



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

IDENTIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS FLAVONOIDES DE
ALTO VALOR COMERCIAL: VALORIZACIÓN DE *guishe* DE
Agave lechuguilla.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Zoé Pelletier Morreeuw

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 16 del mes de Noviembre del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

Identificación y extracción de los flavonoides de alto valor comercial: Valorización de *guishe* de *Agave lechuguilla*.

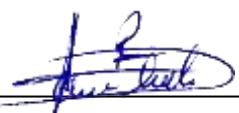
Presentada por la alumna:

Zoé Pelletier Morreeuw


Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Directora de Tesis




Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutora



Dra. Paola Magallón Servín
Co-Tutora



Dr. Roberto Parra Saldívar
Co-Tutor



Dra. Carmen Lizzeth Salinas Salazar
Co-Tutora



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

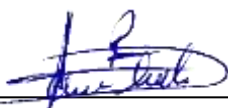
La Paz, Baja California Sur, a 02 de Noviembre de 2021.

Los miembros del comité de tesis de la estudiante Zoé Pelletier Morreeuw del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: iThenticate
- Filtros utilizados: Bibliografía excluida
- Porcentajes de similitud: 7%

58479 palabras • 360 coincidencias • 158 fuentes		
Tesis de doctorado	Citas incluidas	7%
<small>www.pdf-repositorio.universidad...</small>	Bibliografía excluida	<small>total de...</small>
Resumen de Coincidencias		
1	Internet 427 palabras hdl.handle.net	1%
2	Crossref 186 palabras Zoé P. Morreeuw, Cristina Escobedo-Fregoso, Leopoldo J. Ríos-González, David Castillo-Quirós, Ana G. Reyes. "Tr...	<1%
3	Internet 190 palabras Copiado el 01-Dic-2020 es.scribd.com	<1%
4	Crossref 127 palabras Zoé P. Morreeuw, David Castillo-Quirós, Leopoldo J. Ríos-González, Raúl Martínez-Rincón et al. "High Throughput ...	<1%
5	Internet 121 palabras Copiado el 08-Sep-2021 library.co	<1%
6	Internet 112 palabras Copiado el 29-Abr-2020 www.scielo.org.mx	<1%
7	Internet 95 palabras Copiado el 31-Ago-2017 egob.biomedicine.gu.se	<1%

Firmas del comité



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Directora de Tesis



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutora



Dra. Paola Magallón Servín
Co-Tutora



Dr. Roberto Parra Saldivar
Co-Tutora



Dra. Carmen Lizzeth Salinas Salazar
Co-Tutora

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Directora de tesis

Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de tesis

Dra. Paola Magallón Servín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de tesis

Dr. Roberto Parra Saldívar
Instituto Tecnológico y de Educación Superior de Monterrey
Co-Tutor de tesis

Dra. Carmen Lizzeth Salinas Salazar
Instituto Tecnológico y de Educación Superior de Monterrey
Co-Tutora de tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. Paola Magallón Servín
Dr. Roberto Parra Saldívar
Dra. Carmen Lizzeth Salinas Salazar

Jurado de Examen

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. Paola Magallón Servín
Dr. Roberto Parra Saldívar
Dra. Carmen Lizzeth Salinas Salazar

