

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Agave angustifolia* HAW**

T E S I S

ELIZABETH COHEN REYES

JUNIO DE 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Agave angustifolia* HAW**

TESIS

ELIZABETH COHEN REYES

JUNIO DE 2012

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA
DE EXTRACTOS DE *Agave angustifolia* HAW**

TESIS

Sometida a la consideración del
Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora

Por

Elizabeth Cohen Reyes

Como requisito parcial para obtener
el título de Ingeniero Agrónomo

Junio de 2012

Esta tesis fue realizada bajo la Dirección del Consejo Particular aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

INGENIERO AGRONOMO

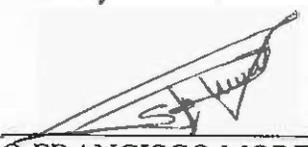
CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR:



DR. HUMBERTO GONZÁLEZ RÍOS

ASESOR:



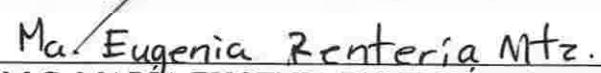
DR. SERGIO FRANCISCO MORENO SALAZAR

ASESOR:



DR. ANDRÉS OCHOA MEZA

ASESOR:



M.C. MARÍA EUGENIA RENTERÍA MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, agradezco a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres Francisca Elena Reyes Castillo y Lázaro Martín Cohen Figueroa por haberme brindado todo el apoyo, cariño, paciencia y todos los recursos para culminar mi estudios de licenciatura.

Quiero agradecer a mi comité de tesis, empezando por el Dr. Humberto González Ríos por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en esta institución CIAD, por sus conocimientos y apoyo en la dirección de este trabajo de tesis; al igual agradezco a mis asesores el Dr. Sergio Francisco Moreno Salazar, al Dr. Andrés Ochoa Meza y la M.C. Ma Eugenia Rentería por el apoyo en la revisión de este trabajo de tesis, sus sugerencias y conocimientos aportados en este mismo, así como sus conocimientos aportados durante mis estudios universitarios.

A mi amigo y compañero de trabajo, alumno de maestría Gregorio Pollorena López. Por su paciencia en todos esos preliminares, su dedicación en el laboratorio, y por ayudarme a aclarar todas esas dudas que me surgían en un mundo nuevo para mí "la investigación".

Un especial agradecimiento a la M. C. Nidia Valenzuela por todo su apoyo, conocimiento, experiencia, y por haberse tomado parte de su tiempo en ayudarme a completar mi proyecto de tesis. Muchísimas gracias sobre todo por tu paciencia.

Agradezco al M. C. José Luis Dávila Ramírez el apoyo, experiencias y el haberme impulsado a concluir este trabajo de tesis.

A mis amigos, porque en sus compañías las cosas malas se convirtieron en buenas, la tristeza se transformó en alegrías. Gracias por brindarme su amistad.

A mi familia, abuela, tíos, hermanos, primos a todos los que estuvieron ahí impulsándome a que esta meta se concretara.

A mi novio, por brindarme su apoyo, tiempo, cariño y esa gran alegría que me transmite cada vez que lo veo. Gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida

Agradezco a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento, por lograr convertir esta meta en realidad.

DEDICATORIA

A Dios

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.

A mis padres

A quienes les debo todo en la vida, les agradezco el cariño, la paciencia y todo el apoyo que me brindaron para culminar mi carrera profesional. Por cultivar en mí una persona de bien y por último les agradezco el haberme dado la mejor familia, una bastante completa, de la cual quiero a cada uno de sus integrantes.

CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Deterioro Oxidativo de los Alimentos	3
Mecanismos de Oxidación de Lípidos	4
Fase de Iniciación	4
Fase de Propagación	4
Fase de Terminación	5
Crecimiento Microbiano	5
Bacterias Patógenas	6
Uso de Antioxidantes en alimentos	7
Antioxidantes Sintéticos	8
Antioxidantes Naturales	8
Compuestos Fenólicos	9
Mecanismo Antimicrobiano	12
Alternativas Naturales para Prevenir la Oxidación en Alimentos	13
Extractos de Fuentes Naturales	13
Agave	16
Morfología del Agave	17
Agave angustifolia	17
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Obtención de Subproductos	20
Caracterización de los Subproductos	20
Obtención de los Extractos y Condiciones Experimentales	20
Extracción en la Materia Prima	21
Extracto Hidrolizado	21
Evaluación de Compuestos Fenólicos	23
Determinación de Fenoles Totales	23
Determinación de Flavonoides Totales	24
Capacidad Antioxidante	24
Inhibición del Radical DPPH	24
Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)	25
Capacidad Antimicrobiana	25
Actividad Antifúngica	25
Actividad Antibacteriana	26
Análisis Estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Caracterización de la Materia Prima	27
Contenido de Compuestos Fenólicos	27

Capacidad Antioxidante	33
Actividad Antifúngica y Antibacteriana	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
LITERATURA CITADA	39

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
CUADRO 1. Características físicas y fisicoquímicas de hojas de <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	28
CUADRO 2. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de hojas de <i>Agave angustifolia</i> Haw obtenidos mediante diferente tipos de extracción y condición de la hoja.....	29
CUADRO 3. Actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de hojas de <i>Agave angustifolia</i> Haw obtenidos mediante diferentes tipos de extracción y condición de la hoja.....	35
FIGURA 1. Planta adulta de <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	19
FIGURA 2. Condiciones de obtención de los extractos.....	22

RESUMEN

Agave angustifolia Haw., es una especie vegetal utilizada en la producción de bacanora. Durante su procesamiento se generan diferentes subproductos que representan una fuente potencial de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y antimicrobiana para ser aplicados en diferentes alimentos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de *Agave angustifolia* Haw. Se probó el efecto de los factores: tipo extracción (acuosa, etanólica, metanólica) y condición de la hoja (fresca, seca). El contenido de fenoles totales (FT) se evaluó durante diferentes etapas del proceso de extracción (materia prima, extracto sin hidrolizar y extracto hidrolizado), encontrándose efecto ($P \leq 0.05$) tanto de los factores principales como de su interacción y en la etapa donde se obtuvo el mayor contenido fue en los extractos sin hidrolizar; por lo tanto, las demás determinaciones (flavonoides totales, capacidad antioxidante y antimicrobiana) se evaluaron en esta etapa. El extracto acuoso de hoja seca (ACHS) presentó el mayor ($P \leq 0.05$) contenido de FT (42.84 mg EAG/g extracto). En cuanto al contenido de flavonoides totales, el ACHS presentó el valor más alto ($P \leq 0.05$) con 6.46 mg equivalentes de catequiza (ECAT)/g extracto y el más bajo fue para el etanólico de hoja fresca (3.27 mg ECAT/g extracto). La mayor ($P \leq 0.05$) capacidad antioxidante se encontró en el extracto ACHS (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPPH=70.54 mg ET/g extracto y capacidad antioxidante equivalente de trolox, TEAC=213.3 $\mu\text{mol ET/g}$ extracto). Los extractos obtenidos de hoja seca presentaron mayor porcentaje de inhibición contra *Alternaria alternata* que los de hoja fresca y no se encontró efecto de los factores en el diámetro de inhibición contra: *E. coli*, *S. choleraesuis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* que varió desde 7.8-8.8 mm. El extracto ACHS presentó el más alto contenido de FT, flavonoides y capacidad antioxidante, lo cual sugiere que puede tener uso potencial en la industria de los alimentos.

Palabras clave: *Agave angustifolia* Haw, extracto natural, fenoles totales, flavonoides, antimicrobiano.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos son sistemas muy complejos, en los cuales su calidad puede verse afectada por diferentes factores como lo son su manipulación durante su producción, procesamiento, almacenamiento y comercialización. Estos factores pueden llegar a producir cambios indeseables, causando así una pérdida dramática en su calidad y que por consecuencia se verá reducida en sus propiedades nutricionales (Thomas, 1995).

Uno de los factores más importantes que determinan la pérdida de calidad de los alimentos es la contaminación bacteriana, la cual puede causar el deterioro en estos y además causar problemas en la salud del consumidor, debido a la presencia de microorganismos patógenos (Fernández-López *et al.*, 2005; Tosi *et al.*, 2007). Algunos de los principales patógenos asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos son: *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*, los cuales pueden estar presentes en productos refrigerados listos para el consumidor (FDA, 2009a). Lo anterior, junto con otros factores contribuye a la generación de un proceso oxidativo del alimento, formándose reacciones en cadena, las cuales son mediadas por radicales libres. Estos radicales libres son moléculas extremadamente inestables, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior, y con una alta reactividad (Brookman, 1991; Decker *et al.*, 2000a). Una vez iniciado el proceso de oxidación, continua acelerándose hasta el deterioro total de los alimentos, apareciendo olores y sabores a rancio, viéndose afectadas otras características como el color y la textura. Adicionalmente, se presenta un descenso en el valor nutritivo y los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud (Vivas, 2000).

Actualmente, el consumidor está mostrando un gran interés en adquirir alimentos naturales que le ayuden a mantener una buena salud. Por otro lado, la industria alimentaria esta en búsqueda de tecnologías que ayuden a prevenir cambios indeseables en los alimentos, que le proporcionen una mayor vida de anaquel y que a su vez, provean un efecto positivo a la salud del consumidor.

El uso de antioxidantes naturales con propiedades bioactivas ha tomado gran relevancia, ya que son un ejemplo de compuestos que pueden contribuir a la solución de la problemática anterior (Thomas, 1995).

Las fuentes de donde se puede obtener antioxidantes naturales son muy diversas. Se ha reportado que los propóleos de miel de abeja, especias como; clavo, romero, salvia, nuez moscada, entre otras, son una fuente potencial de antioxidantes que podrían ser utilizados en la preservación de alimentos (Kumazawa *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2010). Además, recientemente se ha encontrado que extractos de plantas obtenidos a partir de los subproductos agroindustriales, poseen compuestos con capacidad antioxidante como fenoles en infusiones de maguey morado (Reyes-Munguía *et al.*, 2009), saponinas en la pulpa de *Agave lechuguilla* (Hernández, 2005), y lignina en el bagazo de *Agave tequilana* (Íñiguez *et al.*, 2005).

En la producción e industrialización de la bebida alcohólica bacanora (*Agave angustifolia* Haw), las hojas representan las dos terceras partes de la planta y no son utilizadas en la producción de la bebida. Un potencial uso de estas hojas, es la obtención de extractos con posible actividad antioxidante y antimicrobiana y su posterior uso en la industria de alimentos. Por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo general evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Agave angustifolia* Haw.

