoloración del radical DPPH indica mayor actividad antioxidante de la muestra.

La figura 4 representa el perfil espectrofotométrico medido en espectrofotómetro desde 450 hasta 700 nm para el ensayo de detección de saponinas. Como criterio de selección se tomaron las mayores absorbancias relativas para cada extracto después de aplicar el método, indicando mayor abundancia de estos compuestos. El incremento en absorbancia relativa está asociado a un incremento visual detectable en la prueba colorimétrica evaluada (ver Figura 3E) y en la tabla 2 se agrupan con base en un valor ponderado en relación a su presencia como (+) Poca, (++) Mediana y (+++) Abundante

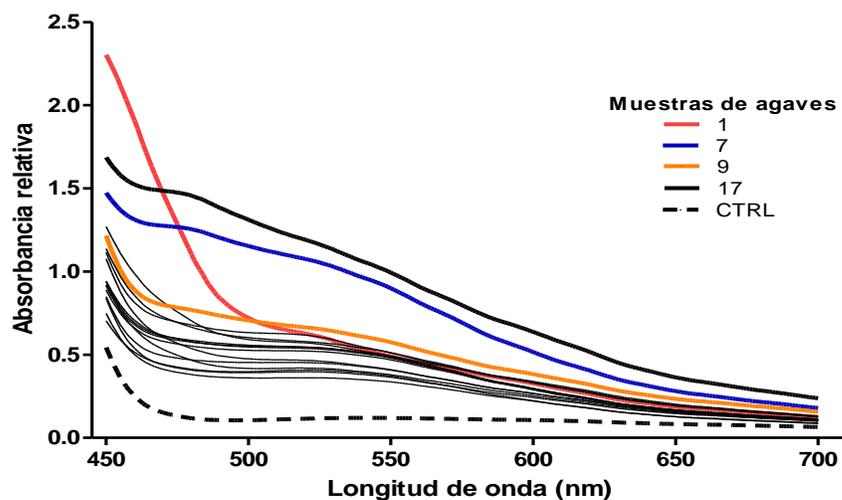


Figura 4. Perfil espectrofotométrico (450 a 700 nm) de saponinas totales presentes en extractos hidrolizados de agaves. En color se resaltan las muestras de agaves que presentaron mayor absorbancia relativa indicando una mayor concentración de saponinas. Para mayores detalles de la metodología, revisar el punto 4.2 sección estimación de saponinas. El CTRL (control) corresponde a el solvente utilizado para las soluciones.

En la tabla 3 se representan los valores de actividad antioxidante de los extractos crudos de agaves equivalente a un mililitro. Las muestras 1, 9 y 14 presentaron la mayor capacidad de inhibir el radical DPPH (150 μ M) con valores de 6.19, 6.33 y 7.83. Los jugos que presentan la menor actividad son la muestra 3 y 4 con 3.81 y 3.97. La M14 presentó la mayor actividad antioxidante y es la única especie en este estudio que presentaba inflorescencia.

Tabla 3. Actividad antioxidante por DPPH de extractos hidrolizados de agaves.

Muestra	Actividad antioxidante DPPH
1	6.19 \pm 0.39 g
2	3.81 \pm 0.17 a
3	3.97 \pm 0.09 ab
4	4.33 \pm 0.33 cd
5	4.03 \pm 0.06 abc
6	5.42 \pm 0.11 f
7	4.63 \pm 0.09 bcd
8	4.47 \pm 0.43 d
9	6.33 \pm 0.06 g
10	4.43 \pm 0.04 d
11	4.40 \pm 0.14 d
12	4.89 \pm 0.36 e
13	4.35 \pm 0.64 d
14	7.83 \pm 0.11 h
15	4.80 \pm 0.14 e
16	4.28 \pm 0.27 cd
17	4.80 \pm 0.38 e

Los resultados globales de fitoquímicos indican que los extractos hidrolizados después de ser sometidos a procesos térmicos poseen compuestos provenientes del metabolismo secundario, estos resultados concuerdan con reportes previos en agaves (Hamissa et al., 2000; Santos-Zea et al 2016b), y mediante TLC se identificaron en la bebida carbohidratos que en su mayoría corresponde a glucosa, fructosa y sacarosa.

La cuantificación de fitoquímicos permitió la reducción del número de muestras para seleccionar los EH de agaves con mayor concentración de grupos de compuestos de interés para su posterior evaluación biológica y los cuales se muestran en el siguiente cuadro

En la tabla 4 se reporta el valor del pH de las bebidas antes de liofilizar, se les midió el pH con un potenciómetro y las bebidas se encuentran en un rango entre 4.63 y 5.18, mientras que para las de parota de 5.05 y 5.06.

Tabla 4. Valores de pH en jugos de agaves y de parota.

Muestra	pH
1	5.18
4	5.05
6	4.79
7	4.63
14	4.86
17	4.69
H.1.	N.I.
P.M.	5.05
P.C.	5.06

N.I.= Sin información.

Con base en los resultados de las cuantificaciones realizadas, en la Tabla 5 se comparan en orden decreciente (es decir, de mayor a menor) los agaves seleccionados por una mayor acumulación de compuestos de interés para este proyecto, los cuales incluyen saponinas, fenoles y antioxidantes. De las 17 muestras iniciales, los agaves identificados con el número 1, 4, 6, 7, 14 y 17 fueron seleccionadas para ser evaluadas en los ensayos biológicos. La muestra 1, 4, 6 y 7 corresponden a Tlajomulco mientras que la 14 y 17 a Mascota Jalisco, y a continuación se describen por separado como se agruparon.

La muestra 1 presentó la mayor cantidad de saponinas y el tercer puesto con saponinas, mientras que la muestra 4 sólo destacó por ser la segunda planta con mayor acumulación de saponinas y es la única planta analizada en este estudio que aún conservaba la inflorescencia.

En la muestra 6 se presentó la mayor cantidad de fenoles y la segunda con mayor cantidad de azúcares reductores, mientras que en la muestra 7, presentó el segundo lugar de fenoles y saponinas.

La muestra 14, presentó la mayor capacidad antioxidante y ocupa el tercer puesto en acumulación de fenoles. En la muestra 17, se observó un incremento sobresaliente en el contenido de azúcares reductores, saponinas y saponinas con primero, primero y tercer lugar en la agrupación.

Tabla 5. Relación de las principales muestras de agave seleccionadas por un mayor contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante.

Prueba realizada	Orden decreciente		
	1ro	2do	3ro
Azúcares reductores	17	6	15
Fenoles totales	6	7	14
Actividad antioxidante	14	9	5
Saponinas	17	7	1
Sapogeninas	1	4	17

En la figura 5 se pueden observar fotografías ilustrativas tomadas a las plantas en su estado silvestre que fueron visitadas para realizar las colectas de pencas. La muestra 4, fue la única planta sometida que presentaba inflorescencia intacta. En la figura se anexa el producto donado (muestra 17) para su análisis y que es comercializado en la zona productora de raicilla en Mascota Jalisco. Con este sistema de escrutinio se realizó con la intención de enriquecer los extractos crudos con grupo de metabolitos de interés para aumentar las probabilidades de presentar una actividad biológica sobre las células evaluadas.

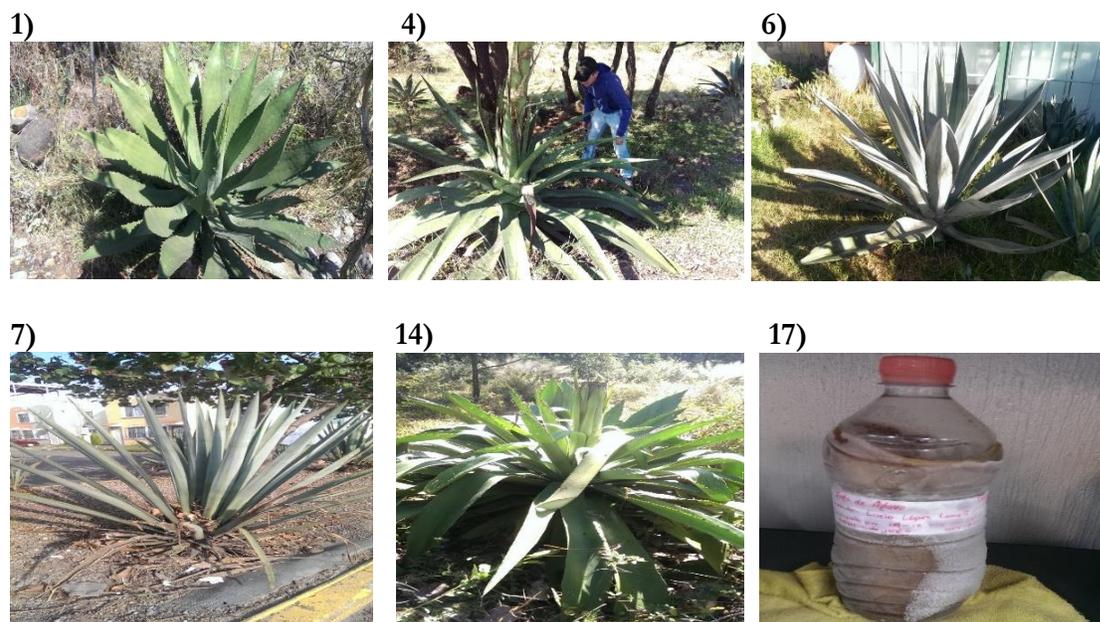


Figura 5. Plantas de agaves en su estado silvestre empleadas para su evaluación en modelo biológico.

Las plantas que se muestran en la figura (correspondientes a las muestra 1, 4, 6, 7, 14, y jugo donado que se le asignó el numero 17) fueron seleccionadas por presentar una mayor concentración de fitoquímicos y actividad antioxidante. Las fotografías son representativas de las plantas en su estado silvestre de las cuales se obtuvieron las hojas y los extractos fueron evaluados en ensayos biológicos. Fotografías: fuente propia.

Discusión de resultados

Variación en el contenido de carbohidratos y fitoquímicos

¿A qué se debe que los perfiles en este estudio varíen?. Las plantas están sujetas a cambios fisiológicos constantes durante su vida, y en los diferentes órganos del agave no es la excepción. Con respecto a la acumulación de carbohidratos y compuestos químicos provenientes del metabolismo secundario se experimentan cambios bioquímicos que están asociados a diversas condiciones naturales. En los primeros intentos por descubrir la adaptabilidad de los agaves a climas adversos, Nobel (1977) analizó la relación del suministro de agua durante la maduración del *Agave deserti* y cuantificó el peso de las hojas observando un decremento en peso acompañado de su muerte.

En un estudio más reciente, Pinos-Rodríguez et al. (2008) también estudiaron el efecto de la edad en la composición química (materia seca, materia orgánica, proteína cruda y carbohidratos solubles) de las hojas de *A. salmiana* a los 12 años de edad (etapa joven), 14 (etapa intermedia) y 16 (etapa adulta). Se determinó un mayor contenido de saponinas en la etapa adulta (11.1 g/kg materia seca) y de proteína cruda en etapa joven (48 g/kg materia seca), mientras que los carbohidratos solubles incrementan en la etapa intermedia (358 g/kg materia seca). Estos reportes confirman cambios fisiológicos que influyen la composición química de los agaves, y están asociados a la etapa fisiológica y necesidades energéticas en las que se encuentran.

En este estudio, las muestras colectadas incluso en edades similares presentan pesos foliares y composición química diferentes. El peso de las hojas varía ocasionado quizá por diferencias en el contenido de agua y fibras que conforman la estructura natural de cada hoja. El medio ambiente y condiciones de nutrición también desempeñan un papel crucial, donde van acompañados de las precipitaciones anuales y condiciones ambientales a las que estaban sujetas las plantas.

Hablando en términos de rendimiento de producto hidrolizado, se encontró que la planta con la mayor obtención corresponde para *A. salmiana* alcanzando hasta 2.05 L, debido a que presenta hojas más suculentas que el resto acumulando mayor cantidad de agua, mientras que las pertenecientes a *A. inaequidens*, *A. maximiliana*, y *A. rhodacantha*, especies utilizadas para producir raicilla obteniendo volumen son bajos.

Para obtener datos más precisos del comportamiento fisiológico de los agaves, diversos experimentos han sido desarrollados en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales sometiendo a diversos tipos de estrés a las plantas con la finalidad de enriquecer los tejidos foliares manteniendo condiciones específicas de crecimiento para evaluar el comportamiento fisiológico bajo diferentes condiciones simuladas.

Las especies más estudiadas dentro del género son *A. salmiana* y *A. tequilana* por la importancia económica que representan. Las principales moléculas objetivo son el comportamiento foliar de carbohidratos, saponinas, fenoles o compuestos bioactivos específicos. La respuesta fisiológica entre especies varía considerablemente bajo la misma situación de estrés y estos ensayos proveen un panorama del comportamiento intra e inter específico de los agaves en etapas tempranas de vida. Por ejemplo, en un estudio reciente desarrollado por Suárez-González et al. (2016) evalúan condiciones de estrés abiótico en *A. salmiana* para analizar la biosíntesis de fructanos.

En nuestro estudio los resultados que se obtienen del perfil de carbohidratos por TLC en las muestras de agaves comparten homología, existiendo una mínima variabilidad en el tipo de carbohidratos identificados en los EH. Michel-Cuello et al. (2008) demostraron que los carbohidratos de agave (fructanos) bajo condiciones de hidrólisis por procesos térmicos liberan generalmente una mayor cantidad de fructosa por las unidades de que los conforman.

Por otra parte, trabajos en serie por Puente-Garza et al. dan seguimiento al perfil de metabolitos secundarios en plántulas por cultivo *in vitro* empleando *A. salmiana*.