Suplentes

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Resumen

El *Agave lechuguilla* Torrey (lechuguilla) es una de las especies más abundantes en las zonas áridas y semi áridas de México. La lechuguilla se recolecta para obtener el *ixtle*, material fibroso que se destina principalmente a la exportación, constituyendo la mayor fuente de ingreso para los campesinos de las zonas rurales productoras. El procesamiento de las hojas para obtener el *ixtle* genera un residuo, llamado *guishe*, del cual se acumulan más de 150 mil toneladas al año. Este subproducto se desecha en campo abierto o se quema, provocando problemas de contaminación ambiental y de salud. Por lo anterior, es necesario encontrar alternativas de valorización del *guishe*, considerando aspectos ambientales, económicos y sociales, para el uso integral de la lechuguilla. Dentro de la biorrefinería previamente conceptualizada, los fitoquímicos se presentan como productos derivados de usos múltiples con alto valor agregado. Entre ellos, los flavonoides son de interés para industrias tales como la farmacéutica, la cosmética, la agropecuaria y la agroalimenticia. Por esta razón, en este trabajo se planteó identificar y extraer los flavonoides del *guishe* de *A. lechuguilla* para proponerlos como productos naturales de alto valor para su uso comercial. Los primeros análisis transcriptómicos del *A. lechuguilla* demostraron la biosíntesis de los flavonoides activa en el *guishe*, y se confirmó la abundancia de flavonoles (1.31 mg/g), flavanonas (0.30 mg/g), antocianinas (37.94 µg/g) y sus derivados glicosilados por análisis cromatográficos cualitativos y cuantitativos. La predicción *in silico* de sus propiedades biológicas sugiere el potencial antiinflamatorio, anticancerígeno e inmunomodulador de los flavonoides caracterizados. Se evaluó su capacidad antioxidante *in vitro*, confirmando que son bioactivos. Se verificó la presencia de los flavonoides de interés comercial en el *guishe* de tres regiones productivas. Para obtener los flavonoides bioactivos considerando el procesamiento del *guishe* a gran escala, se establecieron las condiciones de secado (horno, 40 °C, 24 h, oscuridad), de hidrólisis enzimática (Ultraflo, pH 4, 40°C, 2.5 h), y de extracción por fluidos supercríticos (40 g/min CO₂ + 15% co-solvente, 60°C, 250 bar, 1 h).

Palabras claves: *Agro-residuo, flavonoides, transcriptómica, bioactividades, hidrólisis enzimática, extracción por fluidos supercríticos*

ORCID: 0000-0003-2789-3788

Vº.Bº



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Directora de tesis

Summary

Agave lechuguilla Torrey is one of the most abundant species in arid and semiarid areas of Mexico. It is harvested to obtain Tampico fiber mostly for exportation providing their main incomes to rural inhabitants of productive states. The leave processing results in the accumulation of over 150 mil tons/year of a pulpous residue, locally known as *guishe*, which is discarded in open field or burned leading to environmental and health issues. Thus, from an environmental, economical and social perspective, alternatives for the valorization of the *guishe* are required for the integral use of *A. lechuguilla*. In the conceptualized biorefinery, phytochemicals are considered as high-added value co-products with multiple uses. Among them, the flavonoids are of interest for pharmaceuticals, cosmetics, agriculture and food industries. That is why this work aimed to identify and extract flavonoids from the *guishe* of *A. lechuguilla* to propose them as natural products for commercial applications. The first transcriptomic analysis of *A. lechuguilla* revealed the active biosynthesis of flavonoids in the *guishe*, and the qualitative and quantitative chromatographic analysis confirmed the abundance of flavanols (1.31 mg/g), flavanones (0.30 mg/g), anthocyanins (37.94 µg/g) and their glycoside derivatives. The *in silico* prediction of the biological properties of the characterized flavonoids suggested their anti-inflammatory, anticancer and immunomodulatory capacities, and the antioxidant capacity, evaluated *in vitro*, confirmed that they are bioactive. The presence of these flavonoids was evaluated through three productive regions to adequately purpose the *guishe* as a valuable raw material. For the obtention of bioactive flavonoids, considering the large-scale processing of *guishe*, conditions of drying (oven, 40 °C, 24 h, in the dark), enzymatic hydrolysis (Ultraflo, pH 4, 40°C, 2.5 h), and supercritical fluid extraction (40 g/min CO₂ + 15% co-solvent, 60°C, 250 bar, 1 h) were established.

Key words: *Agro-residue, flavonoids, transcriptomic, bioactivities, enzymatic hydrolysis, supercritical fluid extraction*

ORCID: 0000-0003-2789-3788

Vo.Boj.