REVISIÓN DE LITERATURA

Deterioro Oxidativo de los Alimentos

Durante la producción primaria, procesamiento y comercialización de los alimentos, ocurren o intervienen un gran número de factores que repercuten en diferente medida sobre la calidad final de los alimentos, por lo cual la industria alimentaria siempre tiene el reto de implementar una serie de medidas y tecnologías encaminadas a preservar durante un mayor tiempo la calidad sanitaria, fisicoquímica y sensorial de los alimentos. Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la industria alimenticia es al deterioro oxidativo y microbiológico de los alimentos, lo cual ocasiona pérdidas económicas importantes, debido a que los alimentos tienen que ser retirados del mercado (Thomas, 1995).

Muchos de los productos alimenticios están constituidos por cierto porcentaje de lípidos, entre ellos grasas y aceites. Estos lípidos son biomoléculas orgánicas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, además pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno (Stryer, 1995).

El valor nutricional de los lípidos se debe a la composición de ácidos grasos saturados e insaturados, además de que estos componentes determinan las propiedades físicas y estabilidad de los lípidos. Los ácidos grasos son susceptibles a degradarse por medio de procesos de oxidación autocatalítica, donde el oxígeno molecular reacciona con lípidos insaturados para formar peróxidos (Xiong y Decker, 1995). Estas reacciones pueden ser provocadas por iniciadores tales como la temperatura, radiación, oxígeno atmosférico, transición del oxígeno a complejos metálicos o por catalizadores enzimáticos (Decker *et al.*, 2000b).

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de pérdida de calidad de los alimentos durante su almacenamiento y procesamiento (Gatellier *et al.*, 1992). La oxidación de los ácidos grasos se asocia a los cambios de color, pérdida de calidad nutricional, pérdida de calidad comercial y cambios organolépticos (olores y sabores a rancio, colores anormales); aunado a esto, la pérdida de la seguridad en el alimento debido a la formación de sustancias tóxicas (Vivas, 2000).

Mecanismos de Oxidación de Lípidos

El mecanismo que involucra la oxidación de lípidos, se divide en tres etapas: iniciación, propagación/ramificación y terminación (Brookman, 1991; Löliger y Wille, 1993).

Fase de Iniciación

Esta fase puede ser afectada por energía como la luz o trazas de metales pesados, capaces de producir radicales peróxidos. Esta fase involucra la reducción de una molécula de hidrogeno del ácido graso (LH) en presencia de ciertos catalizadores, y con la consecuente formación de radicales libres (L•). Entre más corta sea esta fase de iniciación de oxidación, más rápida será la oxidación del alimento; y por el contrario, mientras más largo sea el proceso de inicio de la oxidación, más lento será el del alimento (Brookman, 1991; Decker *et al.*, 2000b).

Fase de Propagación

Los radicales libres (L•) formados reaccionan con el oxígeno para formar un radical peróxido de lípido (LOO•). Los radicales tienen la habilidad de atacar otros ácidos grasos produciendo peróxidos y radicales libres, propagando así una reacción en

cadena, la cual puede reaccionar después con otra molécula lipídica para formar hidroperóxidos (LOOH). Los peróxidos formados durante la oxidación se descomponen a radicales nuevamente, aldehídos, cetonas y alcoholes. Estos serán los responsables de la aparición de olores desagradables, asociada con la rancidez (Brookman, 1991; Decker *et al.*, 2000b).

Fase de Terminación

Ocurre cuando los radicales hidroperóxidos que son compuestos altamente reactivos comienzan a reaccionar entre sí. En esta etapa, las reacciones en cadena agotan cualquier reactivo antioxidante alcanzándose una menor estabilidad y mayor deterioro en los productos (Brookman, 1991). Los productos finales de la oxidación lipídica son compuestos de cadena corta como aldehídos o esteres (Nawar, 1996).

Crecimiento Microbiano

Debido a las diferentes composiciones químicas de los alimentos, se debe considerar la calidad higiénica durante su manejo, para evitar así el desarrollo de los microorganismos. La contaminación de estos se ve afectada a partir de su posterior manipulación, y aunque se guarden las medidas higiénicas necesarias, no es posible impedir que los microorganismos lleguen a los alimentos, por lo que su contaminación es inevitable (Ordóñez y Hoz, 1999).

La seguridad microbiana y la vida de anaquel de los alimentos aumenta al minimizar el nivel inicial del microorganismo, también al destruir la población microbiana y prevenir o controlar el nivel de crecimiento microbiano (Serdengecti *et al.*, 2006). Para evitar el deterioro causado por microorganismos en el alimento se emplean diferentes métodos de conservación. Estos radican en eliminar o inhibir la actividad

microbiana, impidiendo las reacciones enzimáticas, químicas y físicas que darían lugar a cambios organolépticos y a la alteración total del alimento (Pearson y Dutson, 1990).

Bacterias Patógenas

Entre algunos de los patógenos más comunes encontrados en los alimentos están *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Escherichia coli O157:H7. Se distinguen seis cepas de *E. coli* según su poder patógeno. En el grupo de *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (Dziva *et al.*, 2004) se encuentra *Escherichia coli* O157:H7. Esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH), la cual es una enfermedad infectocontagiosa que se caracteriza por insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia, defectos de coagulación de la sangre y problemas neurológicos en los pacientes (Dziva *et al.*, 2004; Nataro y Kaper, 1998; Pearson y Dutson, 1990).

Salmonella spp. Es una bacteria gram negativa, que no genera esporas. Las principales enfermedades que puede causar *Salmonella* debido al consumo de productos cárnicos son la salmonelosis, tifoidea y paratifoidea; provocando náuseas, vómito, calambres abdominales, septicemia, fiebre y diarrea. Su presencia se debe a la deficiente higiene durante el procesamiento o manufactura del alimento (FDA, 2009b; Pearson y Dutson, 1990).

Staphylococcus aureus. Es una bacteria esférica, gram positiva, capaz de producir una toxina altamente termoestable; puede encontrarse en aire, polvo, aguas residuales o equipos de procesamiento de alimentos, humanos y medio ambiente. Los síntomas más comunes causados son náuseas, vómito y dolor abdominal; aunque se puede no mostrar todos estos síntomas. Los alimentos involucrados con frecuencia,

incluyen la carne y productos derivados de la carne; productos de las aves de corral y de huevos, leche, productos lácteos, entre otros. (FDA, 2009c; Pearson y Dutson, 1990).

Listeria monocytogenes. Es una bacteria gram positiva, flagelada, que se puede encontrar en el intestino de los seres humanos, mamíferos (domésticos y salvajes), así como en aves, pescados y crustáceos; y puede ser aislada de suelo, ensilaje, y otras fuentes ambientales. Los alimentos asociados a esta bacteria son: leche cruda (no pasteurizada), quesos, salchichas fermentadas, aves de corral crudas y cocinadas, carnes crudas (todos los tipos), pescados crudos y ahumados. Tiene una capacidad de crecer a temperaturas bajas como 3°C que le permiten su multiplicación en alimentos refrigerados (FDA, 2009d; Pearson y Dutson, 1990).

Uso de Antioxidantes en alimentos

Los antioxidantes se definen como moléculas orgánicas de origen sintético o natural, cuyo principal objetivo de uso es retardar las reacciones de degradación oxidativa. Estos aditivos ejercen su actividad, en el contexto de la autooxidación de lípidos, atrapando radicales para inhibir la absorción de oxígeno al alimento. De esta forma, se reduce la concentración de radicales responsables de la formación de otros radicales libres e impide la reacción en cadena del proceso oxidativo. Los antioxidantes también tienen la habilidad de quelar o atrapar metales de transición para retardar la oxidación, debido a que las reacciones de iniciación del radical libre, son retardadas con eficacia por la eliminación de los iones metálicos de transición (Löliiger, 1991).

Los antioxidantes se caracterizan por tener en común en su estructura un compuesto fenólico reactivo que funciona como un donante, permitiendo la formación del radical antioxidante fenoxilo (Löliiger, 1991). Existen diferentes criterios para la

clasificación de las sustancias consideradas como antioxidantes; sin embargo, el más común es la que se establece por el origen del antioxidante: sintéticos y naturales.

Antioxidantes Sintéticos

Fueron desarrollados a partir de la necesidad de obtener una protección más efectiva, y que al mismo tiempo fuera más económica, en relación a los compuestos naturales. Entre los antioxidantes sintéticos cuatro de ellos son los más utilizados en la industria alimenticia: BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol, PG (propil galato) y TBHQ (ter-butil hidroxiquinona) (Lölinger, 1991). Sin embargo, estos antioxidantes sintéticos se encuentran en desuso debido a que diversos estudios les atribuyen efectos carcinógenos (Karpinska *et al.*, 2001). Este hecho ha despertado gran interés en el estudio de antioxidantes naturales entre los que se encuentran distintos compuestos fenólicos.

Antioxidantes Naturales

Una de las ventajas al emplear conservadores naturales en los alimentos, es su fácil aceptación por el consumidor, ya que son considerados como compuestos generalmente seguros (Pokorný, 1991). Sin embargo, es necesario realizar trabajos de investigación para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento del conservador natural como antioxidante. Se han encontrado diversos productos de origen natural como los propóleos, las frutas pequeñas o berries, entre las hierbas, el tomillo posee fuerte acción antioxidante, así como el cacao, arroz, manzana, cebolla roja, y orégano, entre otros; los cuales contienen diversos compuestos con propiedades antioxidantes, tan eficaces como los comerciales disponibles (Chaillou y Nazareno, 2009; Geckil *et al.*, 2005; Lölinger y Wille, 1993). La mayoría de los compuestos activos presentes en estas fuentes antioxidantes son compuestos fenólicos. Dentro de este grupo se encuentran el tocoferol, flavonoides y diversos ácidos fenólicos (Pokorny *et al.*, 2001).

Compuestos Fenólicos

El término compuestos fenólicos o polifenoles son aquellas especies orgánicas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos a él. Sin embargo, esos grupos funcionales pueden estar sustituidos por ésteres, glicósidos, etc., (Escarpa y González, 2001). Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más grandes y ubicuos de los metabolitos de las plantas. Miles de moléculas que presentan estructura polifenólica han sido identificadas en plantas superiores y cientos de ellas se encuentran en plantas comestibles (Manach *et al.*, 2004). Los polifenoles son constituyentes regulares de la alimentación humana. El consumo promedio de polifenoles es de 1 g por día. Las fuentes más ricas son las frutas, bebidas como el té (negro y verde), café, vino y los jugos de frutas, y en menor grado hortalizas, cereales y leguminosas (Scalbert *et al.*, 2002).