Específicamente, Puente-Garza et al. (2015) utilizan *A. salmiana* para la producción de antioxidantes y principios bioactivos comparando extractos acuosos y metanólicos de plantas *in vitro* (PI), plantas aclimatadas (PA) y con plantas silvestres (PS). En el caso de los carbohidratos, las plantas *in vitro* presentaron 50 % menos azúcares solubles comparadas con PA y PS (64, 127 y 129 mg equivalentes sacarosa/g peso seco respectivamente). Se observó un incremento en un 30% en los ácidos fenólicos en PI y PA frente a PS (11.8, 10.8 y 7.0 mg ácido gálico/g peso seco). Mientras que el contenido de saponinas en PI y PA fue superior por 36 y 25 veces comparado con PS (2.1, 77.1 y 63.3 mg/Equivalentes a protodioscina g peso seco respectivamente). Para el caso de la actividad antioxidante también se observó un incremento tres veces en PI respecto con los demás tratamientos (PI=369 μM /ET g peso seco, PA=184 μM y PS=146 μM respectivamente).

En un estudio similar, Puente-Garza et al. (2017) evalúan polietilenglicol (PEG 0, 10, 20 y 30% p/v) con la finalidad de incrementar fenoles, flavonoles, saponinas y actividad antioxidante para realizar una comparación de su efecto con plantas silvestres de *A. salmiana*. Los cambios

morfológicos en longitud de raíz y color de las hojas fue observada, y una variación sin significancia en el perfil de 3 ácidos fenólicos de 5.06 a 3.85 mg EAG/g peso seco, de los cuales los flavonoles fueron de 1.7 y 0.4 mg/g. Las saponinas fueron significativamente diferentes, el tratamiento con 30 % mostró el mayor incremento con 171.45 mg/g peso seco, generando una acumulación de 22 veces más comparado con el control. Con respecto a la actividad antioxidante también fue detectada una variación, el tratamiento control posee 63 μM ET/g peso seco, seguido de 10 y 20 % con 534 $\mu\text{M/g}$ y 575 $\mu\text{M/g}$ respectivamente. Mientras que el tratamiento que incluye un 30 % la actividad fue de 976 $\mu\text{M/g}$. Estas condiciones de estrés generan incrementos que equivale a 8, 9 y 16 veces más comparado con el tratamiento control. En este reporte se observo que la actividad antioxidante se correlacionó positivamente con el contenido total de saponinas ($r=0.874$, $p=0.001$), indicando que dicha actividad no es exclusiva del grupo de polifenoles a los que normalmente esta asociada, caso contrario con el reporte previamente descrito. Puente-Garza et al. (2017a) también determinaron que la concentración de flavonoles y saponinas en tejidos foliares de *A. salmiana* obtenidos bajo condiciones *in vitro* es mayor comparado con plantas silvestres.

Comparando la información obtenida en las últimas tres investigaciones mencionadas que emplean únicamente plantas de *A. salmiana* en etapas jóvenes, en nuestro estudio al incluir 17 extractos observamos que la acumulación de metabolitos secundarios e hidratos de carbono fue diferente. Se vuelve complejo dar un análisis tan detallado, esto debido a que son diferentes especies con edad diferente y que crecieron en condiciones ambientales silvestres. Estas diferencias están probablemente asociadas a respuestas bioquímicas naturales, acumulando diferentes concentraciones de moléculas en los tejidos vegetales, lo que dificulta dar una tendencia similar incluso dentro de las mismas especies.

En este estudio las correlaciones indican que para capacidad antioxidante con los fenoles es de $r=0.42$, capacidad antioxidante y saponinas $r=0.41$, azúcares reductores y fenoles $r=0.22$, azúcares reductores y saponinas es de $r=0.11$, y por último azúcares reductores y antioxidante $r=0.10$. Detectamos que la mayor correlación obtenida fue para fenoles respecto a capacidad antioxidante con 0.42, valor menor al citado previamente por Puente-Garza et al (2007).

En los resultados plasmados en la tabla 2, podemos identificar de manera general que las extractos de hojas contienen una importante cantidad de fenoles totales, azúcares reductores y saponinas. Analizando específicamente la muestra 17 que es el producto que se obtiene de manera artesanal, destacó por sobresalir en los cuatro grupos de moléculas analizada en este estudio, a diferencia de los tiempos cortos de hidrólisis simulados en laboratorio frente a las 15 horas que

permanecen en los hornos de mampotería esto arroja una mayor liberación de estas moléculas, lo que favorece una mayor cantidad en el producto comercializado.

Efecto del tratamiento térmico sobre el perfil de carbohidratos

La finalidad primordial del metabolismo primario de los agaves es la síntesis de carbohidratos y de estos, los fructanos representan un contenido por encima del 60 % en peso seco de los tejidos, los cuales contienen una mezcla heterogénea compleja de carbohidratos con un alto porcentaje de fructooligosacáridos (López y Mancilla-Margalli, 2007). Las hojas son el tejido donde se sintetizan y almacenan fructanos en diferente grado de polimerización y la gran mayoría de estos son transportados a la piña en un grado de polimerización mayor, siendo el órgano con mayor valor industrial.

Las muestras hidrolizadas en este trabajo presentaron una tonalidad café turbia (ver figura 1, incisos G) y H)) probablemente asociado por la generación de la Reacción de Maillard. En la figura 2, se puede observar que al hidrolizar los jugos una mayor cantidad de G, F y S es liberada al jugo. Para la obtención de productos alcohólicos de agaves se necesita de un proceso térmico, y en esta investigación los EH fueron sometidos a temperaturas elevadas para obtener el jugo y simular los procesos artesanales que utilizan normalmente para comercializarlo.

El trabajo que más se acerca a la metodología seguida a este reporte es el desarrollado por Muñiz-Márquez et al. (2015), en el cual analizaron la influencia del efecto térmico por esterilización (15 libras a 121°C durante 15 min) en la composición fisicoquímica de los azúcares del jarabe de *A. salmiana* para la posterior elaboración de pulque, y en conjunto por TLC analizan el comportamiento antes y después de esterilizar la bebida. El TLC obtenido en esta investigación difiere con los resultados reportados por este autor, principalmente sobre el contenido de sacarosa. Después de esterilizar el jarabe de agave (mismas condiciones que en este estudio) se observaron un incremento significativo en la concentración de sacarosa por TLC y comprobado por cromatografía de alta resolución. También se observó un incremento normal de glucosa y fructosa después de esterilizar y la pérdida de fructanos tipo inulina después de someter a esterilización los jarabes y un incremento en el contenido de azúcares totales (de 102.88 ± 2.66 a 108.64 ± 7.78 g/L) y azúcares reductores por método Fehling (33.33 ± 2.38 y 47.25 ± 3.40 g/L) en muestras sin y con proceso de esterilizado. Los azúcares reductores cuantificados en este estudio son similares con los del jarabe de agave, la muestra 17 presentó la mayor concentración, aproximadamente 32 g/L, muestra donada por el productor de raicilla asociado quizá a un tiempo mayor de exposición al proceso térmico. Por otra parte, en el caso del jarabe el contenido de lípidos, sólidos totales, grados brix y densidad mostraron

un efecto contrario (disminución después de esterilizar), respecto a los azúcares reductores. En el caso del pH el valor oscila entre 4.9 y después de fermentar desciende a 3.7-3.9.

La sacarosa es el primer disacárido hidrolizado por las plantas cuando requieren energía (Michel-Cuello et al., 2008). En este estudio no fueron analizadas las hojas antes de esterilizar, sin embargo, por medio del TLC se puede observar una considerable concentración de este disacárido (con excepción de la muestras 8 y 10 que corresponden a *A. salmiana* y *A. inaequidens* con 10 años de edad). Si bien, son productos obtenidos de diferente tejido del agave (hojas y jarabe) se observa por TLC una mayor cantidad de oligosacáridos en la bebida y en cuanto a G, F, y S valores similares, estos datos difieren aunque hayan sido muestras que fueron sometidas al mismo tratamiento de esterilizado. Se debe considerar que el incremento de estos fructooligosacáridos sea probablemente porque los azúcares sean de menor Grado de Plimerización (GP) en aguamiel ya que llegan en su mayoría hidrolizados, mientras que la presencia en las hojas es porque ahí son sintetizados. Es importante resaltar que en nuestro estudio 15 de las 16 plantas muestreadas no presentaban inflorescencia, a excepción de la muestra 4. Sin embargo, mediante el TLC (figura 2A) no se mostraron diferencias marcadas.

En otro estudio similar, se realizó un seguimiento a los componentes de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dick por el efecto térmico. Zamora et al. (2010) analizaron el comportamiento de los azúcares y saponinas durante el tratamiento a las piñas de agaves para la producción de mezcal. Empleando un rango de temperatura de 50 y 80 °C, desde 3 hasta 30 horas (temperaturas inferiores que las utilizadas en este estudio), dando seguimiento al pH, sólidos totales y abundancia de saponinas. Con relación al pH comenzaron con valores entre 5.4 y durante la hora 3 hasta las 30 permaneció en 4.8, mientras que el porcentaje de los azúcares reductores también tienden a incrementar conforme más tiempo permanecen en cocción de 1 hasta 5 %. Michel-Cuello et al., (2008) reportaron que los mayores constituyentes son fructosa (~48 y ~80 mg/ml) y glucosa (~20 y ~30 mg/ml) cuando someten a 80°C jugo de agave durante 30 h.

Quizá, un incremento en el contenido de azúcares reductores en los EH se hubiera dado si las hojas permanecieran durante un mayor tiempo en el proceso de esterilización. Con relación a la época de colecta de las hojas, quizá los datos obtenidos presentarán un incremento debido a que durante el periodo de sequía ocasionado por estrés hídrico. En el caso particular de la muestra 17 (ver figura 2A), se observa un incremento en la concentración de azúcares reductores, especialmente fructosa por la manchas desarrollada en TLC, estos se debe probablemente a que durante la

obtención de la bebida por una mayor temperatura de calor alcanzada y tiempo de exposición en los hornos de mampostería (15 horas) donde se hidrolizan una mayor cantidad de carbohidratos.

Los valores de pH son similares de las bebidas de EH con los ensayos de acurdo a los reportados por Mancilla-Margalli y López (2002). En su estudio, al *A. tequilana* le dan seguimiento a la formación de compuestos fermentables que dan lugar a compuestos en la generación de reacción de Maillard, y se reportan valores de pH aproximados entre 4.5 y 5.0 valor que decrementa durante el cocimiento de *A. tequilana* durante la elaboración de tequila. Explican que este decremento se da probablemente por la formación de ácidos orgánicos en las muestras, incremento de furanos, piranos, aldehídos, compuestos nitrogenados y sulfurados durante el tratamiento, o están ocasionados a una incapacidad de los grupos amino de actuar como bases cuando los compuestos amino han reaccionado. Los valores obtenidos se generan por someter los agaves durante 4 a 32 horas y por consecuencia la absorbancia (lecturas a 490 nm) de la bebida incrementa gradualmente de ~0.26 hasta ~0.42, característica normal de la formación de la reacción de Maillard. También observaron presencia de azúcares reductores y un incremento considerablemente con respecto a los demás artículos citados, aproximadamente 410 mg/ml de azúcares reductores con un incremento exponencial después de las 10 horas, mientras que este estudio el *A. tequilana* mostró 510 mg/100 ml, valor muy inferior resaltando que son valores perteneciente s tejidos diferentes, piña y hoja respectivamente.

Para un mayor conocimiento de la composición de la bebida, se recomienda evaluar químicamente la formación de compuestos durante la hidrólisis de las pencas de agaves, dando seguimiento en la composición de aldehídos, cetonas, compuestos aromáticos y volátiles, terpenos, piranos, compuestos sulfurados o nitrogenados, correlacionando el contenido de azúcares (totales y reductores) con los ° Brix.

La temperatura utilizada para la obtención de la bebida analizada en esta investigación es superior a la utilizada por otros reportes, y por tal motivo los carbohidratos solubles a los extractos a evaluar incrementó. La intención de analizar la presencia de carbohidratos en los extractos precipitados con saponinas fue para evaluar si la presencia de un alto contenido de carbohidratos podría interferir en los ensayos biológicos. Además la finalidad de este paso fue para enriquecer los extractos con una mayor concentración de saponinas, en la figura 2B se anexa una placa de TLC de los extractos precipitados en la cual no se observan carbohidratos en las muestras.

Perfil fitoquímico y actividad antioxidante

Con la finalidad de abordar las diferentes variantes metodológicas y resultados obtenidos en los reportes científicos, Cordell (2014) explica los diversos mitos generados con relación a la funcionalidad biológica de los compuestos obtenidos de plantas tanto aplicados en la medicina tradicional y de los compuestos aislados en laboratorio. La revolución en la fitoquímica es constante y eventualmente surgen nuevas técnicas para el tratamiento de los productos naturales. Cordell aborda diversos temas relacionados con la comparación entre plantas silvestres si es que son más efectivas que las cultivadas, o si el efecto biológico depende de la parte evaluada de la planta, incluso una posible pérdida de actividad de los compuestos obtenidos de plantas adultas, entre otras. En conjunto, todas estas situaciones buscan asociar un comportamiento general y potencializar las propiedades biológicas o químicas de los tejidos vegetales en sus diferentes etapas fisiológicas, o durante los metodologías de preparación y consumo de las plantas.

Contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos forman parte de los constituyentes químicos de frutas, vegetales, bebidas (té, café, cerveza), hierbas y especias, su consumo frecuente representa importantes beneficios para la salud y el consumo diario recomendado por persona es equivalente a 1 gramo. Los beneficios van acompañados con efectos protectores del ataque por especies reactivas de oxígeno, actividad prooxidante, efecto sinérgico con otros fitoquímicos, entre otros (Shahidi y Ambigaipalan., 2015).