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
Directora de tesis

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis abuelos, Mamie Cool et Pappy Pop, quienes son el origen de todo. Me inculcaron los valores que aplico en mi vida tanto como en mi trabajo, me transmitieron el amor a la ciencia entre más cosas, y me brindaron un apoyo incondicional, aún después de haber dejado este mundo.

Mummy, ésta tesis es para ti también. Por este amor y apoyo sin límite. Me diste la vida para disfrutarla, los escalones para crecer y aprender, y las alas para volar por mí misma. Y para parafrasearte, te amo hasta el fin del mundo.

“Live as if you were to die tomorrow.

Learn as if you were to live forever.”

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; CVU No. 895585), y el financiamiento otorgado en el proyecto para atender a Problemas Nacionales (PN-2017-73332). Se agradece el apoyo recibido por parte de la empresa Biorganix Mexicana en las etapas tempranas del proyecto de investigación.

Ante todo, muchas gracias Ana (Dra. Ana Reyes) por tus valiosas enseñanzas, tu dedicación y tu apoyo. Fuiste clave en mi desarrollo tanto académico como personal. Los pequeños pasos, sumados, llevan a grandes logros. Esta tesis es tanto mía como tuya, fruto de esta alianza que espero perdurará. Siempre serás mi mamá académica.

Muchas gracias a todos los integrantes de mi Comité Tutorial; Dra. Cristina Escobedo Fregoso, Dra. Paola Magallón Servín, Dra. Carmen L. Salinas Salazar, y Dr. Roberto Parra Saldívar; por su confianza, y por haber aportados visiones singulares y complementarias a lo largo de este proyecto. Agradezco también todo el apoyo teórico y técnico que recibí de su parte y sus distintos grupos de trabajos.

También agradezco mucho al Dr. David Castillo Quiroz del INIFAP de Saltillo por transmitir su amor por la lechuguilla y las salidas al campo. A los Doctores Leopoldo, Thelma y Miguel de la facultad de ciencias químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, muchas gracias por recibirme y por sus valiosas aportaciones en el proyecto.

Agradezco al grupo Sustainable and Applied Biotechnology (SAB) del ITESM por darme la bienvenida, y en particular al Dr. Hafiz M.N. Iqbal y la Dra. Elda M. Melchor Martínez por agregarle valor a este trabajo. Asimismo, agradezco mucho al Dr. Daniel Guajardo Flores y la Dra. Mariana Martínez del grupo de Bioprocesos del ITESM por su valiosa colaboración.

Por su apoyo y su tiempo, un especial agradecimiento a la Dra. Kitty (Bertha Olivia Arredondo Vega), el Dr. Margarito Rodríguez Álvarez, la M.C. Gabriela Mendoza Carrión, la M.C Patricia Hinojosa Baltazar, la M.C María Olivia Arjona López y la Dra. Dra. Rosa María Morelos Castro. Asimismo, agradezco al personal administrativo de Posgrado del CIBNOR por su el constante seguimiento; Dra. Gracia Alicia Gómez, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera y a Tanía Verónica Núñez Valdez.

Cristina, Chava, y Tomy, por estas platicas, salidas, comidas, y cervezas, muchísimas gracias. Gracias Roberto, por haber sido mi copiloto durante una gran parte de este doctorado. No hay fracasos, sólo aprendizajes. Nada de eso hubiera sido posible sin ustedes siempre aquí compartiendo todo, gracias por estos momentos. Ahora cada uno sigue su propio camino, les deseo todo lo mejor del mundo y se que van a lograr grandes cosas.

A mis abuelitas mexicanas, Maru, Amanda, gracias por alojarme, por siempre estar al pendiente, y por ser tan conectadas.

Gracias Doudou por seguir atento a mi crecimiento académico y personal. Valoro mucho esta amistad que se forjó, a nuestra imagen.

A Camby y Marian mis mejores descubrimientos de estos últimos años, gracias por existir y por creer tanto en mí. Las admiro mucho.

A la que siempre estuvo y siempre estará, Agathe, mi Golumita, te quiero un chingo. Nuestra amistad desafía el espacio y el tiempo.