Ácidos fenólicos. El nombre de ácidos fenólicos, en general describe a los fenoles que poseen un ácido carboxílico funcional. Los ácidos fenólicos contienen dos esqueletos de carbono que los distinguen en: ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos. Aunque el esqueleto básico es el mismo, el número y posiciones de los grupos hidroxilos en el anillo aromático hacen la diferencia (Robbins, 2003). Los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos son abundantes en los alimentos y pueden representar cerca de la tercera parte de los compuestos fenólicos en nuestra dieta. Estos compuestos pueden encontrarse como ésteres o en forma libre, los cuales, pueden estar solubles y acumulados en las vacuolas o bien insolubles como componentes de la pared celular (Yang *et al.*, 2001).

Los ácidos hidroxicinámicos constituyen el grupo más ampliamente distribuido de compuestos fenólicos. Dentro de ellos hay cuatro estructuras básicas que existen en su forma natural las cuales corresponden a los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Similar a otros compuestos fenólicos, la mayoría de estas estructuras se encuentran en el reino vegetal asociadas a otros tipos de compuestos. Un ejemplo de la

importancia de estas combinaciones lo constituye la esterificación del ácido cafeico con el ácido quínico que forma la estructura ampliamente distribuida en los alimentos con el nombre genérico de ácido clorogénico el cual se ha demostrado que tiene efecto benéfico en el tratamiento de la diabetes tipo II (Escarpa y González, 2001).

Dentro de los ácidos hidroxibenzoicos se encuentran el ácido gálico, protocatéuico, siríngico y varílico. La distribución de estos ácidos en las plantas comestibles es generalmente muy bajo, con la excepción de algunas frutas rojas como zarzamora, frambuesa, cereza, fresa, que pueden tener concentraciones de varias decenas de miligramos por kilogramo de peso fresco (Manach *et al.*, 2004).

El té es una importante fuente de ácido gálico: las hojas de té pueden contener arriba de 4.5 g/kg de peso fresco. Debido a que los ácidos hidroxibenzoicos, tanto libres como esterificados se encuentran solo en pocos alimentos comestibles para el hombre, no han sido estudiados profundamente y no se considera que tengan un interés nutricional (Manach *et al.*, 2004).

Flavonoides. Los flavonoides son polifenoles que tienen el esqueleto del difenilpropano (C6-C3-C6). Las diferencias individuales dentro de cada grupo resultan desde la variación en número y arreglo de los grupo hidroxilos, así como de la naturaleza y extensión de alquilación y/o glicosilación de esos grupos, dentro de estos grupos se encuentran, las antocianinas, flavanoles, flavonoles, etc., (Karakaya, 2004).

Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, están constituidos por una molécula de antocianidina que es la aglicona a la que se une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. Estos compuestos están disueltos en las vacuolas de los tejidos epidérmicos de flores y frutos, los cuales imparten los colores rosa, rojo, azul o púrpura. En la dieta humana, las antocianinas se encuentran en el vino tinto, algunos cereales y en algunas hortalizas de hoja y raíces, pero son más abundantes en las frutas. Las antocianinas se encuentran principalmente en la cáscara, excepto en algunos frutos

como la cereza y la fresa, en las que se localizan principalmente en la pulpa (Manach *et al.*, 2004).

Los flavonoles son una clase de flavonoides que presentan la estructura 3-hidroxi flavona. Su diversidad radica en las diferentes posiciones que acomodan los grupos -OH fenólicos. Los principales flavonoles son las catequinas, las cuales son abundantes en el té y el chocolate. Las proantocianidinas son flavonoles poliméricos (de 4 a 11 unidades), que están presentes en materiales vegetales tales como las semillas de la uva (Yang *et al.*, 2001).

La quercetina es el principal flavonol en la dieta humana, se encuentra presente en muchas frutas, hortalizas y bebidas. Es particularmente abundante en cebolla (0.3 mg/g peso fresco) y en el té (10-25 mg/L). La quercetina usualmente se encuentra como O-glicósidos, con la D-glucosa como el residuo de azúcar más frecuente. Más de 170 diferentes glicósidos de quercetina han sido identificados (Yang *et al.*, 2001).

Saponinas. Las estructuras químicas originales, candidatas para muchos compuestos farmacéuticos que promueven la salud, se originaron a partir de sustancias químicas presentes en extractos de plantas. Entre estos compuestos de plantas se encuentran las saponinas de quillaja, yuca y alfalfa las cuales tienen efectos benéficos sobre la salud animal (Avato *et al.*, 2006).

Las saponinas son glucósidos, compuestos químicos cuyas estructuras están constituidas por un núcleo soluble en grasa (aglicona), que puede ser ya sea un esteroide triterpenoide (C-30) o neutral o alcanolide (C-27) unida a una o más cadenas laterales de azúcares solubles en agua (glicona) a través de enlaces éster al núcleo aglicona en diferentes sitios de carbono. Las saponinas triterpenoides predominan en la soya, alfalfa y quillaja, mientras que las saponinas esteroides predominan en la yuca, tomate y avena (Kaneda *et al.*, 1987).

Entre los diversos efectos biológicos que presentan las saponinas se encuentran; actividad hemolítica, actividad antibacteriana. Algunas saponinas son benéficas, mientras que otras son consideradas peligrosas para los animales. Los efectos biológicos de las saponinas se ven afectados por factores como el tipo de núcleo de la saponina, el número de cadenas laterales del azúcar y el tipo de grupos funcionales (Hassan *et al.*, 2010).

Lignina. La lignocelulosa es el material más abundante en nuestro planeta, se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, cuyas proporciones en las plantas pueden ser muy variables: 20-55% celulosa, 16-85% de hemicelulosa y 15-40% de lignina. La lignina es un polímero generado por la condensación al azar de los radicales libres de alcoholes aromáticos. En general, su estructura es difícil de definir, sin embargo, se sabe que contiene fundamentalmente tres alcoholes; coniferílico, sinapílico y p-cumarílico. También puede contener ácidos fenólicos tales como cumárico y ferúlico, que están esterificados con los grupos alcohol. Su degradación es difícil y protege a la celulosa y hemicelulosa de la hidrólisis enzimática por lo que se considera un compuesto recalcitrante (Howard *et al.*, 2003).

Mecanismo Antimicrobiano

Plantas, hierbas y especias, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, mohos y levaduras. Los compuestos antimicrobianos de las plantas se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de sus hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos (Doores, 1993).

Los posibles mecanismos de acción de los ácidos orgánicos sobre los microorganismos incluyen: reducción directa del pH del sustrato o medio de

crecimiento debido a un aumento en la concentración de protones, el descenso en el pH interno de la célula por ionización de la molécula de ácido no disociada o por la interrupción de transporte de sustrato, debido a una alteración en la permeabilidad de la membrana celular. Además de inhibir el transporte de sustratos, los ácidos orgánicos también pueden inhibir la oxidación de NADH, eliminando así el suministro de agentes reductores de los sistemas de transporte de electrones (Davidson, 2001). Dado que la parte no disociada de la molécula del ácido es la responsable de la actividad antimicrobiana, la eficacia a un pH dado depende en gran parte de la constante de disociación (pKa) del ácido (Beuchat, 2000).

Alternativas Naturales para Prevenir la Oxidación en Alimentos

Actualmente se han descubierto diversas fuentes naturales que representan alternativas para evitar el deterioro oxidativo de diversos productos alimenticios, dentro de dichas alternativas se encuentran los antioxidantes provenientes de numerosas fuentes como los extractos de especias, plantas, frutas, etc. (Chen *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2010).

Extractos de Fuentes Naturales

Los antioxidantes naturales extraídos de hierbas y especias presentan diversos grados de eficacia cuando son aplicados en diferentes alimentos (Yoo *et al.*, 2008). Un ejemplo de ello son los extractos de té, romero, clavo, salvia y orégano, los cuales han demostrado que reducen la oxidación lipídica con la misma efectividad que los antioxidantes naturales cuando son empleados en productos cárnicos cocinados (McCathy *et al.*, 2001). Formanek *et al.*, (2003) estudiaron el efecto de extractos de romero en carne molida irradiada y encontraron que tanto la oxidación lipídica como los cambios de color fueron inhibidos por la presencia del extracto.

A través de estas y otras investigaciones ha sido demostrado el potencial antioxidante que presentan los extractos naturales. Recientemente, en la búsqueda de nuevas fuentes antioxidantes naturales, se ha encontrado que estos se pueden obtener a partir de propóleos de la miel de las abejas, de extractos de especias, plantas y de las hojas de distintos agaves que a su vez provienen de subproductos agroindustriales del procesamiento de los mismos (Xiong *et al.*, 2010; Reyes-Munguía *et al.*, 2009).

Propóleos de la miel de abejas. Los propóleos son una sustancia natural extraída por las abejas de las yemas y exudados de ciertos árboles y plantas. Han sido utilizados en la medicina popular en muchas regiones del mundo y se ha descubierto que presentan varias actividades biológicas tales como antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios y anticancerígenos (Kimoto *et al.*, 2001). Los propóleos generalmente contienen una gran variedad de compuestos químicos como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres), terpenoides, esteroides y aminoácidos. La composición de los propóleos depende de la vegetación y el sitio de recolección (Marcucci, 1995).

Especias. Existen numerosas especias, la mayoría son utilizadas en la cocina de nuestros hogares, las cuales se ha descubierto que presentan actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos. De acuerdo con Aruoma *et al.*, (1992) el extracto de romero es efectivo para prevenir la oxidación. La actividad antioxidante del extracto de romero es impartida fundamentalmente por diterpenos fenólicos, ácido carnósico, carnisol, entre otros. Xiong *et al.*, (2010), investigaron la capacidad antioxidante de diversas especias como clavo, romero, nuez moscada, raíz de casia, etc., en hamburguesas de puerco cocinadas y encontraron que todas tienen capacidad antioxidante, pero los extractos con mayor capacidad antioxidante y que retardaron por mayor tiempo el deterioro de la carne fueron clavo y romero, debido a que presentaron el valor más alto en el contenido de compuestos fenólicos.

Subproductos agroindustriales. Los antioxidantes naturales son a menudo más costosos y menos eficaces que los sintéticos, es por ello que en la actualidad, la atención se ha centrado en la extracción de antioxidantes provenientes de fuentes económicas o

residuales de las industrias agrícolas como la cáscara de papa, las semillas de uva, cáscaras y semillas de cítricos, residuos de zanahoria y hojas de té (Bo Huang *et al.*, 2011).

En extractos obtenidos a partir de subproductos agroindustriales provenientes del procesado del *Agave* y otras plantas también se han encontrado la presencia de compuestos con capacidad antioxidante y antimicrobiana, dentro de ellos se encuentran ácidos fenólicos, saponinas, así como también lignina (Hernández *et al.*, 2005; Reyes-Munguía *et al.*, 2009; Íñiguez *et al.*, 2005).