Los métodos espectrofotométricos son ampliamente utilizados para determinar concentraciones de fitoquímicos en extractos naturales, y los fenoles en el género *Agave* representan constituyentes químicos importantes que están distribuidos en toda la planta y su contenido puede ser utilizado como un marcador taxonómico dentro del género (Almaraz-Abarca et al., 2013).

El *A. americana* es considerado por poseer la mayor cantidad de fenoles de todos los agaves, concentraciones de 7.7 g/kg de fenoles y 2.5 g/kg para taninos ambos en peso seco, en otro estudio se reportan 4.49 y 12.30 mg/g empleando diferentes métodos de extracción, encontrando flavanonas, taninos, flavonoles, flavonoides y homoisoflavonoides que presentan actividad antioxidante *in vitro* (Nasri y Salem., 2012; Hamissa et al., 2012).

En nuestro estudio, como era de esperarse en el *A. americana* se encontró el mayor índice de fenoles totales, seguido del *A. tequilana* y *A. rhodacantha*. La comparación directa entre las especies de las regiones indica que para las obtenidas de Mascota no existió una diferencia muy marcada

comparada con las de Tlajomulco. Las plantas obtenidas en la región productora de raicilla se colectaron entre un radio territorial aproximado a un kilómetro, y por tanto las condiciones ambientales no son tan diferentes.

En el trabajo desarrollado por Hamissa et al. (2012) evaluaron altas temperaturas (25-150 °C), tiempos de extracción (15-240 minutos), presión en reactores (1, 2 y 10 bares), y atmósfera de nitrógeno para la extracción eficiente de fenólicos utilizando hojas de *A. americana*. Con el uso de nitrógeno incrementa el contenido de fenoles a más de 315 % a 150 °C, comparado con el control. El máximo contenido de fenoles y flavonoides alcanzado en 6 hr es 23.8 mg/g a 15.5 mg/g ambos de peso seco, mientras que sin atmósfera el contenido de fenoles totales incrementa de 4.49, 4.51, 6.93 y 10.94 mg/g peso seco) conforme aumenta la temperatura (25, 50, 100 y 150 °C respectivamente), mientras que los flavonoides permanecen constantes 0.96, 1.06, 1.08 y 1.18 mg/g peso seco, y con atmósfera incrementa de 0.96 a 4.90 mg/g. El impacto en la capacidad antioxidante por DPPH después de someter los compuestos a estas condiciones también fue determinado encontrando una correlación significativa entre los fenoles y flavonoides ($R^2= 0.946$ y 0.961 respectivamente) sobre el radical DPPH. Esta tecnología de altas presiones, temperaturas y tiempos prolongados en tratamiento sugiere una alternativa para obtener una máxima cantidad de compuestos fenólicos.

Estos valores indican el incremento de fenoles y una pérdida de flavonoides durante este proceso, este antecedente sugiere no utilizar temperaturas mayores para evitar la pérdida de compuestos. Seguramente las temperaturas alcanzadas en la producción artesanal superan por mucho 150 °C. En este estudio no se analizaron los flavonoides para determinar su presencia.

La correlación que se hace en este estudio como se indicaba anteriormente, se observó que los polifenoles muestran una correlación $r=0.42$ sobre el radical DPPH.

En este estudio la presión fue aproximada de 1 bar y el tiempo de exposición fue inferior (15 min), probablemente la exposición de los fenoles a este método de extracción son menos eficientes en comparación con los métodos artesanales.

Contenido de saponinas y sapogeninas

En general, las concentraciones detectadas de saponinas y sapogeninas por los métodos espectrofotométricos implementados en esta investigación son los que presentan mayores variaciones en los jugos obtenidos. Para las plantas obtenidas de Mascota, se detectan una menor variación al igual como sucedió para fenólicos. Las muestras 2 y 5 son las que se detectaron las más bajas cantidades de sapogeninas

Hasta la fecha, las saponinas de agave continúan ganando interés por la abundancia en los tejidos vegetales y actividades biológicas reportadas. Un estudio reciente conducido por Figueroa et al. (2017) inoculan savia de *A. salmiana* para ser fermentada con microorganismos aislados del suelo, esto con la finalidad de enriquecer la cantidad de saponinas y evaluar si presentan un incremento en actividad citotóxica de estos metabolitos sobre las líneas cancerosas de colon (Caco-2), hígado (Hep-G29) y células control (NIH-3T3), evaluando posteriormente por espectrometría de masas los compuestos. Se determinó que el efecto de enriquecimiento varía dependiendo del tiempo de fermentación, microorganismo y línea evaluada, abriendo líneas con énfasis sobre los microorganismos que sobreviven después del tratamiento térmico y las actividades sobre los fitoquímicos.

Debido a una variación importante entre las dos regiones visitadas y que las colectas se realizaron en época de sequía, Zamora et al. (2010) reportan la cuantificación de sapogeninas en plantas colectadas durante época lluviosa y época de sequía con previo tratamiento térmico y se observa una mayor cantidad durante la época seca (aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin mostrar estabilidad durante el proceso de cocción de 3 a 30 horas), mientras que para las plantas colectadas en temporada de lluvias fueron menores las concentraciones reportadas (aproximadamente 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En nuestro estudio las colectas de plantas se realizaron en temporada de lluvias y se encontraron concentraciones ligeramete superiores respecto a las de Zamora et al. (2010) siendo 4.37 mg/100 ml la más alta (equivalente a 43.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y la más baja de hasta 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Reportes previos en otras plantas indican que el contenido de saponinas incrementa bajo la influencia de condiciones ambientales como estrés hídrico a los tres meses de edad (Odjegba y Alokolaro., 2013), mientras que en otros disminuye (Ramakrishna y Ravishankar., 2011).

El contenido de saponinas esteroidales y sapogeninas en la familia Agavaceae es ampliamente reportada por la diversidad estructural y actividades biológicas que desempeñan (Simmons-Boyce y Tinto., 2007). En un estudio reciente, Eskander et al. (2010) reportaron 2 nuevas estructuras para saponinas en *Agave macroacantha*, mientras que Yokosuka y Mimaki (2009) determinaron un IC_{50}

equivalente desde 5.5 hasta 12.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de compuestos pertenecientes a saponinas esteroidales obtenidas de *Agave utahensis* con actividad citotóxica sobre células de leucemia (HL-60)

En cuanto a la acumulación de saponinas en agaves, su contenido *A. salmiana* a los 16 años de edad es de 11.1 g/kg de materia seca según lo reportado por Pinos-Rodríguez et al. (2008).

Recientemente, Figueredo et al. (2018) analizaron 272 plantas (de tres especies de agave) de 19 poblaciones obtenidas de diferentes municipios de Michoacán. Se determinó que el contenido de saponinas en *A. hookeri* es de 26.09 mg/g, para *A. cupreata* de 19.85 y 15.17 mg/g en cultivo silvestre y cultivado, mientras que en *A. inaequidens* es de 14.21, 12.95 y 10.48 mg/g, en estado silvestre, semicultivado y cultivado. Derante el análisis se identificaron 18 estructuras químicas de saponinas y solamente en *A. inaequidens* se encontraron todas.

En el caso de *A. americana* y *A. salmiana* son ampliamente valorados por el aguamiel que acumulan, Leal-Díaz et al., (2015) determinaron el contenido de saponinas en estado maduro e inmaduro. Los principales compuestos identificados kamogenina, manogenina, gentrogenin y hecogeninas. El contenido en *A. salmiana* fue de 478.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ comparado con *A. americana* de 179.0 $\mu\text{g}/\text{g}$, en ambas especies el contenido de cada saponina identificada disminuyo conforme incrementa una madurez sexual. Este comportamiento probablemente se de por las necesidad de protección que necesita, a una etapa adulta la planta utiliza su energía para el proceso de reproducción lo que probablemente genera una disminución en la acumulación de metabolitos secundarios. En nuestro estudio los valores encontrados respecto a saponinas fue similar al reportado por Zamora et al. (2010), sin embargo no se pudo obtener un valor numérico para darle seguimiento a este importante grupo de MS como lo son las saponinas.

La variabilidad en el contenido de saponinas, compuestos fenólicos, actividad antiproliferativa y propiedades fisicoquímicas y efecto terapéutico se ha detectado en los diferentes órganos que confoman los agaves (Santos-Zea et al., 2016). En nuestra investigación observamos una variabilidad entre las especies y regiones, y aunque comparten climas y condiciones literalmente similares el análisis de los grandes grupos de moléculas y su contenido de estos compuestos químicos acumulados en sus hojas varía. La mayoría de los reportes con que se comparan estos datos provienen de metodologías que conservan metodologías normales de extracción, los resultados que obtuvimos no dejan de ser interesantes, ya que el producto que se obtiene de esta fuente es consumido por personas y se mantiene las similitudes muy marcadas en cuanto a respuestas vegetales diferentes entre las mismas especies como lo reportan otros estudios.

Determinación de la capacidad antioxidante

Las bebidas o alimentos al presentar diferentes compuestos experimentan cambios a través del tiempo y sus propiedades organolépticas, químicas y fisicoquímicas cambian. En el caso particular de savia de agaves Santos-Zea et al. (2016a) analizaron el aguamiel y su efecto sobre el desarrollo de reacciones de Maillard por la interacción de polifenoles con aminoácidos y proteínas formando complejos, también se siguió a los valores de pH los cuales se mantuvieron entre 4.4 y 5.0, el contenido de fenoles entre 0.56 y 1.14 mg EAG/g peso seco. Se detectó que a concentraciones elevadas de saponinas el índice de pardeamiento fue menor, y para las muestras con menor cantidad de saponinas el pardeamiento a las 20 semanas incrementó. Estos antecedentes nos permiten inferir un probable comportamiento similar de la bebida obtenida de las pencas de agave, ya que reacciones químicas en alimentos provocan cambios en las propiedades antes mencionadas, mismos que deben analizarse para proveer información al consumidor de la bebida.

El grupo de polifenoles y saponinas han presentado actividad antioxidante sobre diversos radicales. En otro tema, se ha determinado que el contenido de fenoles y su correlación con la capacidad antioxidante en el género agave no siempre es exclusivo de los fenoles (Ahumada-Santos et al., 2013), mientras que Puente-Garza et al. (2017) demostró una correlación con el contenido de saponinas, en el estudio de Agaves de especies silvestres de Sinaloa (*A. rzedowskiana*, *A. impressa*, *A. ornithobroma*, *A. schidogera* y *A. angustifolia*) fue de $r=0.74$, mientras que nuestro estudio entre fenoles y capacidad antioxidante fue baja.

La actividad antioxidante detectada mediante el radical DPPH demuestra que la bebida debe ser considerada como fuente de antioxidantes. Debido a la liberación al jugo hidrolizado de múltiples moléculas con esta propiedad, posteriormente se deberá profundizar en los datos. Se recomienda aplicar protocolos diferentes (ABTS, ORAC, β -caroteno) para evaluar otros antioxidantes.

En términos generales, la interpretación de los resultados obtenidos en cuanto al comportamiento foliar de los metabolitos secundarios se vuelve compleja, sin embargo en este primer acercamiento con el estudio de esta bebida se documenta información valiosa como un antecedente científico que se genera respecto a su acumulación en los tejidos vegetales y su posterior evaluación en modelos biológicos.

Resultados y discusión de la evaluación biológica

En este estudio el manejo de las líneas celulares y la evaluación de actividad antiproliferativa de los extractos sobre células fueron desarrollados por medio del ensayo MTT similares a como se describen en trabajos previos (Rascón-Valenzuela et al., 2015; Torres-Moreno et al., 2015; Meneses-Sagrero et al., 2017; Olivas-Aguirre et al., 2017), empleando las líneas celulares A-549, HeLa, RAW264.7 y ARPE, esta última como control.

De manera general, los resultados obtenidos en la evaluación biológica difieren con reportes de actividad antiproliferativa, citotóxica o antiinflamatoria que se encuentran ampliamente documentados dentro del género *Agave* (Bianchi y Cole 1969; Sáenz et al., 2000; Yokosuka y Mimaki 2009; Chen et al., 2011; Hernández-Valle et al., 2014; Santos-Zea et al., 2016b, 2016c).

Con el fin de identificar agaves silvestres con actividad biológica, de los seis extractos hidrolizados de agaves seleccionados por presentar la mayor concentración de fenoles totales, saponinas, sapogeninas y actividad antioxidante (ver tabla 5) para evaluarse en el modelo *in vitro* ninguno de estos presentó actividad antiproliferativa o antiinflamatoria.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el método por MTT. Después de estimular con diferentes concentraciones de los extractos hidrolizados de agaves (50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente) no se observaron cambios en la morfología y tampoco en la viabilidad celular de las líneas evaluadas. Al contrario, hasta pareciera que se observa un ligero incremento en la proliferación celular de las líneas celulares, específicamente A-549 y HeLa a concentraciones mayores de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

El ensayo MTT mostró porcentajes de viabilidad celular muy similares con respecto a las células control, y con las imágenes que se pueden observar en la figura 7.

Múltiples fotografías fueron tomadas a las 0, 24 y 48 horas de haber montado los ensayos para darle seguimiento a la morfología de las células en contacto con los estímulos. Las fotografías representativas fueron tomadas con la ayuda de un microscopio invertido sobre los ensayos montados en las microplacas a las 24 hr tal y como se muestra contundentemente en la figura 7 a las 24 horas y 48 no se observaron cambios en ninguno de los seis agaves utilizados respecto a las células control.