Por último, y lo más importante, mi familia, quién siempre me apoya desde Francia. Gracias Mummy, Grooty, Toubz, Julie, Timout, Leuneu, Francky, Thalie, Tibo, Mathilde, y Marraine Arlette, por siempre estar a mi lado a pesar de la distancia. No hay palabras para describir la fuerza del amor que nos une.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xiv
Secuencias de aminoácidos y números de acceso	xvi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Agave lechuguilla</i> Torrey	5
2.1.1 Ecología	5
2.1.2 Usos	6
2.1.2.1 La industria Ixtlera	6
2.1.2.2 Productos derivados de la lechuguilla	9
2.1.3 Plantaciones comerciales	9
2.2 Aprovechamiento integral de la lechuguilla	10
2.2.1 El <i>guishe</i>	10
2.2.2 Biorrefinería	12
2.3 Fitoquímicos	13
2.3.1 Metabolitos especializados	13
2.3.2 Flavonoides	13
2.3.3 Los flavonoides de Agaves	15
2.4 Actividades biológicas de los flavonoides de agaves	17
2.5 Identificación de flavonoides	23
2.5.1 Química analítica	23
2.5.2 Las “Omicas”	27
2.6 Evaluación de las propiedades biológicas	29
2.6.1 <i>In vitro e in vivo</i>	29
2.6.2 <i>In silico</i>	32
2.7 Obtención de los flavonoides	33
2.7.1 Procesamiento de la biomasa	33
2.7.1.1 Secado	33
2.7.1.2 Pretratamiento de la biomasa	33
2.7.2 Técnicas de extracción	35
2.7.2.1 Método convencional	35
2.7.2.2 Métodos no convencionales	36
2.7.2.3 Extracción por fluidos supercríticos	37
2.8 Requisitos para establecimiento de fichas técnicas	40
3 JUSTIFICACIÓN	41
4 HIPÓTESIS	43
5 OBJETIVOS	44
5.1 Objetivo general	44
5.2 Objetivos particulares	44
6 MATERIAL Y MÉTODOS	45
6.1 Caracterización de los flavonoides en el <i>guishe</i>	45
6.1.1 Identificación mediante transcriptómica	45

6.1.1.1	Material vegetal	45
6.1.1.2	Extracción de ARN de guishe y hoja de <i>Agave lechuguilla</i>	46
6.1.1.3	Elaboración de las librerías y secuenciación RNA-Seq.....	46
6.1.1.4	Ensamblaje del transcriptoma de novo	47
6.1.1.5	Anotación funcional	47
6.1.1.6	Identificación de las enzimas	48
6.1.1.7	Expresión diferencial.....	48
6.1.1.8	Enriquecimiento de ontologías de genes (GO enrichment)	49
6.1.2	Análisis bioquímicos del contenido en flavonoides del <i>guishe</i>	49
6.1.2.1	Extracción de los flavonoides.....	49
6.1.2.2	Determinación de contenido en flavonoides de los extractos.....	49
6.1.2.2.1	HPLC-ESI-Q-TOF-MS	50
6.1.2.2.2	HPLC-PDA-ESI-IT-MS/MS.....	51
6.1.2.2.3	Cuantificación por cromatografía líquida	51
6.2	Evaluación del potencial bioactivo	52
6.2.1	Predicción <i>in silico</i>	52
6.2.2	Prueba <i>in vitro</i>	53
6.3	Obtención de los flavonoides bioactivos del <i>guishe</i>	53
6.3.1	Variabilidad geográfica del perfil en flavonoides.....	54
6.3.1.1	Muestreo.....	54
6.3.1.2	Datos ambientales	55
6.3.1.3	Extracción de los flavonoides.....	55
6.3.2	Procesamiento del guishe	55
6.3.2.1	Material vegetal	55
6.3.2.2	Método de secado	55
6.3.2.3	Almacenamiento.....	56
6.3.3	Pretratamiento enzimático	56
6.3.3.1	Material vegetal	56
6.3.3.2	Optimización de la hidrólisis enzimática	56
6.3.3.3	Validación experimental	58
6.3.4	Extracción de los flavonoides.....	59
6.3.4.1	Extracciones convencionales	59
6.3.4.1.1	Extracción por fluidos supercríticos.....	60
6.3.4.1.1.1	Optimización.....	60
6.3.4.1.1.2	Validación experimental.....	61
6.3.5	Variables de respuesta	62
6.3.5.1	Rendimientos	62
6.3.5.2	Contenido total de fenoles	62
6.3.5.3	Contenido total de flavonoides	63
6.3.5.4	Perfil específico en flavonoides	63
6.3.5.5	Actividad antioxidante	64
6.3.6	Análisis de datos.....	64
6.4	Elaboración de las fichas técnicas del producto final.....	65
7	RESULTADOS	66
7.1	Identificación de flavonoides.....	66
7.1.1	Transcriptómica.....	66
7.1.1.1	Extracción de ARN.....	66
7.1.1.2	Elaboración de librerías y secuenciación	66
7.1.1.3	Ensamble <i>de novo</i>	66