En una investigación realizada por Reyes-Munguía *et al.*, (2009) encontraron que infusiones acuosas obtenidas a partir de maguey morado (*Rhoeo discolor*, no es una agavacea) son ricas en compuestos fenólicos. Prepararon infusiones a partir de hojas de maguey fresco y seco, obteniendo un contenido de fenoles totales de 2100 y 3010 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/L respectivamente. Por otro lado, Hernández *et al.*, (2005), encontraron la presencia de saponinas en extractos metanólicos y etanólicos obtenidos a partir de subproductos de *Agave lechuguilla* el cual se utiliza en la producción de ixtle. Estos investigadores evaluaron la cantidad de saponinas que se pueden extraer a diferentes volúmenes de solvente (25 y 50 mL) y soluto (5, 10 y 15 g) y encontraron que a mayor cantidad de solvente empleado, se obtiene una mayor extracción de saponinas.

Por otro lado, en los subproductos de *Agave tequilana*, el cual se utiliza en la producción de tequila se ha encontrado la presencia de lignina, la cual forma parte de las fibras del bagazo que se desperdicia durante la producción de esta bebida. El contenido de lignina promedio que presentaron los bagazos fue de 7.20% (Íñiguez *et al.*, 2005).

Dentro de este grupo de subproductos, se encuentran también los obtenidos a partir de *Agave angustifolia* Haw., este agave se utiliza en la producción de bacanora una bebida alcohólica típica en el estado de Sonora. Según Salazar y Mungaray (2008), se estima una producción anual de 240 mil litros de esta bebida, así como también

reportan que *Agave angustifolia* se recolecta en 35 municipios de este mismo estado. Carrillo (2007) reportó que sólo un tercio de la planta es utilizada en el proceso de elaboración de bacanora, este tercio corresponde a la piña que se utiliza en la fermentación, y los otros dos tercios restantes que corresponde principalmente a la hoja son considerados como subproducto.

Debido a que los subproductos agroindustriales son fuente económica para la obtención de compuestos antioxidantes es que se está tratando de aprovecharlos al máximo, a través de la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos. Como se ha demostrado, los subproductos obtenidos a partir de agave también representan una fuente rica en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, por lo tanto estos pueden ser utilizados en la conservación de alimentos entre ellos las carnes frescas y así impartirles valor agregado.

Agave

El género agave fue descrito por Carlos Linneo a partir de la especie *Agave americana* en 1753. En griego la palabra agave (*agavus*), significa "admirable o noble" (Gómez-Pompa, 1963). En México estas plantas se conocen como maguey, sin embargo el término universal empleado es agave.

El género de agave se encuentra ubicado dentro de la familia *asparagaceae* (=agavaceae), la cual surgió aproximadamente hace 15 millones de años (Eguiarte *et al.*, 2000). Se asegura que el centro de mayor riqueza y biodiversidad para la familia se encuentra en México y áreas circunvecinas. No existe un número definido de especies de la familia *agavaceae*, sin embargo, García-Mendoza y Galván (1995) afirman que tienen registrado un total de 288 especies y consideran que un 75% del total se encuentra en el territorio mexicano. Los mismos autores mencionan que de todas las especies que posee el país, 55% son endémicas. Los estados que poseen un mayor número de representantes

son Oaxaca, Durango y Puebla, seguidos por Sonora, Jalisco, Coahuila, Chihuahua, San Luis Potosí, Nuevo León y Zacatecas.

Morfología del Agave

Son plantas perennes, suculentas, monocotiledóneas, con raíces duras fibrosas y tallos gruesos muy cortos. Las hojas son generalmente verdes, sin embargo también pueden ser blancas o grisáceas. Su superficie puede ser muy áspera al tacto o muy suave, la mayoría son largas, gruesas hacia la base y están arregladas en rosetas basales con espigas laterales y en las puntas. La espina terminal puede ser corta o muy larga, acanalada totalmente o en partes con sección transversal, redondeada y aplanada (Arizaga y Ezcurra, 1995).

Las plantas de este género presentan varias adaptaciones a su medio; tienen la capacidad de acumular agua en las gruesas hojas suculentas lo que permite que estén especialmente adaptadas a la aridez.

Agave angustifolia

En Sonora se pueden encontrar 26 especies nativas, 4 subespecies y 4 variedades de agave. Entre estos agaves cabe resaltar la importancia del *A. angustifolia*, ya que esta planta durante siglos ha sido utilizada para la elaboración de bacanora, una bebida alcohólica destilada parecida al mezcal y tequila, pero con sabor, aroma y características organolépticas propias (Moreno, 1995). Actualmente tanto su cultivo como aprovechamiento representan dos alternativas económicas de enorme potencial para las comunidades serranas de Sonora (Salazar y Mungaray, 2008).

Bacanora. La producción del destilado de bacanora se basa únicamente en la cosecha del *A. angustifolia* (ver Figura 1). De acuerdo con los más antiguos

procesamientos de elaboración de esta, las piñas son transportadas a la *vinata* para su cocimiento en hornos naturales de piedra; las piñas cocidas se cortan en pedazos pequeños y se machucan con una hacha para la obtención de mosto, que es colocado junto con el bagazo y agua en tinajas de madera, las cuales son cubiertas para su fermentación, que tarda de cuatro a cinco días. La destilación se realiza en alambiques, donde los alcoholes se evaporan y pasan al serpentín, el cual se encuentra en agua fría, lo que hace que se condensen y se transformen en bacanora (Moreno, 1995). Según Gentry, (1972) la región de mayor abundancia en Sonora, abarca los municipios de Arivechi, Onavas, Sahuatipa, Soyopa y Nacorí Chico, también se puede encontrar en Bacanora, Suaqui, Mátape, Mazatán y La Colorada, aunque en menor cantidad (Moreno, 1995; Ortega-Mendoza, 2012).



Figural. Planta adulta de *Agave angustifolia* Haw

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Subproductos

Los subproductos (hojas) de *Agave angustifolia* Haw., generados durante la producción de bacanora, se obtuvieron del rancho “El Bísura”, ubicado cerca de la comunidad de Mazocahui en el municipio de Ures, Sonora. Este municipio se encuentra dentro del área de denominación de origen para la producción de bacanora. Las hojas se recolectaron de plantas de agave con edad fisiológica suficiente (6-8 años) para la producción de esta bebida (Barraza *et al.*, 2006).

Caracterización de los Subproductos

Las hojas de *A. angustifolia* Haw se caracterizaron a través de mediciones tanto de las dimensiones, como contenido de humedad y pH. Las dimensiones que se evaluaron fueron: largo y ancho de las hojas, las cuales se midieron con una regla graduada en cm, así como el peso, el cual se determinó por medio de una balanza (Sartorius F1508X02). El contenido de humedad se evaluó conforme lo reporta la AOAC (2000), método 4.1.03 y el pH utilizando una proporción 1:9 (3 g de hoja y 27 mL de H₂O destilada) en un equipo HANNA pH-211.

Obtención de los Extractos y Condiciones Experimentales

Una vez recolectadas las hojas de agave, se trasladaron al laboratorio de productos cárnicos de CIAD para obtener los extractos. Estas, fueron lavadas y

cortadas en trozos pequeños de 1 cm x 1 cm, la mitad de las mismas se secaran a 50 °C hasta un 3% de humedad para obtener extractos a partir de hojas secas, mientras que el resto se utilizó para obtener extractos en estado fresco (ver Figura 2).

La obtención de los extractos se hizo manipulando dos factores: 1) la condición de la hoja (fresca y seca) y 2) tipo de extracción (etanólica, metanólica y acuosa). Dichas condiciones de extracción se detallan más adelante.

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó en tres etapas: en la materia prima, extractos sin hidrolizar y extractos hidrolizados. En los extractos de estas tres etapas se analizó el contenido de fenoles totales, y el extracto sin hidrolizar que fue el que tuvo un mayor contenido de fenoles totales, fue utilizado para llevar a cabo la evaluación de su capacidad antioxidante y antimicrobiana.

Extracción en la Materia Prima

La obtención de los extractos a partir de la materia prima se realizó siguiendo la metodología descrita por Ciriano *et al.*, (2009) con algunas modificaciones. Se pesaron 10 g de hojas de agave seco (3 % humedad) y fresco, posteriormente se le adicionaron 20 mL de cada solvente al 80% (etanol y metanol). Se homogenizó por 30 s a una velocidad media, se procedió a sonicar 30 minutos sin calor (1 °C). Pasado éste tiempo se centrifugó por 15 minutos a 14 000 rpm a una temperatura de 4 °C. Se repitió el procedimiento con dos volúmenes de 10 mL de cada solvente, se obtuvo el sobrenadante y se filtró en papel Whatman No.1, posteriormente se llevó a un volumen de 40-50 mL en agua.

Extracto Hidrolizado

La obtención de los extractos se realizó conforme lo reporta Vega-Vega, (2011). Los solventes que se utilizaron en la extracción fueron metanol y etanol.