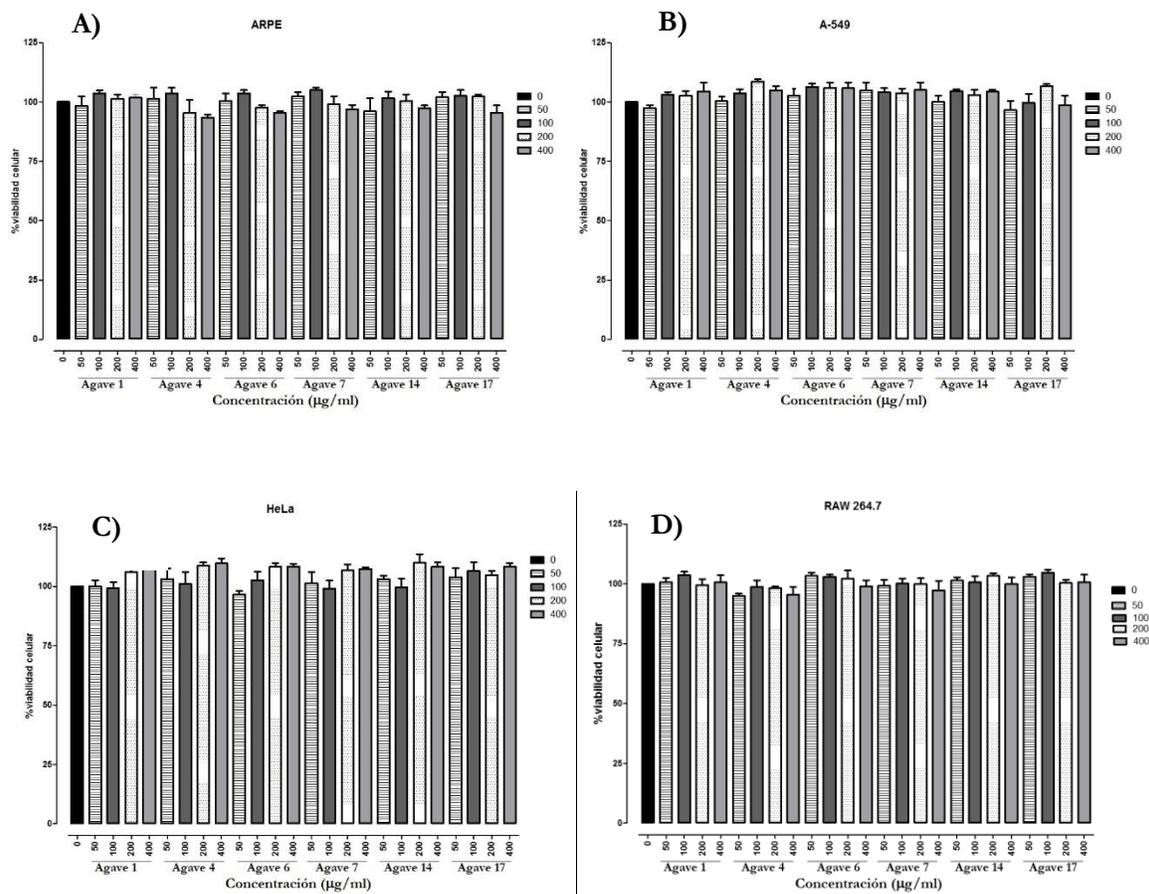
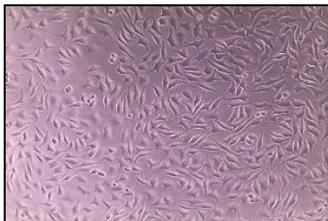


Figura 6. Actividad antiproliferativa de extractos de Agaves sobre cuatro líneas celulares. **A)** ARPE, **B)** A-549, **C)** HeLa, y **D)** RAW264.7 tratados con diferentes concentraciones de los extractos durante 48 horas. Los resultados se obtienen de los MTT realizados y se expresan como % de viabilidad celular y son representativos de tres ensayos. En cada ensayo se utilizaron células control a las cuales no se les aplicó estímulo.

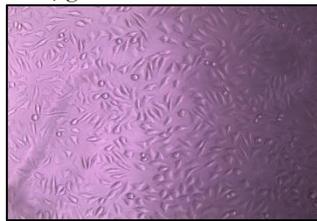
Debido a que se pueden obtener múltiples compuestos a partir de los tejidos de agave con actividad antiproliferativa sobre células cancerosas, reportes previos como el de Santos-Zea et al. (2016b) emplean métodos para fraccionar concentrados de agaves en la búsqueda de saponinas bioactivas, y en este caso el magueyosido B fue el de mayor abundancia y actividad sobre HT-29. Múltiples son los reportes que hablan de la basta variabilidad del contenido de saponinas y fenólicos presentes en los tejidos de agaves y su efecto sobre la actividad antiproliferativa (Santos-Zea et al., 2016c), que en nuestro estudio no se haya identificado actividad no significa que no la tengan. En nuestro estudio se obtiene resultados positivos acercándonos a conocer la composición de esta bebida a partir de diferentes especies y se abre un panorama general de acuerdo a la utilización empírica de este producto, ensayos posteriores serán convenientes para dar seguimiento y avanzar en su investigación y profundizar en resultados.

ARPE

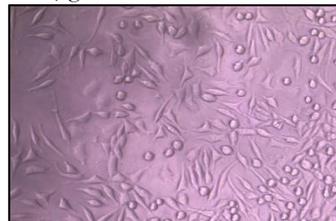
Células control



Agave 1.
400 µg/m

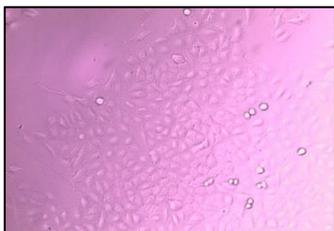


Agave 17.
200 µg/ml



A-549

Células control



Agave 4.
400 µg/ml

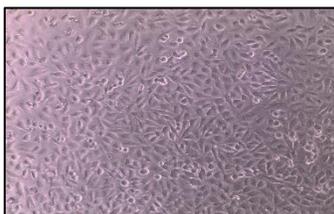


Agave 6.
400 µg/ml

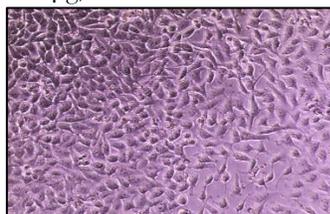


HeLa

Células control



Agave 14.
400 µg/ml

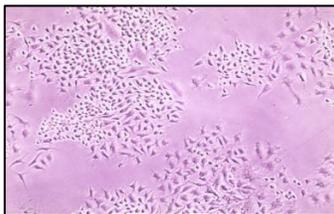


Agave 17.
400 µg/ml

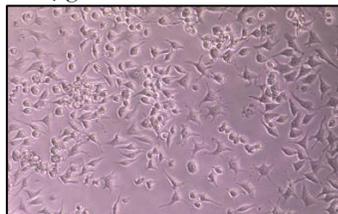


RAW264.7

Células control



Agave 7.
400 µg/ml



Agave 17.
400 µg/ml

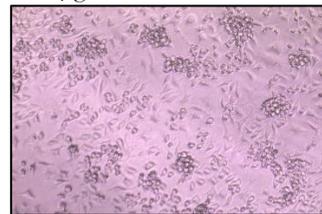


Figura 7. Extractos hidrolizados de pencas de agave no presentan actividad citotóxica sobre líneas celulares cancerosas (A-549, HeLa y RAW264.7) y líneas control (ARPE).

Los extractos se evaluaron a 50, 100, 200 y 400 µg/ml por triplicado para cada extracto y línea celular. Las imágenes son representativas para cada línea celular y especie de agave. Las fotos fueron tomadas a las 24 horas de haber aplicado el estímulo celular con un microscopio invertido. Para mayores detalles del ensayo revisar la sección 4.3 de este documento.

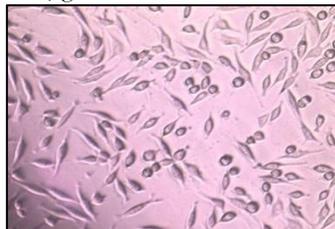
ARPE

Células control



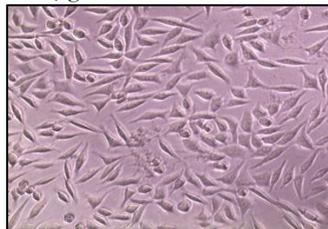
Parota Michoacán

400 µg/ml



Parota Colima

200 µg/ml



A-549

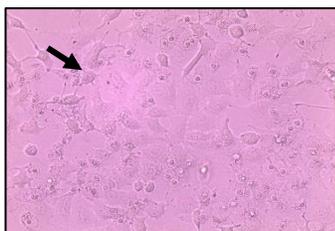
Parota Michoacán

50 µg/ml



Parota Michoacán

200 µg/ml



Parota Michoacán

400 µg/ml



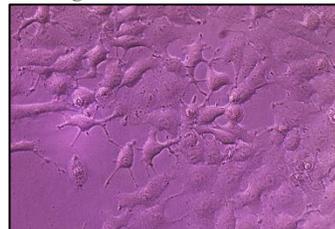
Parota Colima

50 µg/ml



Parota Colima

200 µg/ml



Parota Colima

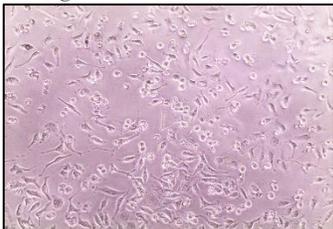
400 µg/ml



HeLa

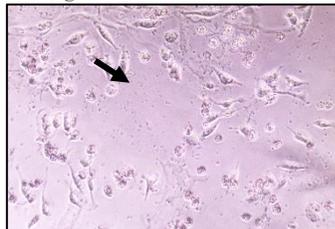
Parota Michoacán

200 µg/ml



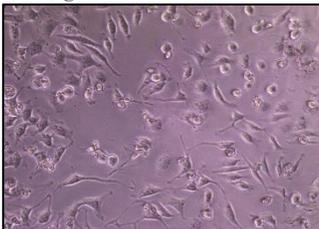
Parota Michoacán

400 µg/ml



Parota Colima

400 µg/ml



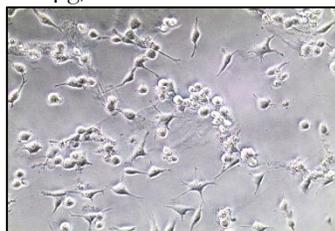
RAW264.7

Células control



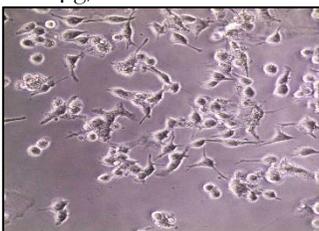
Parota Michoacán

400 µg/ml



Parota Colima

400 µg/ml



ARPE

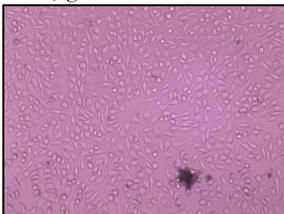
Heliopsis longipes

50 µg/ml



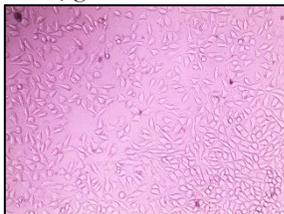
Heliopsis longipes

100 µg/ml



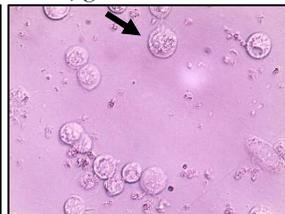
Heliopsis longipes

200 µg/ml



Heliopsis longipes

400 µg/ml



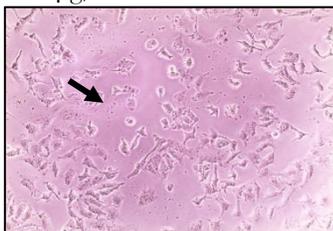
A-549

Células control



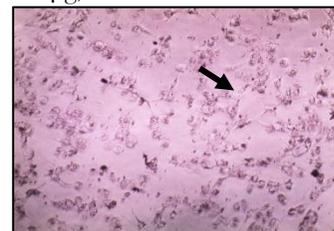
H. longipes

100 µg/ml



H. longipes

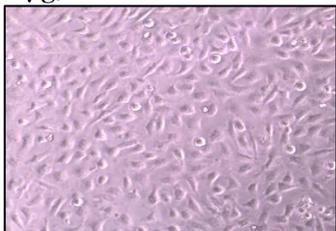
400 µg/ml



HeLa

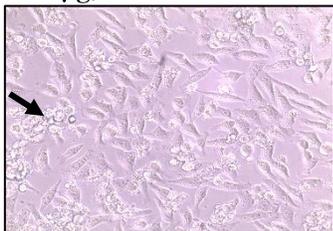
H. longipes

50 µg/ml



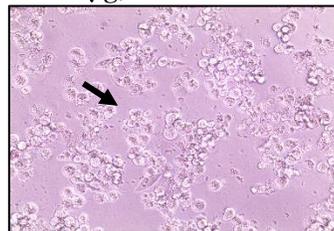
H. longipes

200 µg/ml



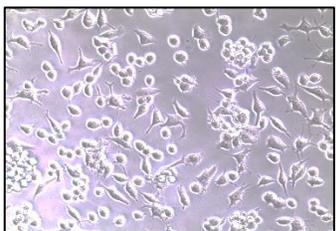
H. longipes

400 µg/ml



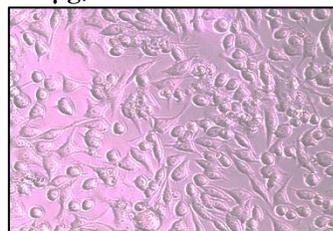
RAW 264.7

Células control



H. longipes

50 µg/ml



H. longipes

200 µg/ml

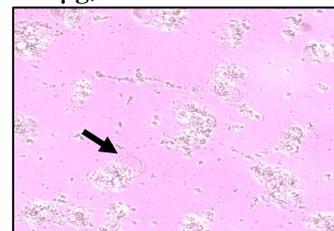


Figura 8. Extractos de raíz de *Heliopsis longipes* y frutos de parota presentan actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares ARPE, A-549, HeLa, y RAW264.7.