7.1.1.4	Anotación funcional	67
7.1.1.4.1	Blast.....	67
7.1.1.5	Expresión diferencial.....	72
7.1.1.6	Enriquecimiento de ontología de genes	73
7.1.1.7	Perfiles de expresión de los genes de biosíntesis de los flavonoides.....	73
7.1.2	Identificación de los flavonoides por bioquímica analítica.....	76
7.1.3	Cuantificación de flavonoides	78
7.1.4	Potencial bioactivo	79
7.1.4.1	Predicción <i>in silico</i>	79
7.1.4.2	Prueba <i>in vitro</i>	86
7.2	Obtención de flavonoides.....	86
7.2.1	Variabilidad geográfica.....	86
7.2.1.1	Datos ambientales	86
7.2.1.2	Perfiles de flavonoides.....	87
7.2.1.3	Actividad antioxidante	91
7.2.2	Procesamiento de la muestra	91
7.2.2.1	Método de secado	91
7.2.2.1.1	Perfiles en flavonoides.....	91
7.2.2.1.2	Actividad antioxidante	94
7.2.2.2	Almacenamiento.....	95
7.2.2.3	Pretratamiento enzimático.....	96
7.2.2.3.1	Formulación de un mix enzimático.....	96
7.2.2.3.2	Mezclas comerciales	99
7.2.2.3.3	Análisis comparativo.....	100
7.2.2.3.4	Rendimiento de extracción.....	102
7.2.2.3.5	Contenido total en fenoles y flavonoides.....	103
7.2.2.3.5.1	Perfiles específicos de flavonoides.....	105
7.2.2.3.5.2	Actividad antioxidante.....	106
7.2.2.3.6	Validación experimental	108
7.2.2.4	Extracción de los flavonoides.....	109
7.2.2.4.1	Solvente de extracción.....	109
7.2.2.4.2	Optimización de la extracción por fluidos supercríticos.....	110
7.2.2.4.2.1	Rendimientos de extracción.....	110
7.2.2.4.2.2	Contenidos en fenoles y flavonoides totales	112
7.2.2.4.2.3	Perfil específico en flavonoides.....	114
7.2.2.4.3	Actividad antioxidante	116
7.2.2.4.4	Validación experimental	117
7.3	Ficha técnica	119
8	DISCUSION	121
8.1	Contenido en flavonoides del <i>guishe</i> de <i>A. lechuguilla</i>	121
8.1.1	Transcriptoma <i>de novo</i> de <i>A. lechuguilla</i>	121
8.1.2	Expresión diferencial	122
8.1.3	Los flavonoides en el <i>guishe</i>	124
8.2	Propiedades biológicas.....	129
8.3	Obtención de flavonoides del <i>guishe</i>	134
8.3.1	Aprovechamiento a nivel regional y manejo agronómico.....	134
8.3.2	Procesamiento de la muestra	138
8.3.2.1	Método de secado	138
8.3.2.2	Almacenamiento.....	140