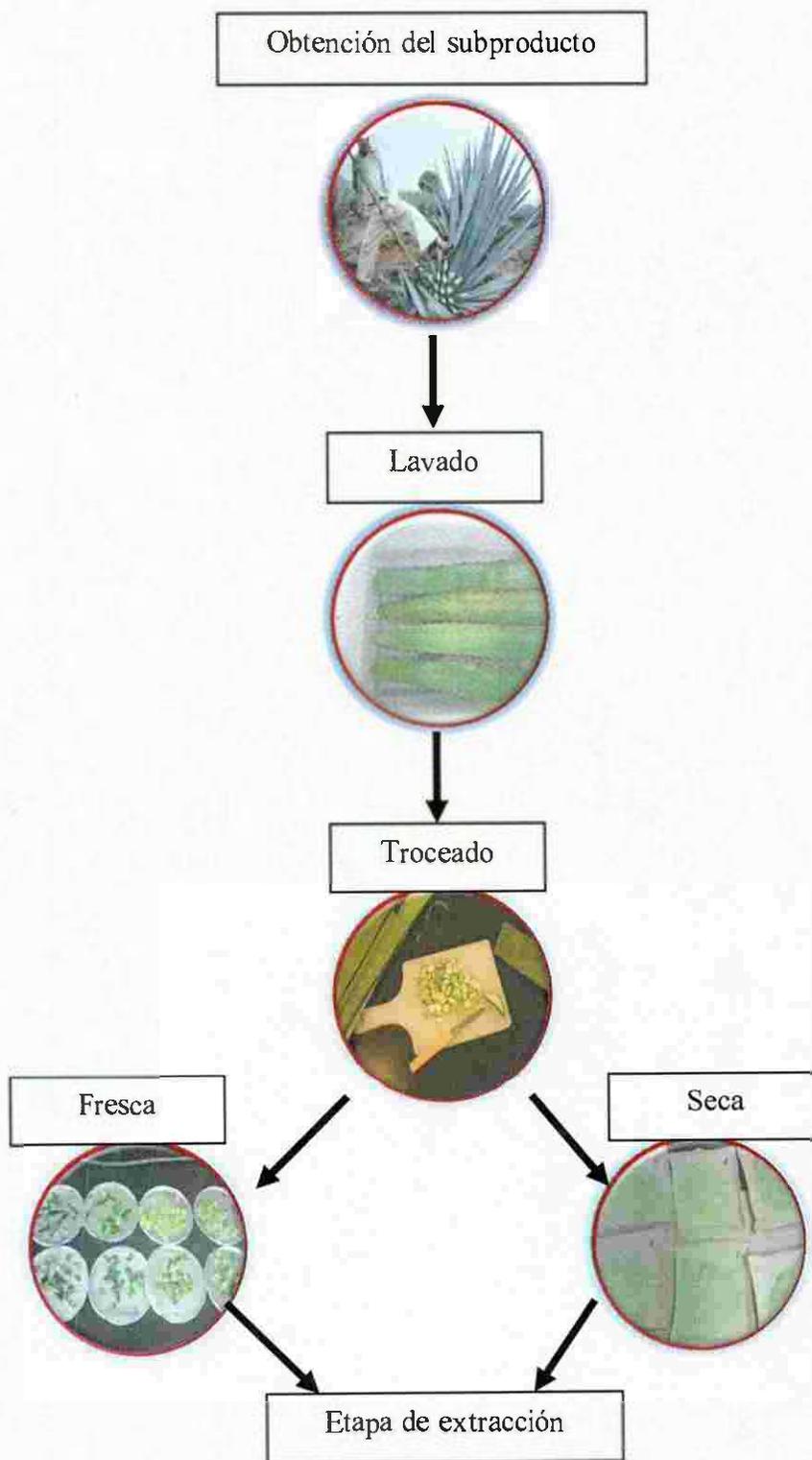


Figura 2. Condiciones de obtención de los extractos.

Se pesaron 10 g de hojas de agave fresca y seca (3% humedad), los cuales fueron puestos en contenedores con 100 mL de cada solvente (alcohol: agua 8:2). Las muestras fueron puestas a macerar en la oscuridad durante 10 d a 25 °C. Pasado este tiempo, los extractos fueron filtrados (Whatman No. 4) y el solvente fue removido usando un evaporador rotatorio a presión reducida y temperatura de 40 y 45 °C para metanol y etanol respectivamente. La fracción acuosa fue liofilizada, formando un extracto seco, el cual fue sujeto a una hidrólisis alcalina (10 mL de NaOH 4M) durante 4 h en ausencia de luz. Enseguida se realizó una hidrólisis ácida con HCl 4M hasta llegar a pH = 2. En el siguiente paso, el extracto hidrolizado fue sujeto a una separación líquido-líquido mediante dos lavados con 20 mL de acetato de etilo, formando dos fracciones: polar y no-polar (Oboh y Rocha, 2007). El solvente fue evaporado y los extractos fueron resuspendidos en agua deionizada. En total se obtuvieron 4 extractos: metanólico polar (MP), metanólico no-polar (MNP), etanólico polar (EP) y etanólico no-polar (ENP) con una concentración de 25 mg de tejido por mL de agua.

También se realizó una extracción acuosa como un proceso alternativo. Se pesaron 10 g de hoja tanto seca como fresca, los cuales se mezclaron con 100 mL de agua destilada a 100 °C durante 30 min. Pasado el tiempo, la infusión fue filtrada (Whatman No. 4) y liofilizada. Después de esto, la muestra fue hidrolizada como se menciona anteriormente, obteniendo la fracción polar y no-polar con una concentración de 25 mg de muestra por mL de agua.

Evaluación de Compuestos Fenólicos

Determinación de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales en cada extracto fue evaluado de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rosi, 1965) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 15 µL del extracto con 75 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido [1:10]

con agua, posteriormente se le adicionaron 60 μL de Na_2CO_3 al 7.5% y se dejaron reposar durante 30 minutos en oscuridad. Después de la incubación, la absorbancia fue medida a 765 nm en un lector de placas (FLUO-Star omega). El contenido de fenoles totales se calculó utilizando una curva estándar de ácido gálico y expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de muestra seca.

Determinación de Flavonoides Totales

La determinación de flavonoides totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Zhishen *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. Se mezclaron 100 μL del extracto con 430 μL de solución A (400 μL de H_2O destilada+ 30 μL de NaNO_2 al 5%) y se dejaron reposar durante 5 min. Después del reposo se adicionaron 30 μL de AlCl_3 al 10% y un minuto después se adicionaron 440 μL de la solución B (200 μL de NaOH 1M + 240 μL de H_2O destilada). Se leyó la absorbancia a 415 nm en un lector de placas (FLUO-Star omega). La absorbancia de cada muestra se comparó con una curva estándar de quercetina. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina (EQ)/ g de extracto (peso seco).

Capacidad Antioxidante

Inhibición del Radical DPPH

La capacidad de los extractos para inhibir el radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) se calculó de acuerdo al método descrito por González *et al.* (2007). Se tomaron 140 μL de una solución 0.0634 mM de DPPH \cdot en metanol y se agregaron 10 μL del extracto. La mezcla se agitó en un vortex y se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad. Se leyó la absorbancia a 518 nm en un lector de placas (FLUO-Star omega). Los resultados se expresaron como la concentración eficiente (mg/mL) para inactivar al radical en un 50% (EC50).

Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)

Este método se basó en la capacidad de los antioxidantes para inactivar el radical ABTS^{•+} (Re *et al.*, 1999). El radical catión ABTS^{•+} se generó por interacción de 5 mL de una solución 7 mM de ABTS y 88 μ L de una solución 0.139 mM de K₂S₂O₈. Se adicionaron 2970 μ L de ABTS^{•+} a 30 μ L de extracto, se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Cary 50 Bio, Varian, Italia) al minuto 1 y 6 después del mezclado inicial. Se reportó el porcentaje de disminución de la absorbancia a 734 nm. Los datos generados se reportaron como μ moles de equivalentes Trolox (ET)/g de extracto (peso seco).

Capacidad Antimicrobiana

Actividad Antifúngica

Se evaluó el potencial antifúngico de los extractos contra *Alternaria alternata* usando el método de inoculación central, incorporando los extractos en agar. Se utilizaron las concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 mg/ mL de cada extracto, los cuales se agregaron a cajas petri conteniendo agar papa dextrosa, y se inocularon en el centro con el hongo. Las placas se incubaron durante 5 d a 25 °C. Los controles consistieron en placas con agar sin adición de extractos, e inoculadas con el hongo. Se midió el crecimiento micelial (cm²) por triplicado, mediante el análisis de las imágenes digitales de las placas usando el software ImageTool versión 3.0. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata* al día 5 (Vega-Vega, 2011).

Actividad Antibacteriana

Se determinó la capacidad antibacteriana contra las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Staphylococcus aureus* ATCC 65384. Se transfirió un asa (~20 µL) de cada bacteria a tubos conteniendo 10 mL de caldo de soya tripticasa y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se partió del inóculo con 1×10^8 UFC/mL, con el cual se realizaron diluciones hasta tener una población de 1×10^6 UFC/mL, de la cual se transfirieron 100 µL a placas Petri con agar MuellerHinton y se distribuyeron homogéneamente con perlas estériles. Posteriormente, se colocaron discos (7 mm) impregnados con los extractos a una concentración de 25 mg/mL y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se midió el halo de inhibición que presentaron los extractos para evitar el crecimiento de las bacterias, el cual se reporta en mm. (Vega-Vega, 2011).

Análisis Estadístico

Para estimar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bajo un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2 donde el primer factor fue el tipo de solvente (metanol, etanol, agua) y el segundo factor fue la condición de la hoja (fresco y seco). El modelo estadístico incluyó el efecto fijo de los factores principales y sus interacciones. Las diferencias entre las medias fueron estimadas mediante una prueba de comparación múltiple de Tukey. Las significancias estadísticas fueron establecidas a un nivel de $P \leq 0.05$ en el error Tipo I. Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la Materia Prima

Las características físicas y fisicoquímicas evaluadas en las hojas de *Agave angustifolia* Haw, se muestran en el Cuadro 1 donde se puede observar que el valor promedio de las dimensiones largo y ancho fue 108.5 cm y 6.43 cm respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por Gentry (1982) quien caracterizó la planta de *A. angustifolia* y reporta que las dimensiones de las hojas pueden ir desde 50-120 cm de largo y de 4-8 cm de ancho. Por otro lado, las plantas de *Agave angustifolia* Haw., poseen entre 120-175 hojas por roseta (Rodríguez-Garay *et al.*, 2009) y el peso promedio de las hojas evaluadas en esta investigación fue 358.9 g, lo cual nos da una idea de la cantidad de subproductos generados durante el procesado de cada una de estas plantas. También se evaluó el contenido de humedad (79.18%) el cual se encuentra cercano al encontrado en hojas de maguey morado (91.5%) (Reyes-Munguía *et al.*, 2009). El pH promedio que fue 5.25, el cual podría indicar la presencia de ácidos fenólicos.

Contenido de Compuestos Fenólicos

En el Cuadro 2 se muestra el contenido promedio de compuestos fenólicos obtenidos mediante diferentes tipos de extracción (TEXT) y condición de la hoja (CH). El contenido de fenoles totales (FT) fue afectado ($P < 0.05$) por los factores TEXT, CH y por su interacción tanto en la materia prima, como en el extracto sin hidrolizar y en el hidrolizado. De manera general, se obtuvo un mayor contenido de FT en el extracto sin hidrolizar respecto al extracto hidrolizado y la materia prima. Esto puede deberse a la

Cuadro 1. Características físicas y fisicoquímicas de hojas de *Agave angustifolia* Haw

Característica	Promedio ± DE
Largo (cm)	108.5±11.74
Ancho (cm)	6.43 ± 1.03
Peso (g)	358.9 ± 80.68
Humedad(%)	79.18 ± 2.73
pH	5.25 ± 0.05

n=20

CUADRO 2. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de hojas de *Agave angustifolia* Haw obtenidos mediante diferente tipos de extracción y condición de la hoja.