En la parte superior de cada imagen se anexa el extracto y concentraciones evaluadas. Las flechas negras sobre las fotografías indican cambios estructurales y apoptosis sobre las células estimuladas con los extractos a las 24 horas.

Las gráficas obtenidas con base a la viabilidad celular en las diferentes líneas evaluadas que fueron A-549, HeLa, ARPE y RAW264.7 empleando extractos de chilcuague y parota se muestran en la figura 9.

Al igual que con los ensayos con agaves se utilizaron concentraciones que van de 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se utilizaron células como control a las que no se les aplicó estímulos. Las gráficas corresponden a los resultados mediante ensayo MTT después de haber permanecido en incubación 48 horas y con base a una observación visual de las células en microscopio invertido son representativas por mostrar efectos sobre las células.

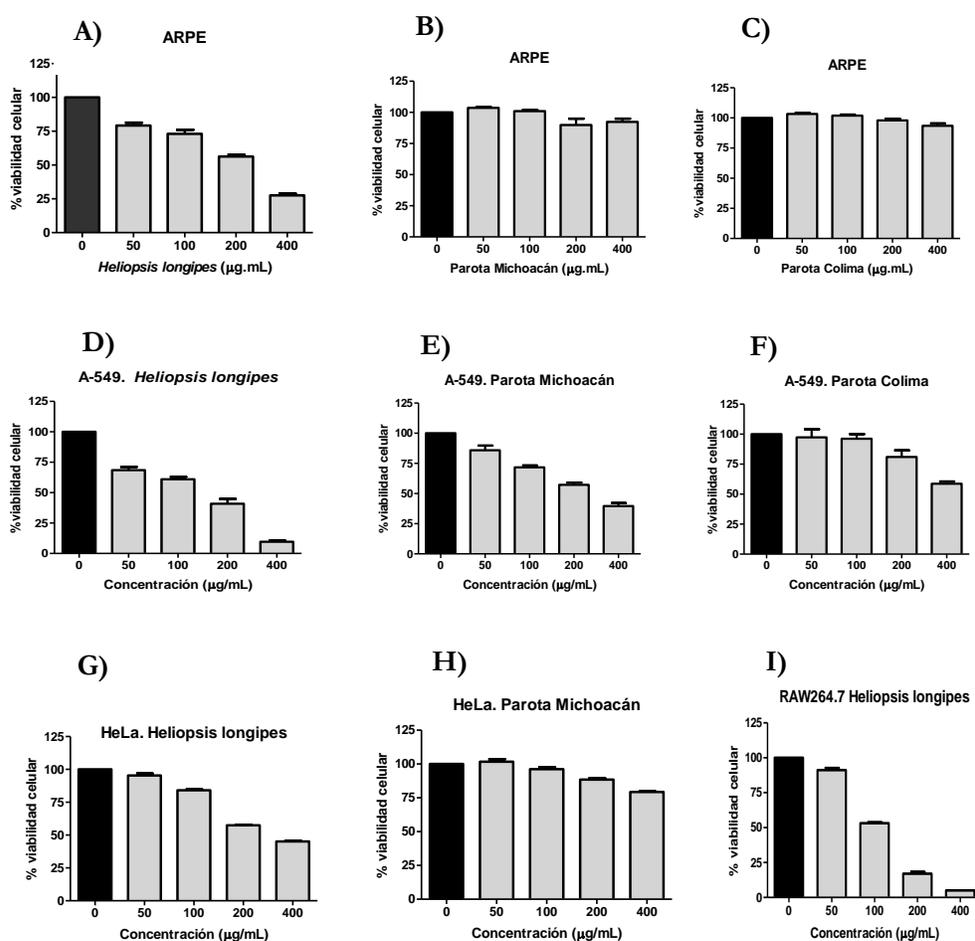


Figura 9. Actividad antiproliferativa de extractos de Parota y Chilcuague sobre cuatro líneas celulares. **A, B y C)** ARPE. **D, E y F)** A-549. **G y H)** HeLa. **D)** RAW264.7. La línea celular murina fue la única que se mantuvo en medio de crecimiento D10F a diferencia de las tres restantes que fue en D5F. Los tratamientos incluyen evaluación de extractos a diferentes concentraciones durante un periodo de incubación de 48 horas. Los resultados se obtuvieron de ensayos realizados por triplicado por medio de MTT y se expresan como % de viabilidad celular. En cada ensayo se utilizaron células control tratadas de la misma manera a excepción de las control que no se les aplicó estímulo (barra en color negro).

El extracto etanólico de *Heliopsis longipes* fue el único que presentó actividad antiproliferativa sobre ARPE (célula control), A-549 y HeLa (células humanas cancerosas) y RAW264.7 (línea celular murina). Se observó que el extracto de la raíz de esta planta no presentó selectividad, siendo la RAW264.7 la línea más afectada y provocando cambios sobre la célula normal utilizada en este estudio como control, ARPE. En estudios posteriores será interesante determinar la fase del arresto celular que provoca este extracto.

Como se puede observar en las imágenes de la figura 8, con una flecha negra se señalan los cambios morfológicos celulares más evidentes y para cada ensayo se muestran las células control mostrando integridad celular. Mediante las fotografías tomadas en el microscopio sobre las células se alcanza a detectar diversos cambios entre ellos la pérdida de pared celular, la formación de "blebs" y de cuerpos apoptóticos, siendo los cambios más fuertes para las tres líneas a 400 µg/ml (ARPE, A-549y HeLa), y de 200 µg/ml para RAW264.7. El IC₅₀ del extracto de chilcuague es de 247, 189, 158.11 y 95 µg/ml para las líneas celulares ARPE, A-549, HeLa y RAW264.7 respectivamente. Con base a estos valores y para fines de la evaluación de actividad antiinflamatoria en nuestro estudio, se decidió que la concentración máxima evaluada fuera 100 µg/ml.

Para el caso de los extractos de frutos de parota fueron menos agresivos en comparación con los de chilcuague. Presentaron mayor actividad citotóxica para A-549 y HeLa. Se observó diferencias entre la muestra de colectadas en Michoacán y la de Colima, siendo la primera con mayor actividad sobre las dos líneas celulares a 400 µg/ml. La línea ARPE, empleada como control no presentó afecciones. El IC₅₀ para la los frutos de parota de Michoacán sobre A-549 es de 297.04 µg/ml y para parota de Colima superior a 400 µg/ml.

Las interacciones que se generan a nivel celular ocasionados por estímulos de compuestos de origen natural y sintéticos provoca una serie de eventos bioquímicos complejos los cuales se pueden monitorear. Hablando específicamente de las saponinas, estos compuestos al ser agentes anfífilos (poseen un extremo hidrófobo e hidrofílico) interaccionan con los componentes celulares, dependiendo de su estructura y actividad biológica pueden provocar alteraciones, por ejemplo muerte celular mediante la activación de rutas proapoptóticas, efectos sobre las propiedades dinámicas de la membrana lipídica, agregación del colesterol, la formación evidente de agregados micelares, formación de complejos, permeabilización celular, necrosis, autofagia, hemólisis, entre otros (Podolak et al., 2010; Lorent et al., 2014).

Lamentablemente los efectos citotóxicos en su mayoría no son selectivos debido a su tendencia provocar alteraciones en la mayoría de células tanto cancerosas como líneas celulares control, este amplio espectro de actividad limita su aplicación como potente anticancerígeno. Esto se vio observado con el extracto de chilcuague, que no presento selectividad celular, caso contrario con frutos de parota, mismos que no causaron daños a la célula control utilizada.

Un amplio grupo de compuestos estudiados por su capacidad de generar cambios estructurales e irreversibles en la células son los compuestos pertenecientes a las saponinas. La presencia y longitud de la fracción polar en las saponinas unidas como cadenas de residuos de carbohidratos influyen sobre su actividad biológica (De Groot y Müller-Goymann (2016), y dentro del género de los agaves han sido caracterizadas ampliamente (Sidana et al., 2016).

Debido a que no se detectó actividad en los agaves no se descarta la idea de una pérdida de la actividad biológica de los extractos. Diversos estudios evalúan extractos obtenidos con diversos solventes o mediante el fraccionamiento guiado para su posterior evaluación por separado en un sistema biológico determinando las que presenten mayor actividad (Rascón-Valenzuela et al., 2015; Torres-Moreno et al., 2015; Sen et al., 2016).

Comparando los resultados obtenidos en esta investigación, un estudio desarrollado por Olivás-Aguirre et al. (2017) reportan nula actividad antiproliferativa de extractos liofilizados obtenidos de piña y papaya sobre RAW264.7, HeLa y L929, esto indica que incluso frutas ricas en fitoquímicos tampoco presentan actividad.

En este aspecto, en búsqueda por ampliar el conocimiento en el campo de las moléculas bioactivas y su métodos de manipulación por los métodos de laboratorio, extractos de diez plantas con antecedentes de bioactividad fueron analizados para determinar si los polímeros sintéticos utilizados en los procesos de purificación cromatográfica afectan su actividad biológica, Datta et al. (2013) monitorearon los cambios en la bioactividad sobre factores inducibles de hipoxia (HIF-1), y observaron que tres de los extractos disminuían su actividad cuando se utilizaba silica gel.

Como ya se describió anteriormente, en este estudio los extractos crudos no mostraron actividad, y por tal motivo se decidió precipitar las saponinas con un exceso de acetona como lo reporta Eskander et al. (2010), mismas que están presentes en los extractos de agave las cuales fueron evaluadas de la misma manera que los extractos crudos y los resultados tampoco se mostró actividad (las gráficas e imágenes no se presentan).

Actividad anti inflamatoria

El ensayo de actividad antiinflamatoria fue desarrollado empleando el reactivo de Griess y una curva de calibración fue previamente preparada a concentraciones conocidas. Los extractos de agaves y parota fueron evaluados a concentraciones que van de 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los agaves utilizados en esta prueba no presentaron actividad antiinflamatoria sobre las células RAW264.7 a las cuales previamente se les indujo inflamación mediante la adición de un lipopolisacárido bacteriano obtenido de *E. coli*. La figura 10 agrupa imágenes representativas de las células control, las células estimuladas con LPS y de la forma dendrítica que adquieren por el estrés generado, también de las muestras de agave y chilcuague. Mientras que el ensayo realizado a la placa que contenía las células por medio de MTT (estas incluían células control con y sin LPS, las estimuladas con agave y chilcuague) no mostró diferencias en la viabilidad celular (figura 11) comparada con las control indicando que los extractos a estas concentraciones no provocan muerte celular.

Por otra parte, el extracto de chilcuague fue la única muestra que presentó actividad antiinflamatoria del 63% a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respecto a las células tratadas con LPS.

Estos resultados concuerdan con los reportes que asocian compuestos presentes en la raíz del chilcuague como un analgésico potente, que incluso puede ser comparado con fármacos sintéticos. Como se mencionó anteriormente, no se detectó actividad antiinflamatoria en este reporte. Diferentes estrategias en su estudio deberán adoptarse en estudios posteriores.

RAW264.7

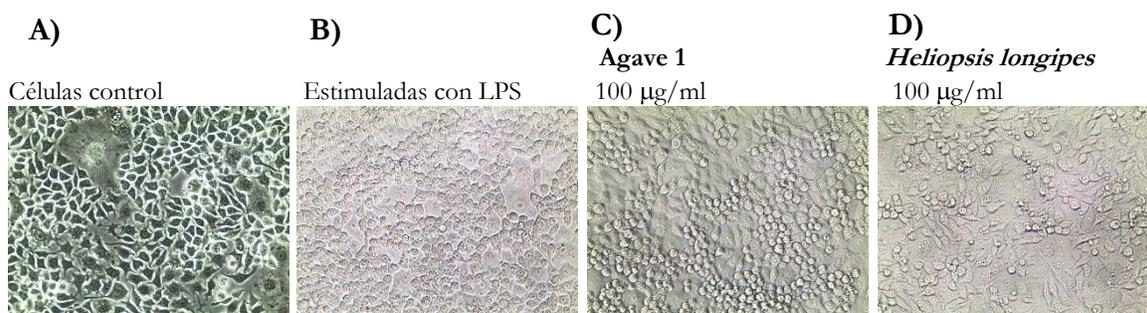


Figura 10. Actividad antiinflamatoria de extractos de agave y chilcuague sobre RAW264.7 con inflamación previamente inducida por lipopolisacáridos de *E. coli*. Se muestra microfotografías representativas tomadas a las 24 horas del ensayo desarrollado. Para el crecimiento de las células se utilizó medio D10F. **A)** Células control sin LPS ni estímulo. **B)** Células con LPS. **C)** Células con LPS y estímulo de extracto de agave. **D)** Células con LPS y estímulo de extracto de chilcuague. Para un mayor detalle de las condiciones de la evaluación, revisar el apartado 4.3 de este documento.

Con base a los resultados de este estudio, *heliopsis longipes* presentó actividad y citotóxica a diferentes concentraciones, mientras que los productos hidrolizados obtenidos de pencas de agaves no.