8.3.3	Pretratamiento enzimático de la muestra	140
8.3.4	Extracción	143
8.4	Uso del extracto.....	146
9	CONCLUSIONES	149
9.1	Conclusiones.....	149
9.2	Perspectivas.....	150
10	LITERATURA CITADA	152
11	ANEXOS	181
Anexo A	– Calidad de las librerías de RNA-Seq.....	181
Anexo B	– Curvas estándares de los flavonoides	183
Anexo C	– Predicción <i>in silico</i> de las proteínas blanco	184
Anexo D	– Taxonomía de las especies asociadas a la lechuguilla.....	191
ANEXO E	– Predicción ADMET <i>in silico</i>.....	192
Anexo F	– Artículo Publicado.- Transcriptome-based metabolic profiling of flavonoids in <i>Agave lechuguilla</i> waste biomass.	194
Anexo G	– Artículo Publicado.-High Throughput Profiling of Flavonoid Abundance in <i>Agave lechuguilla</i> Residue-Valorizing under Explored Mexican Plant.....	235
Anexo H	– Artículo Publicado.- Early Optimization Stages of <i>Agave lechuguilla</i> Bagasse Processing Towards Biorefinery: Drying Procedure and Enzymatic Hydrolysis for Flavonoids Extraction.	255

Lista de figuras

Figura 1. Individuo de <i>Agave lechuguilla</i> , Jardín del INIFAP, Saltillo, Coahuila, México.....	5
Figura 2. Área de distribución del <i>Agave lechuguilla</i> (Naturalista, 2021).....	6
Figura 3. a, b y c) Etapas de recolección del cogollo y c) tallado mecánico para la obtención de fibra, Coahuila, México. Fotos por Zoé Pelletier-Morreeuw.	8
Figura 4. Elementos que agregan valor a la cadena del Ixtle. Reproducido de Secretaria de Economía (2009).	8
Figura 5. <i>Guishe</i> de <i>Agave lechuguilla</i> obtenido por tallado mecánico, Coahuila, México. Foto por Zoé Pelletier-Morreeuw	11
Figura 6. Balance de materia para la transformación del <i>guishe</i> en productos de valor agregado. Reproducido de Díaz-Jiménez <i>et al.</i> (2019).....	12
Figura 7. Esqueleto básico de los flavonoides. Adaptado de Taiz y Zeiger (Taiz y Zeiger, 2003).....	14
Figura 8. Diversificación de la vía de biosíntesis de los flavonoides. Adaptado de Liu <i>et al.</i> (Liu <i>et al.</i> , 2017).....	15
Figura 9. Cromatograma del HPLC-UV (280 nm) de un extracto complejo de fenoles. Adaptado de Sakakibara <i>et al.</i> (2003).....	23
Figura 10. Separación de 25 flavonoides estándares, en orden: erocitrina, neoerocitrina, robinetina, narirutina, naringina, rutina hesperidina, neohesperidina, isohiofolina, roifolina, diosmina, neodiosmina, neoponcirina, quercetina, poncirina, luteolina, kaempferol, apigenina, isorhamnetina, diosmetia, rhamnetina, isoakuranetina, sinensetina, acacetina y targeretin. Adaptado de Stefova <i>et al.</i> (2003).	24
Figura 11. Perfil de fragmentación de la apigenina-7- <i>O</i> -neohesperidósido y reacción de Retro-Diels-Alder del ion molecular de la apigenina. Adaptado de Cuyckens y Claeys (2004), y Merken y Beecher (2000).	26
Figura 12. Proceso de identificación de compuestos naturales en extractos complejos. Adaptado de Anatasov <i>et al.</i> (2021).	27
Figura 13. Hidrólisis enzimática para la liberación de compuestos bioactivos ligados a la matriz lignocelulósica de las plantas. Adaptado de Gil-Chavez <i>et al.</i> (2013).	35
Figura 14. Diagrama de estado de un fluido en función del aumento de temperatura y presión. Adaptado de Logan (2003).....	38
Figura 15. Concentración de compuestos fenolicos (mg/g), concentración en fenoles totales y IC50 (µg/mL) de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con diferentes métodos de extracción. Reproducido de Santos <i>et al.</i> (2017).	39
Figura 16. Diagrama de flujo de la metodología para la identificación de los flavonoides del <i>guishe</i> . 45	
Figura 17. Diagrama de flujo de la metodología usada para establecer las condiciones adecuadas de obtención de los flavonoides de interés comercial a partir del <i>guishe</i>	54
Figura 18. Hidrólisis enzimática del <i>guishe</i> a nivel matraz y secado de la biomasa hidrolizada en charolas.	59
Figura 19. Sistema de extracción supercrítica con equipo Waters® operado con el programa Thar Instruments Process Suite.....	61
Figura 20. Número de genes codificando para enzimas de biosíntesis de los flavonoides identificados en el transcriptoma <i>de novo</i> de <i>A. lechuguilla</i> , clasificados en a) 8 <i>clusters</i> biosintéticos, b) subdivisiones del <i>cluster</i> 9, y c) <i>clusters</i> de factores de transcripción (10) y de transporte de los flavonoides (11).....	72