Condición ³	Tipo de extracción												Significancia ¹		
	Acuosa				Etanólica				Metanólica				TEXT	CH	TEXT x CH
	HF	HS	HF	HS	HF	HS	HF	HS	HF	HS	EEM ²				
Fenoles totales ⁴															
<i>Materia prima</i>	2.60c	10.68a	1.42de	1.76d	1.15e	3.89b	0.086		**		**		**		
<i>E. sin hidrolizar</i>	36.92 b	42.84 a	20.31 d	31.23 c	29.93 c	30.06 c	0.925		**		**		**		
<i>E. hidrolizado</i>	42.55 a	45.87 a	24.31c	33.34 b	18.55 d	27.96 c	0.349		**		**		**		
Flavonoides ⁵	4.43 b	6.46 a	3.27c	5.84 a	3.44 c	4.59 b	0.156		**		**		**		
DPPH ⁶	70.12b	70.54a	26.58c	26.52c	26.23d	26.10d	0.055		**		NS		**		
TEAC ⁷	210.3b	213.3a	207.3c	206.22cd	205.02d	207.35c	0.416		**		**		**		

1 TEXT: Tipo de extracción, CH: condición de la hoja, TEXT x CH: Interacción. * (P≤0.05), ** (P≤0.01), NS: no significativo.

2 EEM: Error estándar de la media.

3 HF: Hoja fresca, HS: hoja seca.

4 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g muestra.

5 mg equivalentes de catequina (ECAT)/ g muestra.

abcde Medias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencias (P≤0.05).

6 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl): mg equivalentes de Trolox (ET)/ g muestra.

7 TEAC: μmol equivalentes de Trolox (ET)/ g muestra.

diferencia en los procedimientos para obtener los extractos y también a que una gran parte de las hojas de *Agave* está constituida por fibras, las cuales a su vez se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (García *et al.*, 2005) y la hidrólisis empleada al parecer no fue suficientemente fuerte para liberar a los polifenoles ligados, por lo tanto la cantidad de los que se encuentran en estado libre es mayor (Oboh y Rocha, 2007).

En general, el contenido más alto de FT en la materia prima fue obtenido en la extracción acuosa de hoja seca y el valor más bajo fue obtenido en la extracción metanólica de hoja fresca. Con respecto al efecto de la interacción, en la extracción acuosa el contenido de FT fue mayor (10.68 mg EAG/ g muestra) en la hoja seca que en la hoja fresca (2.60 mg EAG/ g muestra). El menor contenido se obtuvo en la extracción etanólica respecto a las otras dos, resultando valores similares ($P \geq 0.05$) para hoja fresca y seca (1.42 y 1.76 mg EAG/g muestra respectivamente); mientras que en la extracción metanólica el valor fue mayor en la hoja seca con 3.89 mg EAG/g muestra, respecto a un valor de 1.15 mg EAG/g muestra en la hoja fresca.

En cuanto al contenido de FT en los extractos sin hidrolizar, los valores más altos fueron obtenidos mediante la extracción acuosa y se obtuvo un mayor contenido en la hoja seca respecto a la hoja fresca (42.84 vs 36.92 mg EAG/ g muestra). En la extracción etanólica, FT fueron mayores en la hoja seca que en la hoja fresca ($P \leq 0.05$). Sin embargo en la extracción metanólica los valores no sufrieron cambios por la condición de la hoja ($P \geq 0.05$).

Respecto al contenido de FT en los extractos hidrolizados, aquellos obtenidos por extracción acuosa fueron más altos que los obtenidos en la extracción etanólica y metanólica, sin embargo no cambiaron por la condición de la hoja ($P \geq 0.05$). En la extracción etanólica se observó un mayor contenido de FT ($P \leq 0.05$) en la hoja seca (33.34 mg EAG/g muestra) respecto a la hoja fresca (24.31 mg EAG/g muestra). Por otro lado, en la extracción metanólica los valores de FT fueron mayores en la hoja seca que en la hoja fresca.

De manera general, se puede observar que el mayor contenido de FT en todas las etapas de extracción (materia prima, sin hidrolizar e hidrolizado) se obtuvo en las extracciones acuosas, lo cual se debe principalmente a la diferente solubilidad que presentan los compuestos fenólicos en cada solvente ya que algunos de ellos son de naturaleza lipofílica y otros de naturaleza hidrofílica (Alothman *et al.*, 2009); por lo tanto, la polaridad del solvente juega un papel muy importante en la solubilidad de los mismos. Generalmente, los solventes menos polares se utilizan para realizar extracciones de compuestos fenólicos lipofílicos (Naczki y Shahidi, 2006).

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los reportados por Sousa *et al.*, (2008) quienes realizaron extracciones con dos tipos de solventes (Agua y metanol) en alcaparras y observaron que el extracto acuoso presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos que el metanólico (15.48 y 4.86 mg EAG/g extracto, respectivamente). En otro estudio realizado en plantas aromáticas se encontró que la cantidad de compuestos fenólicos extraíbles fue menor conforme decrece la polaridad del solvente utilizado y se encontró un mayor contenido en los extractos acuosos que en los metanólicos (Proestos y Komaitis, 2006). Sin embargo, existen otras investigaciones donde el mayor contenido de FT se obtuvo cuando la extracción se realizó con metanol, comparada con la realizada con etanol y agua. Por lo tanto, se puede decir que no existe una regla en cuanto a la cantidad de compuestos que se pueden extraer mediante los diferentes solventes, sino que más bien depende de la naturaleza del material vegetal (Rababah *et al.*, 2010; Trabelsi *et al.*, 2010).

En los extractos obtenidos de hojas secas se obtuvo un mayor contenido de FT que en los de hojas frescas. Resultados similares a los hallados en esta investigación fueron reportados en hojas de magüey morado ya que se reporta un mayor contenido de FT en las hojas secas que en las frescas, lo cual se debe a que en las hojas secas existe una mayor concentración de este tipo de compuestos (Reyes-Munguía *et al.*, 2009). Por otro lado, evaluar las hojas en estas dos condiciones nos permite comparar entre extractos obtenidos de tejidos secos (hierbas, especias) y los obtenidos de tejidos frescos

(frutas, verduras). En lo que a esto respecta, se realizó un estudio donde se evaluaron diferentes hierbas de la familia *Lamiaceae* tanto en estado fresco como en estado seco y se reporta que los extractos obtenidos de aquellas que se encontraban en estado seco presentaron un mayor contenido de compuestos fenólicos que las frescas (25.8 y 14.06 mg EAG/g materia fresca) (Capecka *et al.*, 2005). También existen diversos estudios donde se demuestra que el contenido de FT es mayor en algunas especias que en diversos tipos de frutas (Alothman *et al.*, 2009; Shan, *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que existe poca información sobre extractos obtenidos de plantas del genero *Agave*. En un estudio realizado por Reyes-Munguía *et al.* (2009), se evaluó el contenido de compuestos fenólicos en extractos obtenidos de maguey morado (el cual no es un agave, pertenece a la familia *Commelinaceae*), y encontraron valores de 2.1 y 3.0 mg EAG/mL de infusión para hoja fresca y seca respectivamente, concluyendo que las mejores propiedades antioxidantes se obtuvieron cuando las hojas se deshidrataron a 55° C. En otro estudio realizado en USA donde se evaluó la capacidad antioxidante en diversos alimentos, se reporta que el contenido de FT en agave varía desde 0.87-13.59 mg EAG/g (Wu *et al.*, 2004).

El contenido de flavonoides en los extractos sin hidrolizar fue afectado también por los factores principales y su interacción (Cuadro 2). En la extracción acuosa de hoja seca se obtuvo un mayor contenido de flavonoides ($P \leq 0.05$) respecto a la de hoja fresca (6.46 vs 4.43 mg ECAT/ g muestra). Así mismo, tanto en la extracción etanólica como metanólica se obtuvieron valores más elevados en la hoja seca que en la hoja fresca. Debido a que los flavonoides se encuentran dentro de la familia de compuestos fenólicos, estos presentaron efecto similar que el encontrado para FT. En un estudio realizado con diversas frutas tropicales donde se realizaron extracciones con diferentes solventes (agua, metanol 90% y etanol 90%) se encontró el mismo comportamiento que en esta investigación y se reportó que en el extracto acuoso tanto para piña y banana (3.34 y 13.7 mg ECAT/100 g muestra) se obtuvo la mayor concentración de flavonoides que en el metanólico y etanólico. Sin embargo, en guayaba el extracto etanólico presentó el mayor contenido (39.5 mg ECAT/100 g muestra) que los otros dos (Alothman *et al.*,

2009). En otro estudio realizado en hojas de *Limoniastrum monopetalum* se encontró que el extracto etanólico 80% presentó un contenido de flavonoides más elevado (4.78 mg ECAT/g extracto) que el acuoso y el metanólico 80% (1.07 y 3.35 mg ECAT/g extracto, respectivamente), concluyendo además que la adición de agua al solvente contribuye con la extracción de flavonoides (Trabelsi *et al.*, 2010).

Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos de hojas de agave fue medida en los extractos sin hidrolizar a través de la inhibición del radical estable DPPH• y del radical catión ABTS•+ (TEAC), y los resultados se muestran en el Cuadro 2. En la inhibición del radical DPPH• se encontró efecto significativo del tipo de extracción y de la interacción tipo de extracción x condición de la hoja. La mayor actividad antirradicalaria (DPPH•) fue encontrada en la extracción acuosa con valores casi tres veces superiores (70 mg ET/ g de extracto) a los obtenidos en la extracción etanólica y metanólica (26 mg ET/g de extracto). Sólo se observó diferencia de la condición de la hoja en la extracción acuosa siendo mayor en la hoja seca que en la hoja fresca. Con respecto a la capacidad antioxidante contra el radical catión ABTS•+, se encontró efecto de los factores principales y su interacción ($P < 0.05$), observándose comportamiento similar que para DPPH• con valores por arriba de 210 $\mu\text{mol ET/ g}$ de extracto en la extracción acuosa y de 206 $\mu\text{mol ET/ g}$ de extracto en la extracción etanólica y metanólica.

Diversos investigadores han reportado una fuerte correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos (Andarwulan *et al.*, 2010; Turkmen *et al.*, 2006). Es por eso que los extractos que presentaron el contenido más elevado de FT y flavonoides, también presentaron la mayor capacidad antioxidante. En los extractos obtenidos usando el disolvente de mayor polaridad (acuosos) se encontró mayor eficacia para inhibir los radicales DPPH• y

ABTS^{•+} que en los de menor polaridad (metanólicos y etanólicos), lo cual indica que en los extractos de hoja de *A. angustifolia* Haw se encuentran en mayor proporción compuestos bioactivos de naturaleza hidrofílica.