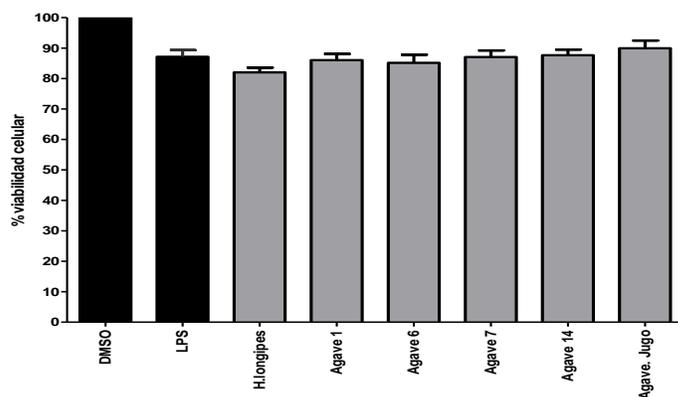


Figura 11. Viabilidad celular en ensayo antiinflamatorio con RAW264.7 a las 24 hrs previamente estimuladas con LPS.

Heliopsis longipes

Con respecto al género *Heliopsis*, en México se han identificado 14 especies y la mayoría son endémicas del país dentro de las cuales *Heliopsis longipes* representa una de las más utilizadas dentro de la herbolaria indígena.

El extracto alcohólico concentrado obtenido de chilcuague presentó actividad sobre las cuatro líneas celulares utilizadas, y la mayor actividad fue sobre la línea celular A-549 alcanzando la concentración inhibitoria (IC₅₀) más baja de este estudio con 95 µg/ml. Nuestros resultados difieren con los obtenidos por Gutierrez-Lugo et al. que emplearon la misma línea celular. En las imágenes documentadas se pueden observar los cambios morfológicos a las 24 horas que sufrieron las células al ser estimuladas con el extracto de chilcuague. Claramente se detectan cambios en la estructura, respecto a las células control que no fueron estimulada con extracto.

Sin embargo, la línea celular utilizada como control ARPE también fue afectada por el extracto. Solamente con el extracto etanólico de *Heliopsis longipes* se observaron cambios en morfología celular induce citotoxicidad sobre la línea A-549.

La afinina (N-isobutil-2E, 6Z, 8E -decatrienamida), es uno de los múltiples compuestos provenientes del metabolismo secundario que pertenece al grupo de las alcanidas y se encuentra mayoritariamente en las raíces de esta planta. Con un peso molecular de 221.18 gr/mol y una estructura lipídica es hasta ahora el componente bioactivo al que se le asocian diversas propiedades como anestésico local, actividades como bactericida, fungicida entre otros, y estudios recientes continúan detectando y ampliando el número de alcanidas menores que se encuentran en los tejidos de chilcuague (Molina et al., 1995; García-Chávez et al., 2004; Ríos et al., 2007; Cilia-López et al., 2008; López-Martínez et al., 2011).

El primer antecedente con evaluación biológica reportado de chilcuague fue desarrollado por Gutierrez-Lugo et al. (1996) en el cual evaluaron diferentes extractos crudos de plantas medicinales mexicanas incluido el chilcuague obtenido con un sistema de solventes de metanol-cloroformo, los ensayos consistieron en exponer el extracto sobre células de colon, adenocarcinoma de pecho y pulmón (HT-29, MCF-7 y A-549 respectivamente) y los resultados muestran que sobre ninguna línea celular se detectó actividad antiproliferativa a concentraciones menores de 1 mg/ml.

Respecto a la actividad antiinflamatoria, el extracto etanólico de chilcuague fue la única muestra que presentó estas dos actividades, y la actividad de los extractos evaluados fue observada y documentada a las 24 y 48 horas en microscopio invertido.

Por otra parte, Cariño-Cortés et al. (2010) analiza la actividad analgésica, genotóxica y toxicidad aguda en modelo *in vivo* con ratones macho adultos. Para el ensayo genotóxico se administraron de 3 a 100 mg/kg, y en las muestra de sangre no se detectaron daños.

García-Chávez et al. (2004) evaluaron el efecto en la acumulación de alcaloides en diversas localidades de Sierra Gorda separadas a 60 km, encontrando diferencias muy marcadas de hasta el 100 % más sobre la acumulación de fitoquímicos, esto se asocia probablemente a condiciones ambientales o a una domesticación de la planta, generando quizá variedades dentro de la especie.

Respecto a estas diferencias en resultados, diversos análisis moleculares, químicos y biológicos deberán desarrollarse para esclarecer y ampliar la información relacionada a la actividad citotóxica reportada en nuestro estudio, y determinar si los componentes bioactivos en las plantas pueden acumularse en diversas etapas del ciclo fisiológico de la planta.

La afinina es la principal molécula asociada con propiedades analgésicas, Ríos et al. (2007) determinaron esta actividad empleando bajas concentraciones de un extracto de chilcuague (10 µg/ml equivalentes a 61 pmol/ml) empleando diclorometano como solvente, se utilizaron cerebros obtenidos de un modelo murino analizando la liberación de GABA (en español Ácido gamma-aminobutírico), el principal neurotransmisor de tipo inhibitorio, ampliamente en el tejido nervioso central. Cilia-lópez et al., (2010) en el estudio con ratones adultos determinó que la afinina es una molécula que desempeña dicha actividad analgésica, incluso en su estudio lo asocia con una actividad similar a la del ketorolaco, un potente antiinflamatorio, y también con efectos estimulantes comparado con la cafeína.

Nuestro estudio es el primer reporte en el que se detecta actividad citotóxica y a la vez antiinflamatoria del extracto concentrado de chilcuague. Debido a que en la metodología el análisis se realizó de un extracto crudo se vuelve complicado poder atribuir la actividad citotóxica a alguna molécula, en estudios posteriores será conveniente particionar el extracto crudo mediante la obtención de fracciones y evaluarlas por separado que junto con una determinación analítica y ensayos biológicos precisar los componentes de cada fracción y principales moléculas asociadas con actividad.

A nivel global, los desarrollos científicos que emplean nuevas estrategias en la investigación de agentes químicos provenientes de fuentes naturales con actividades biológicas promueven el uso de técnicas más sofisticadas para su identificación, enriquecimiento, síntesis y determinación de compuestos bioactivos o citotóxicos, incluso hasta lograr el diseño de moléculas híbridas.

Hasta la fecha, se ha observado un incremento gradual con base en análisis bioinformáticos relacionados con la estructura-actividad de moléculas bioactivas, siendo un importante avance científico que promete obtener un mayor conocimiento para entender progresivamente el grave problema de salud pública; el cáncer, promoviendo así la creación y funcionamiento de potentes agentes citotóxicos que sean específicos para líneas celulares cancerosas, entre otras características (Shaveta et al., 2016; Akhtar et al., 2017; Akhtar et al., 2017a; Jian et al., 2018; Scepankova et al., 2018).

Con base en los resultados obtenidos del análisis fitoquímico del extracto de chilcuague, se determinó por el método de Folin-Ciocalteu que el extracto contiene una considerable cantidad de fenoles, grupo de compuestos que hasta la fecha no se han caracterizados. No se descarta que los probables compuestos bioactivos presentes en chilcuague pertenezcan a este grupo de metabolitos secundarios y que solos o en sinergia con otras moléculas presentes en el extracto sean los responsables de los daños ocasionados a las célula evaluadas en este estudio. Se sugiere el estudio de este grupo de compuestos para un mayor conocimiento de los componentes químicos presentes en la raíz.

Actividad biológica de moléculas presentes en tejidos de agaves

En base a revisión de literatura, a continuación se mencionan las moléculas que han sido encontradas en diversos tejidos de especies de agaves demostrando actividades biológicas sobre líneas celulares y ensayos antioxidante. Es basta la cantidad que corresponden principalmente a fenoles, saponinas y sapogeninas por ejemplo, hecogenina, esmilagenina, clorogenina, gitogenina, tigogenina, sarsapogenina, Cantalasonina-1, Chlorgenina. Y fenólicos pertenecientes al grupo de las homoisoflavonas, flavonoles, glucósidos de kaempferol entre otras (Almaraz-Abarca et al., 2013; Santos-Zea et al., 2016). En particular, Monterrosas-Brisson et al. (2013) reportan actividad antiinflamatoria de extractos de hojas obtenidos con acetona a partir de hojas de *Agave tequilana*, *A. angustifolia* y *A. americana*, demostrando que para los dos primeros agaves la respuesta a la actividad depende de la dosis de la molécula cantalasonina-1, siendo el primer reporte para estas especies y con previos reportes en la familia Agavaceae (Tinto et al., 2005). Para el caso de *A. americana* se asocia a una mezcla variada de sapogeninas (como hecogeninas y tiogeninas) mostrando en general una mayor actividad en esta especie. La lista de moléculas anteriormente mencionadas son las que participan directamente en las actividades biológicas reportadas en agaves, probablemente en etapas adultas las concentraciones sean menores o que el tratamiento térmico es demasiado agresivo y la actividad biológica disminuya. En este estudio sólo se pudo observar que las especies presentan considerables concentraciones de fenoles y saponinas, sin embargo no se debería descartar en trabajos posteriores la purificación de compuestos para su evaluación en células.

Enterolobium cyclocarpum

Existe muy poca información con base en el estudio de popularmente conocido como parota. Ojeda et al. (2015) detectaron mediante pruebas químicas cualitativas la presencia de esteroides, fenoles totales, saponinas, terpenoides y taninos en la parota. Las pruebas realizadas en nuestro estudio, demuestran una considerable cantidad de fenoles detectados por Folin-Ciocalteu en los frutos (ver figura 3 inciso F y G), mientras que las prueba para saponinas y actividad antioxidante por DPPH fueron positivas (estos dos últimos datos no se muestran).

El único reporte documentado respecto a la evaluación de extractos sobre líneas celulares es el desarrollao por Sowemino et al. (2015), determinaron actividad citotóxica sobre células HeLa y MCF7 con un IC₅₀ de 2.07 y 11.84 µg/ml respectivamente a partir de las hojas de la planta. El mecanismo de acción reveló un arresto celular en fase G₂/M, asociada con una translocación de fosfatidilserina en ambas líneas celulares. Con base en este antecedente citotóxico y a las bajas concentraciones reportadas, para esta investigación se decidió analizar el fruto de la planta.

VI. Conclusiones

Esta investigación es el primer reporte que estudia extractos de hojas de agaves adultos las cuales fueron sometidas a un proceso de hidrólisis por calor, y junto con un análisis biológico *in vitro* con células cancerosas la evaluación de los extractos. Basado en nuestros resultados se obtuvo un panorama general que aporta información relevante sobre la acumulación de metabolitos en agaves determinando que el jugo hidrolizado de las pencas contiene compuestos fitoquímicos en etapas adultas, y el consumo de esta bebida contribuye con una fuente de fitoquímicos destacando sapogeninas y compuestos fenólicos, además de actividad antioxidante. También se comprobó que se conservan una importante concentración después del proceso de cocción. Sin embargo, los antecedentes en base a observaciones empíricas de que es un auxiliar para combatir el cáncer no fue demostrado científicamente en este estudio, ya que ninguno de los agaves presentó actividad antiproliferativa o antiinflamatoria en esta primera etapa de evaluación sobre líneas celulares. Con estos resultados todavía es complicado dar una respuesta contundente con base a si el tratamiento térmico sobre los probables compuestos bioactivos es desfavorable, se sugieren estudios posteriores para confirmar esta hipótesis. En etapas posteriores se recomienda ampliar y diversificar el panel celular, realizar una partición del extracto mediante procesos de purificación cromatográfica e identificar compuestos ya reportados por presentar actividades biológicas para demostrar si esta bebida debe ser promovida como auxiliar en tratamientos de cáncer o inflamación.

Estos resultados son un avance importante en el estudio de especies de plantas mexicanas que presentan un amplio uso tradicional, y se establece un antecedente en su estudio y que con ello se gestan nuevas hipótesis respecto a los compuestos bioactivos o aplicaciones que pudieran desempeñar. Continuidad en su estudio y aplicación de tecnologías de investigación más recientes serán convenientes para detectar a mayor profundidad moléculas con interés farmacológico presentes en las especies estudiadas.

Por otra parte, el extracto etanólico de las raíces de *Heliopsis longipes* por primera vez fue identificado como una raíz con actividad citotóxica sobre líneas celulares estudiadas y con un campo inexplorado sobre compuestos fenólicos que contiene. Al igual que con el producto hidrolizado de agave y los frutos de parota, estudios posteriores deben ser realizados para determinar el mecanismo de acción específico de las moléculas responsables de actividades biológicas y un perfil acerca de la caracterización química.

VII. Literatura citada

- AGARED, (2017). *Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México*. Guadalajara México. ISBN: 978-607-97548-5-3. CONACYT, CIATEJ, AGARED.
- Aggarwal, B.B., Vijayalekshmi, R.V., y Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research*. 15:425-430.
- Ahumada-Santos, Y.P., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M., Díaz-Camacho, S.P., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, J.A., Heredia, J.B. 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.
- Akhtar, M. J. Yar, M. S., Khan, A. A., Ali, Z. y Haider, M. R. (2017). Recent advances in the synthesis and anticancer activity of some molecules other than nitrogen containing heterocyclic moieties. *Mini-Reviews Medicinal Chemistry*. 17:1602–1632.
- Akhtar, J., Khan, A. A., Ali, Z., Haider, R. y Yar, M. S. (2017a) Structure-Activity relationship (Sar) study and design strategies of nitrogen-containing heterocyclic moieties for their anticancer activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 125:143–189
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E.A., Hernández-Vargas, V., Ortega-Chávez, M., Orea-Lara, G., Cifuentes-Díaz de León, A., Ávila-Reyes, J.A. y Muñoz-Martínez, R. (2009). Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences*.6:1076-1085.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E.A., Ávila-Reyes, J.A., Uribe-Soto, J.N., y González-Valdez, L.S. (2013). The phenols of the genus Agave (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 4:9-16.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 73:239-244.
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Anderson, S.B. y Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. 72:435-457.
- Baccou, J.C., Lambert, F., y Sauvaire, Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. *Analyst*. 102:458-465.
- Bianchi, E. y Cole, J.R. (1969). Antitumor agents from *Agave schottii* (Amaryllidaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58:589-591.
- Brand-Williamns, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 28:25-30.
- Cariño-Cortés, R., Gayosso-De-Lucio, J.A., Ortiz, M.I., Sánchez-Gutiérrez, M., García-Reyna, P.B., Cilia-López, V.G., Pérez-Hernández, N., Moreno, E. y Ponce-Monter. H. (2010). Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 130:216-221.
- Chen, P.Y., Chen, C.H., Kuo, C.C., Lee, T.H., Kuo, Y.H. y Lee, C.K. (2011). Citotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. *Planta medica*. 77:929-933.
- Chen, L. y Kang, Y.-H. (2013). Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annum* L.) stalk extracts: Comparison of pericarp and placenta extracts. *Journal of Functional Foods*. 5:1724-1731.