- Figura 21.** Análisis de componentes principales de los perfiles de expresión de los genes en las librerías de *guishe* y hojas completas. 72
- Figura 22.** Diagrama de Venn de las ontologías de genes sobre regulados en la hoja y el *guishe*. 73
- Figura 23.** Ontologías de genes involucrados los procesos biológicos más relevantes identificados en los genes sobre expresados en *guishe* según el p-value obtenido por análisis de expresión diferencial. 74
- Figura 24.** Predicción de las rutas de biosíntesis de los flavonoides en el *guishe* de *A. lechuguilla*. 75
- Figura 25.** Concentración en los flavonoides cuantificados por HPLC en $\mu\text{g/g}$ PS en extractos etanólicos y metanólicos en orden. F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delphinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, N: naringenina, y Q: quercetina. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA; $n=3$, $p<0.05$). 79
- Figura 26.** Mapa de color de las probabilidades de acoplamiento de los flavonoides agliconas del *guishe* de *A. lechuguilla* con las proteínas blanco de diferentes familias de fosfolipasas A2. 81
- Figura 27.** Modelización *in silico* de acoplamiento de la apigenina (flavona) con el receptor membranal TNF-R1, a) estructura de la apigenina y posiciones de los puentes de hidrógeno con los amino ácidos del receptor, b) todos los sitios viables de acoplamiento y modelización de la dinámica molecular (torsión 5\AA), c) receptor TNF-R1 con un modelo de acoplamiento de la apigenina, d) vista de la complementaridad de superficie hidrofóbica de la apigenina con el receptor. 82
- Figura 28.** Modelización *in silico* de acoplamiento de los flavonoides agliconas del *guishe* con el receptor membranal TNF-R1. 83
- Figura 29.** Modelización *in silico* de acoplamiento de un flavonol mono y di-glicosilado con el receptor TNF-R1. 83
- Figura 30.** Modelización *in silico* de acoplamiento de los flavonoides agliconas del *guishe* con la enzima PLA2. 84
- Figura 31.** Modelización *in silico* de acoplamiento de los derivados glicosilados de cianidina con la enzima PLA2. 85
- Figura 32.** Curva cinética ($y = 11.497\ln(x) - 4.8927$; $R^2 = 0.9716$) de la actividad antioxidante de extracto etanólico del *guishe* de *A. lechuguilla* en porcentaje de inhibición del radical DPPH (% DPPH). 86
- Figura 33.** Rendimientos de extracción (UAE; EtOH 70%) en base seca (% PS) obtenidos para el *guishe* de *A. lechuguilla* de tres sitios geográficos diferentes. Las letras diferentes indican una diferencia significativa (ANOVA; $n=3$, $p<0.05$). 88
- Figura 34.** Contenido total en fenoles (TPC; mg GAE/g PF) y flavonoides (TFC; mg QE/g PF) de los extractos etanólicos de *guishe* de *A. lechuguilla* de tres sitios de muestreo. Las letras diferentes indican diferencia significativa respectivamente para TPC y TFC (ANOVA; $n = 12$, $p < 0.05$). 88
- Figura 35.** Actividad antioxidante en porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (% I DPPH) de los extractos etanólicos obtenidos del *guishe* de *A. lechuguilla* recolectado en tres sitios diferentes. Las letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $n=12$, valor $p < 0.05$). 91
- Figura 36.** Rendimientos de extracción en porcentaje en base seca (% PS) obtenidos para la extracción convencional del *guishe* de *A. lechuguilla* liofilizado en la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D) y secado al sol (S). Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis; $n=3$, valor $p < 0.05$). 92
- Figura 37.** Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PF) y flavonoides totales (TFC; mg QE/g PF) en extractos etanólicos de *guishe* de *A. lechuguilla* liofilizado a la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D) y secado al sol (S). Letras diferentes indican diferencias significativas respectivamente para TPC y TFC (ANOVA; $n=12$, $p < 0,05$). 92