En investigaciones recientes, se han reportado resultados similares a los encontrados en esta investigación ya que han obtenido mayor capacidad antioxidante en extractos acuosos que en los metanólicos y etanólicos (Sousa *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, los compuestos obtenidos de diferentes variedades de zarzamora presentaron mayor afinidad hacia el metanol ya que mostraron mayor capacidad antioxidante (DPPH=31.53-44.33 mg ET/g peso fresco; ABTS=108.43-146.89 μ mol ET/g peso fresco) que los obtenidos con agua (DPPH=22.76-30.88 mg ET/g peso fresco; ABTS=74.92-93.13 μ mol ET/g peso fresco) (Sariburun *et al.*, 2010).

Actividad Antifúngica y Antibacteriana

En el Cuadro 3 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos contra *Alternaria alternata* y las zonas de inhibición (mm) contra los patógenos estudiados. Para los extractos utilizados a una concentración de 25 mg/mL sólo se encontró efecto de la condición de la hoja $P \leq 0.05$ observándose un porcentaje de inhibición de 82.4% del extracto de la hoja seca el cual fue diferente de 32.6% obtenido para el extracto proveniente de la hoja fresca.

Para los extractos probados a una concentración de 12.5 mg/mL se observó efecto significativo del método de extracción y de la condición de la hoja. Respecto al método de extracción se observó un mayor porcentaje de inhibición en la extracción etanólica (44.6%) el cual fue diferente al obtenido en la extracción acuosa y metanólica (37.8 y 35.6% respectivamente). Así mismo los extractos de la hoja seca tuvieron un mayor porcentaje de inhibición que la hoja fresca. Para la concentración menor del extracto

CUADRO 3. Actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de hojas de *Agave angustifolia* Haw obtenidos mediante diferentes tipos de extracción y condición de la hoja.

	Método de extracción				Condición de la hoja ¹			Significancia ²		
	Agua	Etanol	Metanol	HF	HS	EEM ³	MEXT	CH	MEXT x CH	
<i>Antifúngica</i> ⁴										
25	55.3 a	60.6 a	56.6 a	32.6 ^y	82.41 x	2.19	NS	**	NS	
12.5	37.8 b	44.6 ^a	35.59 b	14.9 ^y	63.75 x	1.45	**	**	NS	
6.25	30.0 b	36.4 ^a	28.1 b	11.9 ^y	51.1 x	1.45	**	**	NS	
<i>Antibacteriana</i> ⁵										
<i>E. coli</i>	7.8	8.8	8.4	8.1	8.6	0.16	NS	NS	NS	
<i>S. choleraesuis</i>	8.0	8.4	8.3	8.3	8.2	0.32	NS	NS	NS	
<i>S. aureus</i>	8.2	7.8	8.1	8.0	8.1	0.18	NS	NS	NS	
<i>L. monocytogenes</i>	8.0	8.8	8.3	8.1	8.5	0.27	NS	NS	NS	

¹HF: Hoja fresca, HS: hoja seca.

²MEXT: Método de extracción, CH: condición de la hoja, MEXT x CH: Interacción. * (P≤0.05), ** (P≤0.01). NS: no significativo.

³EEM: Error estándar de la media.

⁴ Reportada como % de inhibición y evaluada contra *Alternaria alternata* a 3 diferentes concentraciones del extracto (mg/ mL)

⁵ Zona de inhibición en mm.

^ab Médias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencias (P≤0.05) para método de extracción.

^xy Médias con diferente literal dentro de hilera, indican diferencias (P≤0.05) para condición de la hoja.

también se observó efecto del extracto y de la condición de la hoja siendo mayores los valores en la extracción etanólica y los obtenidos en la hoja seca.

En un estudio reciente, Feng *et al.*, (2011) reportaron que en aceite esencial de tomillo, el porcentaje de inhibición contra *Alternaria alternata* aumentó de manera directa con la concentración del aceite y en la concentración máxima (500 $\mu\text{L/L}$) se encontraron porcentajes de inhibición cercanos al 62%. Estos valores se encuentran por debajo de los obtenidos en esta investigación a una concentración de 25 mg/mL para hojas secas, esto puede deberse a la diferencia en la concentración en que se aplicaron. También Vega-Vega, (2011) reporta porcentajes de inhibición de 3 y 27% contra este hongo en infusiones de semilla y cáscara de mango a una concentración de 6.25 mg/mL, los cuales fueron más bajos que los encontrados en el extracto etanólico.

Se han reportado diversos sitios de acción de los compuestos antifúngicos, entre los que se incluyen la membrana celular, pared celular, el sistema genético, enzimas metabólicas, etc., los cuales son esenciales para la supervivencia de estos microorganismos y cualquier alteración de los mismos puede inactivar a la célula microbiana. Su mecanismo de acción depende de las concentraciones utilizadas en los alimentos, causando la inhibición o inactivación de los hongos (Conner, 1993; Delaquis *et al.*, 2002).

Para el caso de la actividad antibacteriana de los extractos, no se observó una dependencia de la sensibilidad de las bacterias hacia los compuestos bioactivos obtenidos mediante los diferentes tipos de extracción y la condición de la hoja. En general, no se encontró diferencia en la sensibilidad de las bacterias gram-negativas y gram-positivas y todos los patógenos mostraron zonas de inhibición de alrededor de 8 mm. Se ha reportado que las bacterias gram-negativas son más resistentes a los compuestos fenólicos que las gram-positivas, lo que tal vez se debe a las diferentes composiciones de la pared celular (Negi *et al.*, 2003).

Almajano *et al.*, (2008) reportaron diámetros de inhibición de extractos de diferentes tipos de té (verde y blanco) aplicados a una concentración de 15 mg/mL contra *E. coli* que van desde 6.2-6.4 mm, así mismo; Lee *et al.*, 2012 reportaron diámetros de inhibición contra *S. choleraesuis* de 9.7 para extractos de aceite esencial de *Zanthoxylum piperitum*. En extractos de diferentes fracciones de aguacate variedad Hass se han encontrado diámetros de inhibición contra *S. aureus* que van desde 5.80-8.33 mm y contra *L. monocytogenes* valores desde 5.07-9.27 mm (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011). Todos estos resultados obtenidos se encuentran cercanos a los obtenidos en esta investigación, por lo tanto pudiera hipotetizarse que los extractos de hojas de *A. angustifolia* podrían servir como agentes antimicrobianos.

El mecanismo antimicrobiano de los compuestos fenólicos, aún no ha sido bien elucidado. Sin embargo, se ha sugerido que estos compuestos pueden causar cambios en la membrana a través de la interacción con los grupos carboxílicos de los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de la membrana celular, alterando de esta manera su permeabilidad. Lo anterior trae consigo una alteración del pH y potencial eléctrico, causando la salida de protones al exterior de la célula, por lo tanto, se produce una coagulación del citoplasma acompañado de la pérdida normal del metabolismo celular y por ende la muerte de ésta (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El extracto acuoso de hoja seca presentó la mayor capacidad antioxidante y el mayor contenido de compuestos fenólicos.

La condición de la hoja fue determinante para obtener mejor actividad antifúngica de los extractos, siendo mayor en los extractos de hoja seca.

Todos los extractos tuvieron una capacidad antimicrobiana similar para inhibir el crecimiento de los patógenos probados.

Los resultados evidencian que hay una importante actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de *Agave angustifolia* Haw.

Resulta de interés realizar futuras investigaciones, utilizando dichos extractos aplicados en diferentes alimentos susceptibles al deterioro oxidativo y antimicrobiano, con el fin de validar su potencial actividad bioactiva.

LITERATURA CITADA

- Almajano, M. P.; R. Carbó; J.A.L. Jiménez y M.H. Gordon. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55-63.
- Allothman, M.; R. Bhat y A.A. Karim. 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-788.
- Andarwulan, N.; R. Batari; D.A. Sandrasari; B. Bolling y H. Wijaya. 2010. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*, 121(4), 1231-1235.
- Arizaga, S. y E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia*, 101:329-334.
- Aruoma, O. I.; B. Halliwell; R. Aeschbach y J. Loliger. 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active Rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* 22: 257-268.
- Avato, P.; R. Bucci; A. Tava; C. Vitali; A. Rosato; Z. Bialy, *et al.* 2006. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* spp.: Structure–activity relationship. *Phytotherapy Research*, 20, 454–457.
- Barraza-Morales, A.; F.L. Sánchez; M. Robert; M. Esqueda; A. Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw de la sierra sonorensis determinada con marcadores AFLP. *Revista fitotecnia mexicana* 29, 1-8.

- Barraza-Morales, A.; F.L. Sánchez; M. Robert; M. Esqueda; A. Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw de la sierra sonorensis determinada con marcadores AFLP. *Revista fitotecnia mexicana* 29, 1-8.
- Beuchat, L. R. 2000. Use of sanitizers in raw fruit and vegetable processing. In: Alzamora S.M., Tapia M.S., López-Malo A., editors. Minimally processed fruits and vegetables. Fundamental aspects and applications. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers Inc. p 63-78.
- Bo Huang; H. Jingsheng; B. Xiaoquan; Z. Hong; Y. Xincheng; W. Youwei. 2011. Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. *Meat Sci.* 87: 46-53.
- Brookman, P. 1991. Antioxidants and consumer acceptance. *Food Technology*, 24-28.
- Capecka, E.; A. Mareczek y M. Leja. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93(2), 223-226.
- Carrillo, L. A. 2007. Los destilados de agave en México y su denominación de origen. *Ciencias*, julio-septiembre. Número 087. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal México. Pp 40-49.
- Chaillou, L. L. y M.A. Nazareno. 2009. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 1422-1427.
- Chen, C. C.; K. Muramoto; F. Yamauchi; K. Fujimoto y K. Nokihara. 1998. Antioxidant properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digest of soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 46: 49-53.

- Conner, D. 1993. Naturally occurring compounds. Food science and technology. New York-Marcel Dekker-, 441-441.
- Davidson, P.M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., editors. Food microbiology: fundamentals and frontiers, 2nd edition. Washington, D.C.: ASM Press. p 593–627
- Decker, E.; C. Faustman y C.J. Lopez-Bote. 2000a. Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality. Edition: illustrated. New York. Publicado por Wiley-Interscience. 499 pags.
- Decker, E.A.; S.A. Livisay y S. Zhou. 2000b. A re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine and histidine. Biochemistry (Moscow) (Traslation of Biokhimiya) (Moscow), 65:766-770.
- Delaquis, P. J.; K. Stanich; B. Girard, y G. Mazza. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1–2), 101-109.
- Doores, S. 1993. Organic acids. In: Davidson P.M., Branen A.L., editors. Antimicrobials in food. New York: Marcel Dekker Inc. p 95–136.
- Dziva, F.; P.M. Van-Diemen; M.P. Stevens; A.J. Smith y T.S Wallis. 2004. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal traet using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, 150: 3631-3645.
- Eguiarte, L. E.; A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia *Agavaceae* filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 66:131-150.