- Cheok, C.Y., Salman, H.A.K., y Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*. 59:16-40.
- Cilia-López, V.G., Aguirre-Rivera, J.G., Reyes-Agüero, J.A. y Juárez-Flores, I. (2008). Ethnobotánica de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 83:81-87.
- Cilia-López, V.G., Juárez-Flores, B.I., Aguirre-Rivera, J.G. y Reyes-Agüero, J.A. (2010). Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharmaceutical Biology*. 48:195-200.
- Cordell, G.A. (2014). Phytochemistry and traditional medicine – The revolution continues. *Phytochemistry Letters*. 10:28-40.
- Datta, S., Zhou, Y.D. y Nagle D.G. (2013). Comparative study of chromatographic medium-associated mass and potential antitumor activity loss with bioactive extracts. *Journal of Natural Products*. 76:642-647.
- Dewick, P.M. (2002). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Second edition, New York: Wiley.
- De Groot, C. y Müller-Goymann, C.C. (2016). Saponin interactions with model membrane systems – langmuir monolayer studies, hemolysis and formation of ISCOMs. *Planta Medica*. 82:1496-1512.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathologic*. 35:495-516.
- Escalante, A., López. D.R., Velázquez, J.E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F. y López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage: historical microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*. 7:1-18.
- Escobedo-Martínez, C., Guzmán-Gutiérrez, S.L., Hernández-Méndez, M.M., Cassani, J., Trujillo-Valdivia, A., Orozco-Castellanos, L.M., y Enríquez R.G. (2017). *Heliopsis longipes*: anti-arthritis activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. *Pharmaceutical Biology*. 27:214-219.
- Eskander, J., Lavaud, C. y Harakat, D. (2010). Steroidal saponins from the leaves of *Agave macroacantha*. *Fitoterapia*. 81:371-374.
- Figueredo, C. J., Casas, A., Martínez-díaz, Y., Santos-Zea, L. y Gutiérrez-Uribe J. A. (2018). Domestication and saponins contents in a gradient of management of agaves: *Agave cupreata*, *A. inaequidens* and *A. bookeri* in central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 65:1133-1146.
- Figuroa, L.M., Santos-Zea, L., Escalante, A. y Gutiérrez-Uribe, J.A. (2016). Mass spectrometry-based metabolomics of Agave sap (*Agave salmiana*) after its inoculation with microorganisms isolated from Agave sap concentrated selected to enhance anticancer activity. *Journal of Food Composition and Analysis*. 45:113-120.
- Floegel, A., Kim, D-O., Chung, S.J., Koo, S.I. y Chun, A.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:1043-1048.
- García-Chávez, A., Ramírez, E. y Molina-Torres, J. (2004). El género *Heliopsis* (Heliantheae; asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. *Acta Botanica Mexicana* 69:115-131.
- García-Mendoza, A.J., 2004. Agaváceas. En: A.J. García –Mendoza, M. J. Ordóñez y M.Briones (eds). *Biodiversidad de Oaxaca*. Universidad Autónoma de Oaxaca. Instituto de Biología. UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. México. pp 159-169.
- García-Mendoza, A.J. 2007. Los agaves de México. Ciencias-Universidad Nacional Autónoma de México. 87:14–23

- García, M.D., Quílez, A.M., Sáenz M.T., Martínez-Domínguez, M.E. y de la Puerta, R. (2000). Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. And *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 71:395-400.
- Garocica, P., Chávez, R., Lascurain, R., Espinosa, M. y Zenteno, E. (1999). Óxido nítrico, una molécula multifuncional *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 12:300-304.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Mered, M. y Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. 327:656-661.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of continental orth America*. The University of Arizona Press, Tucson. 670.
- Gutiérrez-Lugo, M.T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramírez-Gama, R.M., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from mexican medicinal plants. *Phytomedicine*. 2:341-347.
- Hamissa, A.M. Ben., 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*. 90:17-21.
- Hernández, I., Márquez, L., Martínez, I., Dieguez, R., Delporte, C., Prieto, S., Molina-Torres, J., y Garrido, G. (2009). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 124:649-652.
- Hernández-Valle, E., Herrera-Ruiz, M., Salgado, G., Zamilpa, A., Arenas, M.L., Jiménez, A., Tortoriello, J. y 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.
- Hiai, S., Oura, H., y Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta medica*. 29:116-122.
- Houghton, P. J. (2000). Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. *Phytotherapy Research*. 14:419-423.
- Islami, F., (2018). Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68:31-54.
- Jian, B., Zhang, H., Han, C. y Liu, J. (2018). Anti-cancer activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischerina* Steud. *Molecules*. 23:1-11.
- Khazir, J., Ahmad Mir, B., Pilcher, L. y Riley, D. (2014). Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters*. 7:173-181.
- Knowles M.A. y Selby, P.J. (2005). *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Oxford University. New York, USA. Oxford University.
- Leal-Díaz, A.M., Santos-Zea, L., Martínez-Escobedo, H.C., Guajardo-Flores, D., Gutiérrez-Urbe, J.A. y Serna-Saldivar, S.O. (2015). Effect of *Agave americana* and *Agave salmiana* ripeness on saponin content from aguamiel (Agave sap). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63:3924-3930.
- Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P. y Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 93:370-375.
- Liu, F., Zhang, X., Ling, P., Liao, J., Zhao, M., Zhao, M., Mei, L.,...Wang, F. (2017). Immunomodulatory effects of xanthan gum in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Carbohydrate Polymers*. 169:65-74.

- López-Romero, J.C., Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., Peña-Ramos, E.A. y González-Rios, H. (2017). Biological activities of *Agave* by-products and their possible application in food and pharmaceuticals. *Science of Food and Agriculture*. 7:2461-2474.
- López, M.G. y Mancilla-Margalli. N.A. (2007). The nature of fructooligosaccharides in agave plants. *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*. ISBN: 81-308-0146-9 Pag.47-67.
- López-Lomelí, L. (2016). Produce y comercializa raicilla y jugo hidrolizado de agaves. Comunicación personal.
- López-Martínez, S., Aguilar-Guadarrama, A., Yolanda-Ríos, M. (2011). Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochemistry Letters*. 4:275–279
- López-Velázquez, G., Parra-Ortiz, M., De la Mora-De la Mora, I., García-Torres, I., Enríquez-Flores, S., Alcántara-Ortigoza, M. A., González-del Angel, A., Velázquez-Aragón, J., Ortiz-Hernández, R., Cruz-Rubio, J. A., Villa-Barragán, P., Jiménez-Gutiérrez, C. y Gutiérrez-Castrellón, P. (2015). Effects of fructans from Mexican agave in newborns fed with infant formula: A randomized controlled trial. *Nutrients*. 7:8939-8951.
- Lorent, J.H., Quetin-Leclercq, J. y Mingeot-Leclercq, M.P. (2014). The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 38:43-50.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L. y Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponin as anti-cancer agents. *Fitoterapia*. 81:703-714.
- Mancilla-Margalli, N.A. y López, M. G. (2002). Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var, azul. *Fitoterapia*. 81:703-714.
- Martínez-Silva, L.M.E., Méndez-Sotelo, A.C., Jauregui-Pérez, L.J., Mendoza-Mata, J.P. y García-Vieyra, M.I. (2016). Estrategias naturales para combatir a *Melanaphis sacchari* en cultivos de *Sorghum vulgare* en el bajo. *Verano de la Investigación Científica*. 2:1460-1464.
- Mahr, D. (2015). Production of artisanal Mezcal, Tequila's sassy little sister. *Cactus and Succulents Journal*. 87:4-14.
- Meneses-Sagrero, S.E., Navarro-Navarro, M., Ruiz-Bustos, E., Del-Toro-Sánchez, C.L., Jiménez-Estrada, M. y Robles-Zepeda, R.E. (2017). Antiproliferative activity of spinasterol isolated of *Stegnosperma balimifolium* (Benth, 1844). *Saudi Pharmaceutical Journal*. 25:1137-1143.
- Michel-Cuello, C., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R. y Pinos-Rodríguez, J. M. (2008). Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of mezcal agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:5753-5757.
- Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia R. y Ramírez-Chavez, E. (1995). Presence of the bornyl ester of deca-2E,6Z,8E-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Natural Products*. 58:1590-1591.
- Monterrosas-Brisson, N., Arenas-Ocampo, M.L., Jiménez-Ferrer, E., Jiménez-Aparicio, A.R., Zamilpa, A., Gonzalez-Cortazar, M., Tortoriello, J. y Herrera-Ruiz, M. (2013). Anti-inflammatory activity of different agave plants and the compound Cantalalaponin-1. *Molecules*. 18:8136-8146.
- Morales-Serna, J.A., Jiménez, A., Estrada-Reyes, R., Márquez, C., Cárdenas J. y Salmón, M. (2010). Homoisoflavanones from *Agave tequilana* Weber. *Molecules*. 15:3295:3301

- Muñiz-Márquez, D.B., Contreras, J.C., Rodríguez, R., Mussatto, S.I., Wong-Paz, J.E., Teixeira, J.A. y Aguilar, C.N. (2015). Influence of thermal effect on sugars composition on Mexican agave syrup. *CyTA - Journal of Food*. 13:607-612.
- Murillo-Alvarado, P.E., Santibañez-Aguilar, J.E., Ponce-Ortega, J.M., Castro-Montoya, A.J., Serna-González, M. y El-Halwagi, M. (2014). Optimization of the supply chain associated to the production of bioethanol from residues of Agave from the tequila process in Mexico. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 53:5524-5538.
- Nasri, S. y Salem, B. (2012). Effect of oral administration of *Agave Americana* or Quillaja saponaria extracts on digestion and growth of Barbarine female lamb. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 53:5524-5538.
- Naturalista. (2012). Enterolobium cyclocarpum. <http://www.naturalista.mx/taxa/52440-Enterolobium-cyclocarpum>. Revisado el 03/06/2018.
- Nava-Cruz, N.Y., Medina-Morales, M.A., Martínez, J.L., Rodríguez, R. y Aguilar C.N. (2015). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 35:546-559.
- Nobel, P. S. (1977). Water relations of flowering of *Agave deserti*. *The University of Chicago*. 138:1-6.
- Nguyen, Q.T., Merlo, M.E., Medema, M.H., Jankevics, E., Breitling, R. y Takano, E. (2012). Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. *FEBS Letters*. 586:2177-2183.
- Odjegba, V. J. y Alokolaro, A. (2013). Simulated drought and salinity modulates the production of phytochemicals in *Acalypha wilkesiana*. *Journal of Plant Studies*. 2:105-112.
- Ojeda, Á., Obispo, N., Gil, J. L. y Matute, I. (2015). Perfil cualitativo de metabolitos secundarios en la fracción comestible de especies leñosas seleccionadas por vacunos en un bosque caducifolio. *Journal of Ethnopharmacology*. 1:64-72.
- Olivas-Aguirre, F.J., González-Aguilar, G.A., Velderrain-Rodríguez, G.R., Torres-Moreno, H., Robles-Zepeda, R.E., Vázquez-Flores, A.A., de la Rosa, L.A. y Wall-Medrano, A. (2017). Radical scavenging and anti-proliferative capacity of three freeze-dried tropical fruits. *International Journal of Food Science + Technology*. 52:1699-1709.
- Olvera-García, V., Granado-Serrano, A.B., Jove, M., Cassanye, A., Cardador-Martínez, A., Portero-Otín, M. y Serrano, J. (2017). Characterization of antioxidant properties and metabolite profile of *Agave atrovirens* extracts. *BioRxiv*. 1-16.
- OMS, (2018). Cáncer. <http://www.who.int/topics/cancer/es/>. Consultado 01/06/2018.
- Paulino, N., Lemos, S.R., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Scremin, A. y Bretz, W.A. (2008). Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of Pharmacology*. 587:296-301.
- Peana, A.T., Moretti, M.D., Manconi, V., Desole, G., y Pippia, P. (1997). Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponins of *Agave americana*. *Planta Medica*. 63:199-202.
- Pinos-Rodríguez, J.M., Zamudio, M. y González, S. S. (2008). The effect of plant age on the chemical composition of fresh ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African Journal of Animal Science*. 38:43-50.
- Pinos-Rodríguez, J.M., Aguirre-Rivera, J.R., García-López, J.C., Rivera-Miranda, M.T., González-Muñoz, S., López-Aguirre, S. y Chávez-Villalobos, D. (2006). Use of "Magüey" (*Agave salmiana* Otto ex. Salm-Dick) as forage for ewes. *Journal of Applied Animal Research*. 30:101-107.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. y Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 5:1142-1145.