- Escarpa, M. y M.C. González. 2001. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 31(2): 57-139
- FDA. 2009a. U. S. Food and Drug Administration. Profesionales de la medicina - Los 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos. <http://www.fda.gov/food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>.
- FDA. 2009b. U. S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Salmonella* spp. <http://www.fda.gov/food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>.
- FDA. 2009c. U. S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Staphylococcus aureus*. <http://www.fda.gov/food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070064.htm>.
- FDA. 2009d. U. S. Food and Drug Administration. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Listeria monocytogenes*. <http://www.fda.gov/food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070064.htm>.
- Feng, W.; J. Chen; X. Zheng y Q. Liu. 2011. Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments. *Food Control*, 22(1), 78-81.
- Fernández-López, J.; N. Zhi; L. Aleson-Carbonell; J.A. Pérez-Álvarez y V. Kuri. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69: 371-380.

- Formanek, Z.; A. Lynch; K. Galvin; J. Farkas y J.P. Kerry. 2003. Combined effects of irradiation and the use of natural antioxidants on the shelf-life stability of overwrapped minced beef. *Meat Science*, 63, 433-440.
- García-Mendoza, A. y R. Galván. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56:7-24.
- García, Y. G.; O.G. Reynoso y J.N. Arellano. 2005. Potencial del bagazo de Agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis*, 3(14):12-16.
- Gatellier, P.; M. Anton; F. Chraïti y M. Renerré. 1992. Relation ships between lipid oxidation, antioxidant enzyme activity and color stability in raw beef meat during storage. Proc. 38 th ICoMST, Clermont-Ferrand.
- Geckil, H.; B. Ates; G. Durmaz; S. Erdogan y I. Yilmaz. 2005. Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(1):27-31.
- Gentry, H. S. 1972. The Agave family in Sonora. Agricultural Research Service, USDA. *Agriculture Handbook*, 399, 195-210.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America. *University of Arizona Press*, 670-679.
- Gómez-Pompa, A. 1963. El Genero Agave. *Cactaceas y Suculentas Mexicanas* 8, 3-25.
- González-Aguilar G. A., M. A. Villegas-Ocho, M. A. Martínez-Téllez, A. A. Gardea, J. F. Ayala-Zavala. 2007. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science* 72(3) 197-20.

- Hassan, S.M.; A.U. Haq; J.A. Byrd; M.A. Berhow; A.L. Cartwright, y C.A. Bailey. 2010. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry* 119: 600–605
- Hernández, R.; E.C. Lugo; L. Díaz y S. Villanueva. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis*. 3(11):3-9.
- Howard, R.L.; E. Abotsi; E. Jansen van Rensburg; S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* 2 (12), 602-619.
- Íñiguez, G.; N. Acosta; L. Martínez; J., Parra y O. González. 2005. Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21 (1) 37-50.
- Kaneda, N.; H. Nakanishi y J. Staba. 1987. Steroidal constituents of *Yucca schidigera* plants and tissue cultures. *Phytochemistry*, 26, 1425–1429.
- Karakaya, S. 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: 453-464.
- Karpinska, M.; J. Borowski y M. Danowski-Oziewicz. 2001. The use natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry*, 72:5-9.
- Kimoto, T.; M. Aga; K. Hino; S. Koya-Miyata; Y. Yamamoto; M.J. Micallef; T. Hanaya; S. Arai; M. Ikeda y M. Kurimoto. 2001. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Research*, 21, 221–228.
- Kumazawa, S.; T. Hamasaka; T. Nakayama. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84: 329–339.

- Lee, J.-H.; M. Jang; J. Seo y G.H. Kim. 2012. Antibacterial effects of natural volatile essential oil from *Zanthoxylum piperitum* A.P. DC. against foodborne pathogens. *Journal of Food Biochemistry*, 36(2):1-8.
- Löliger, J. 1991. Natural Antioxidants. *Lipid Technology*, 58-61.
- Löliger, J. y H.J. Wille. 1993. Natural Antioxidants. *Oils & Fats International*, 9(2): 18-22.
- Manach, C.; A. Scalbert; C. Morand; C. Rémesy y L. Jiménez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
- Marcucci, M. C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- McCarthy, T. L.; J.P. Kerry; J.F. Kerry; P.B. Lynch y D.J. Buckley. 2001. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Sci*. 57: 45-52.
- Moreno, S. F. 1995. Propagación *in vitro* de *Agave pacífica* Trel. (maguey de Bacanora) para su conservación, repoblación y cultivo comercial. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 5-11.
- Moreno, S. 1998. *Agave angustifolia*, el bacanora, desde su origen hasta nuestros días. *Revista Entorno (Instituto del medio ambiente y el Desarrollo sustentable del Estado de Sonora)* 2:3-5.

- Naczek, M. y F. Shahidi. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Nataro, J. P. y B. Kaper. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol*, 11: 142-201.
- Nawar, W. W. 1996. *Lipids in Food Chemistry*. Fennema, O.R. 3^{ra} Edición. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp.780-781.
- NCSS. 2007. Number cruncher statistical systems. Programa estadístico para Windows, Hintze JL, EUA.
- Negi, P. S.; G.K. Jayaprakasha y B.S. Jena. 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80(3), 393-397.
- NOM-110-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Oboh, G.; J.B.T. Rocha. 2007. Distribution and antioxidant activity of polyphenols in ripe and unripe tree pepper (*Capsicum pubescens*). *Journal of Food Biochemistry* 31(4), 456-473.
- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 2000. 17^{va} Edición. Volumen II. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, M.D, USA. Método oficial 4.1.03.
- Ordóñez, J. A. y L.P. Hoz. 1999. Carne "Composición General". En: Tratado de nutrición. Edición: ilustrada. Publicado por Ediciones Díaz de Santos. (84), 363-375.

- Ortega-Mendoza L. A. 2012. Distribución espacial de *Agave angustifolia* en la cuenca del Río Matape. Tesis de Licenciatura. Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora.
- Pearson, A. M. y T.R. Dutson. 1990. Meat and Health: Advances in meat research. Volume 6. Ed. Elsevier applied science. New York. Pag 554.
- Pokorný, J. 1991. Review: natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 223-227.
- Pokorny, J.; N. Yanishlieva; M. Gordon. 2001. Antioxidants in food. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.
- Proestos, C. y M. Komaitis. 2006. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. *Journal of Food Quality*, 29(5), 567-582.
- Rababah, T. M.; F. Banat; A. Rababah; K. Ereifej y W. Yang. 2010. Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate. *Journal of Food Science*, 75(7), C626-C632.
- Raybaudi-Massilia, R. M.; J. Mosqueda-Melgar; R. Soliva-Fortuny y O. Martín-Belloso. 2009. Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157-180.
- Re R.; N. Pellegrini; A. Proteggente; A. Pannala; M. Yang y C. Rice-Evans. 2009. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), 1231-1237.

- Reyes-Munguía, A.; E. Aziara-Nieto; C.I. Beristain; F. Cruz-Sosa y E.J. Vernon-Carter. 2009. Propiedades antioxidantes del maguey morado (*Rhoeo discolor*). *CyTA – Journal of Food* Vol. 7, No. 3, 209–216.
- Robbins, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2866-2887.
- Rodríguez-Carpena, J. G. N.; D. Morcuende; M.A.J. Andrade; P. Kylli y M. Estévez. 2011. Avocado (*Persea americana* Mili.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625-5635.
- Rodríguez-Garay, B.; J.A. Lomelí-Senciñ; E. Tapia-Campos; A. Gutiérrez-Mora; J. García-Galindo; J.M. Rodríguez-Domínguez; D. Urbina-López y I. Vicente-Ramírez. 2009. Morphological and molecular diversity of Agave tequilana Weber var. Azul and Agave angustifolia Haw. var. Lineño. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 220-228.
- Salazar, V.; A. Mungaray. 2008. La industria informal del mezcal bacanora. *Estudios Sociales*. 17(13), 164-198.
- Sariburun, E.; S. Şahin; C. Demi; C. Türkben y V. Uylaşer. 2010. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *Journal of Food Science*, 75(4), C328-C335.
- Scalbert, A.; C. Morand; C. Manach y C. Rémesy. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56: 276-282.

- Serdengecti, N.; I. Yildirim y N. Gokoglu. 2006. Effects of sodium lactate, sodium acetate and sodium diacetate on microbiological quality of vacuum-packed beef during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 26: 62-71.
- Shan, B.; Y.Z Cai; M. Sun y H. Corke. 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Singleton, V. L.; J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144-158.
- Sousa, A.; I.C.F.R. Ferreira; L. Barros; A. Bento y J.A. Pereira. 2008. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 739-745.
- Stryer, L. 1995. Bioquímica. 4ta Edición. Ed. Reverte.
- Thomas, M. J. 1995. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Critical. Review Food Sci Nutrition* 35: 21-39.
- Tosi, E. A.; E. Re; M.E. Ortega y F.A. Cazzoli. 2007. Food preservative on propolis: bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 104:1025-1029.
- Trabelsi, N.; W. Megdiche; R. Ksouri; H. Falleh; S. Oueslati; B. Soumaya; H. Hajlaoui y C. Abdelly. 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 632-639.

- Turkmen, N.; F. Sari y Y.S. Velioglu. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835-841.
- Vega-Vega, V. 2011. Enriquecimiento de la capacidad antioxidante y protección antimicrobiana del mango fresco cortado aplicando compuestos fenólicos de sus subproductos. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Vivas, L. 2000. El enranciamiento y el papel de los antioxidantes. *Cárnica* 2000. 1, 67-72.
- Wu, X.; G.R. Beecher; J.M. Holden; D.B. Haytowitz; S.E. Gebhardt y R.L. Prior. 2004. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026-4037.
- Xiong, Y. L. y E.A. Decker. 1995. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. *J. of Muscle Foods* 6: 139-160.
- Xiong, Y. L.; B. Kong; H. Zhang. 2010. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. *Meat Science* 85: 772-778.
- Yang, C. S.; J.M. Landau; M.T. Huang; H.L. Newmark. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Reviews of Nutrition*. 21: 381-406.
- Yoo K. M.; C.H. Lee; H. Lee; B.K. Moon y C.Y. Lee. 2008. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929-936.

Zhang, L.; A.S. Ravipati; S.R. Koyyalamudi; S.C. Jeong; N. Reddy; P.T. Smith; J. Bartlett; K. Shanmugam; G. Münch y M.J. Wu. 2011. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected Medicinal Plants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12361-12367.

Zhishen, J.; T. Mengcheng; W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4), 555-559.