- Podolak, I., Galanty, A. y Sobolewska, D. (2010). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*. 9:425-474. Pan, L., Chai, H. y Kinghorn, A.D. (2011). The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochemistry Letters*. 3:1-8.
- Praznik, W., Löppert, R., y Huber, A. (2007). Analysis and molecular composition of fructans from different plant sources. *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*. (1st ed., 93–117). Kerale: Research Signpost.
- Puente-Garza, C.A., Gutiérrez-Mora, A. y García-Lara, S. (2015). Micropropagation of *Agave salmiana*: Means to production of antioxidant and bioactive principles. *Frontiers in Plant Science*. 6:1-9.
- Puente-Garza, C.A., Meza-Miranda, C., Ochoa-Martínez, D. y García-Lara, S. (2017). Effect of *in vitro* drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 115:400-407.
- Puente-Garza, C.A., García-Lara, S., Gutiérrez-Urbe, J.A. (2017a). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops and Products*. 105:225-230.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 6:1720-1731.
- Raftery, D. (2014). *Mass Spectrometry in Metabolomics. Methods and protocols*. Whashington, USA. Humana Press
- Rascón-Valenzuela, L., Velázquez, C., Garibay-Escobar, A., Medina-Juárez, L.A., Vilegas, W. y Robles-Zepeda, R.E. (2015). Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *Journal of Ethnopharmacology*. 171:280-286.
- Reiffová, K., y Nemcová, R. (2006). Thin-layer chromatography analysis of fructooligosaccharides in biological samples. *Journal of Chromatography A*. 1110: 214-221.
- 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: 1231-1237.
- Ríos, M.Y., Aguilar –Guadarrama, A.B. y Gutiérrez, M.C. (2007). Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*. 110:364-367.
- Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-UI-Haq. Y Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of *Agave attenuate*. *International Journal of Molecular Sciences*. 13:6440-6451.
- Sáenz, M.T., García, M.D., Quilez, A. y Ahumada, C. (2000). Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) *Phytotherapy Research*. 14:552-554.
- Santiago-García, P.A., Mellado-Mojica, E., León-Martínez, F.M. y López, M.G. (2017). Evaluation of *Agave angustifolia* fructans as fat replacer in the cookies manufacture. *LWT. Food Science and Technology*. 77:100-109.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A.M., Cortés-Ceballos, E., y Gutiérrez-Urbe, J.A. (2012). Agave (*Agave* spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Current Bioactive Compounds*. 8:1-14.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A.M., Jacobo-Velázquez, D.A., Rodríguez-Rodríguez, J., García-Lara, S. y Gutiérrez-Urbe, J.A. (2016a). Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*. 45:113-120.
- Santos-Zea, L., Fajardo-Ramírez, O.R., Romo-López, I., y Gutiérrez-Urbe, J.A. (2016b). Fast centrifugal partition chromatography fractionation of concentrated agave (*Agave salmiana*) sap to obtain saponins with apoptotic effect on colon cancer cells. *Plant Foods Human Nutrition*. 71:57-63.

- Santos-Zea, L., Rosas-Pérez, A.M., Leal-Díaz, A.M., y Gutiérrez-Urbe, J.A. (2016c). Variability in saponin content, cancer antiproliferative activity and physicochemical properties of concentrated agave sap. *Journal of Food Science*. 81:2069-2075.
- Sarker, S.D. y Nahar, L. (2012). *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*. Wolverhampton, UK. Humana Press.
- Saxena, R.K., Vallyathan, V. y Lewis, D.M. (2003). Evidence for lipopolysaccharides-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic cells. *Journal of Biosciences*. 28:129-134.
- Sen, A., Ozbas, S. y Bitis, L. (2016). Bioactive-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. *LWT. Farmaceutical Biology*. 1:541-546.
- Scepankova, H., Martins, M., Estevinho, L., Delgadillo, I. y Saraiva, J. A. (2018). Enhancement of bioactivity of natural extracts by non-thermal high hydrostatic pressure extraction. *Plant Foods for Human Nutrition*. 73:253-267.
- Shahidi, F. y Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*. 18:820-897.
- Shaveta., Mishra, S. y Singh, P. (2016). Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 124:500-536.
- Sidana, J., Singh, B. y Sharma, O. P. (2016). Saponins of *Agave*: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*. 130:22-46.
- Siegel, R., Miller, D. y Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 67:74-30.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*. 16:144–158.
- Silvera, K., Neubig, K.M., Whitten, W.M., Williams, N.H., Winter, K., y Cushman, J.C. (2010). Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. *Functional Plant Biology*. 37:995–1010.
- Simmons-Boyce, J.L. y Tinto, W.F. (2007). Steroidal saponins and sapogenins from the Agavaceae family. *Natural Product Communications*. 2:99-114.
- Simcha, L. Y. (2017). How monocarpic is Agave?. *Flora*. 230:12-13
- Sowemimo, A., Venables, L., Odedeji, M., Koekemoer, T., Van de Venter, M. y Hongbing, L. (2015). Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 159:257-261.
- Sparg, S.G., Light, M.E. y van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94:219-243.
- Srivastava, V., Negi, A., Kumar, J. K., Gupta, M. y Khanuja P. S. (2005). Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 13:5892–5908.
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R.W. y Villanueva, A. (2012). MTT assay for the cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*. 114:785-796.
- Steward, J.R. (2015). Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. *Frontiers in Plant Science*. ISSN: 1664-462X.

- Stone, W.L., Yang, H. y Qui, M. (2006). Assays for nitric oxide expression. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 315:296-301.
- Suárez-González, E. M., Palmeros-Suárez, P. A., Cruz-Rubio, J. M., Martínez-Gallardo, N. A., Cisneros, I., Délano-Frier, J. P. y Gómez-Leyva, J. F. (2016). Differential fructan accumulation and expression of fructan biosynthesis, invertase and defense genes is induced in *Agave tequilana* plantlets by sucrose or stress-related elicitors. *Agri Gene*. 2:17-28.
- Tinto, W.F., Simmons-Boyce, J.L., McLean, S. y Reynolds, W.F. (2005). Constituents of *Agave americana* and *Agave barbadensis*. *Phytochemical communication*. 76:594-597.
- Torres-Moreno, H., Velázquez, C.A., Garibay-Escobar, A., Curini, M., Marcotullio, M.C., y Robles-Zepeda, R.E. (2015). Antiproliferative and apoptosis induction of cucurbitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Industrial Crops and Products*. 77:895-900.
- Valenzuela-Zapata, A.G., López-Muraira, I. y Gaytán, M.S. (2011). Traditional knowledge, *Agave inaequidens* (Koch) conservation, and the charro lariant artisans of San Miguel Cuyutlán, México. *Ethnobiology Letters*. 2:72-80.
- Viñas, G., Puig, T. y Porta, R. (2012). Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina Clínica*. 139:171-175.
- Wink, M. (2016). Secondary metabolites, the role in plant diversification. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. 4:1-9.
- Winter, K., and Smith, J.A.C. (1996). An introduction to crassulacean acid metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. *Crassulacean Acid Metabolism*, eds K. Winter and J. A. C. Smith (Berlin; Heidelberg: Springer), 1-13
- Yokosuka, A. y Mimaki, Y. (2009). Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*. 70:807-815
- Zamora, C., Juárez, B.I., Aguirre, J.R., Ortiz, D., Godínez, C.I. y Álvarez, G. (2010). Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey mezcalero potosino. *e-Gnosis*. 8:1-11.

ANEXOS

Como parte de una formación académica continua e integral, a continuación se adjuntan las constancias y reconocimientos oficiales obtenidos durante la maestría por la participación en cursos, simposios y ponencias en diversos proyectos en los que paralelamente se trabajó.

Julio 2016. 8 Simposio Internacional de Fructanos



CERTIFICATE

The Organizing Committee of the 8th International Fructan Symposium (IFS2016) certifies that the authors **Alejandro Ángeles Espino, Hilda Eréndira Dimas Estrada, David Ramírez Alvarado, José M. Cruz Rubio, Paola A. Palmeros Suárez, and Juan F. Gómez-Leyva** presented the work entitled:

“Induction in Biosynthesis of Fructan in Mutants Plantlets of *Agave tequilana* Induced with Gamma Rays Co60”

This event was held in Oaxaca, Mexico, from June 26 to July 1, 2016.

Cordially,

Mercedes G. López
Cinvestav-Irapuato
Organizing Committee

Agustín López-Munguía
IBT-UNAM
Organizing Committee

Agosto 2016. Curso de fitoquímica y cultivo de tejidos vegetales



Mayo 2018. Conferencia en Instituto Tecnológico Superior de Puruándiro (ITESP)



Febrero 2018. Evento Nacional Estudiantil de Innovación Tecnológica (ENEIT)



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

EL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Y EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TLALNEPANTLA
OTORGAN EL PRESENTE

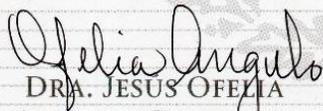
DIPLOMA

A

DAVID RAMIREZ ALVARADO

POR HABER OBTENIDO EL TERCER LUGAR
DE LA CATEGORÍA PRODUCTO/SERVICIO
PRESENTANDO EL PROYECTO NANOFILM, EN EL
EVENTO NACIONAL ESTUDIANTIL DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA 2017
ETAPA NACIONAL
CELEBRADO DEL 13 AL 16 DE FEBRERO

TLALNEPANTLA DE BAZ, ESTADO DE MÉXICO A 16 DE FEBRERO DE 2018


DRA. JESÚS OFELIA
ANGULO GUERRERO

SECRETARIA DE EXTENSIÓN Y
VINCULACIÓN



DR. GUSTAVO FLORES
FERNÁNDEZ
DIRECTOR DEL IT DE
TLALNEPANTLA



Agosto 2018. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología.



XX CONGRESO INTERNACIONAL
XLV CONGRESO NACIONAL
de la Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.
XXXV SEMANA DEL PARASITÓLOGO UAAAN



La Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.
otorga la siguiente

CONSTANCIA

a

Norma Yadira Zacamo-Velázquez, Ramona Guadalupe Garcia-Gonzalez, Javier Ireta-Moreno, David Ramírez-Alvarado y Juan Florencio Gómez-Leyva

Por su participación con la presentación oral:

IDENTIFICACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE NEMATODOS ENQUISTADOS ASOCIADOS A MAIZ EN JALISCO. [Morphological and molecular identification of cyst corn nematodes associated in Jalisco].

del 20 al 24 de agosto 2018
Saltillo, Coahuila, México

Dr. Eduardo R. Garrido Ramírez
Presidente de la Mesa Directiva 2016-2018



Agosto 2018. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología.



XX CONGRESO INTERNACIONAL

XLV CONGRESO NACIONAL
de la Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.

XXXV SEMANA DEL PARASITÓLOGO UAAAN

La Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.
otorga la siguiente

CONSTANCIA

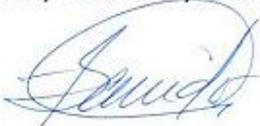
a

Ramona Guadalupe García-González, Javier Ireta-Moreno,
Norma Yadira Zacamo-Velázquez, Juan Florencio Gómez-
Leyva, David Ramirez-Alvarado

Por su participación con la presentación oral:

**IDENTIFICACION MOLECULAR DE NEMATODOS
FILIFORMES ASOCIADOS AL CULTIVO DE MAIZ EN
JALISCO.** [Molecular identification of filiform nematodes associated
with corn culture in Jalisco].

**del 20 al 24 de agosto 2018
Saltillo, Coahuila, México**



Dr. Eduardo R. Garrido Ramírez
Presidente de la Mesa Directiva 2016-2018





Otorgan la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **CARTEL**:

**Compuestos fenólicos y actividad antimicrobiana
en agaves mezcaleros de Oaxaca**

Realizado por:

Juan Florencio Gómez Leyva

Lorena Belén Terrazas Galindo | Judith Ruiz Luna | Vicente Arturo Velasco Velasco
David Ramírez Alvarado | Evangelina E. Quiñones Aguilar

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.

Realizado los días 3,4 y 5 de Octubre del presente
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Gabriel Rincón Enríquez
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Acevedo Hernández
CUCI

Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
CUCBA

Dr. Saúl Fraire Velázquez
COORDINADOR DE LA RED

Año 2018



Otorgan la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **PONENCIA**:

Caracterización de los fructanos y enzimas relacionadas a su biosíntesis en dos ecotipos de *Agave salmiana*

Realizado por:

Juan Florencio Gómez Leyva

José Manuel Cruz Rubio | Paola A. Palmeros Suárez | David Ramírez Alvarado
Silvia E. Valdés Rodríguez | Armando Guerrero Rangel | John P. Délano Frier

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE

Realizado los días 3,4 y 5 de Octubre del presente
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Saúl Fraire Velázquez
COORDINADOR DE LA RED

Dr. Gabriel Rincón Enriquez
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Acevedo Hernández
CUCI

Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
CUCBA

Año 2018



Otorgan la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **CARTEL**:

Micropropagación in vitro y transformación genética de Heliopsis longipes para la producción de afinina

Realizado por:

Juan Florencio Gómez Leyva

José Manuel González Castañeda | David Ramírez Alvarado | Irma G. López Muraira
Evangelina E. Quiñones Aguilar

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.

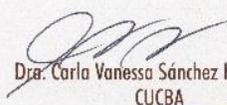
Realizado los días 3,4 y 5 de Octubre del presente
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.



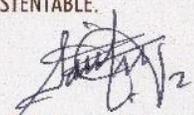
Dr. Gabriel Rincón Enriquez
CIATEJ



Dr. Gustavo Javier Acevedo Hernández
CUCI



Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
CUCBA



Dr. Saúl Fraire Velázquez
COORDINADOR DE LA RED

Año 2018