Figura 38. Espectros de HPLC-UV (280 nm) de los extractos etanolicos obtenidos del *guishe* secado por a) liofilización a la oscuridad, b) al horno a la oscuridad, c) liofilización con exposición a la luz, y d) secado al sol. 93

Figura 39. Concentración en los flavonoides cuantificados por HPLC-UV (280 nm) en $\mu\text{g/g}$ PS en extractos etanólicos obtenidos a partir de *guishe* liofilizada a la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D), y secado al sol (S). F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delfinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, N: naringenina, y Q: quercetina. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskall-Wallis; $n=3$, $p<0.05$). 94

Figura 40. Capacidad de captación de los radicales libres en % de inhibición del reactivo DPPH de los extractos etanólicos de *guishe* de *A. lechuguilla* liofilizado en la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D) y secado al sol (S). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA; $n=4$, $p<0.05$). 95

Figura 41. Concentración en los flavonoides cuantificados por HPLC-UV (280 nm) en $\mu\text{g/g}$ PS en extractos etanólicos obtenidos a partir de *guishe* liofilizado sin tiempo de almacenamiento (t_0) y después de nueve meses almacenado (t_9). F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delfinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, N: naringenina, y Q: quercetina. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskall-Wallis; $n=3$, $p<0.05$). 95

Figura 42. Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PF) en extractos etanólicos de *guishe* previamente hidrolizado con diferentes concentraciones de a) celulasa (5-15 IU), b) pectinasa (5-15 IU), c) lacasa (5-15 IU), y d) dependiendo del pH (4-6) de incubación. La línea discontinua representa el S/N ratio para ANOVA en modelo de Taguchi..... 97

Figura 43. Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PS) en extractos etanólicos en función de a) la mezcla enzimática con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP), y 0:1:2 (CPP), b) pH (4-6), c) temperatura (30-50°C), y d) tiempo (0.5-2.5 h). La línea discontinua representa la relación S/N para ANOVA en modelo de Taguchi. 98

Figura 44. Espectros de HPLC-UV (280 nm) de los extractos etanolicos obtenidos después de pretratamiento sin lacasa (arriba) y con lacasa (abajo) a pH 4. F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delfinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, M: Miricetina, N: naringenina, y Q: quercetina. 99

Figura 45. Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PS) en extractos etanólicos en función de a) la mezcla enzimática (Ultraflo y Viscozyme), b) pH (4-6), c) temperatura (30-50°C), y d) tiempo (0.5-2.5h). La línea discontinua representa la relación S/N para ANOVA en modelo de Taguchi..... 100

Figura 46. Superficie de respuesta del rendimiento de extracción (% PF) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Viscozyme© (Visco) y Ultraflo© (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi ($n=3$, $p>0.05$). 102

Figura 47. Superficie de respuesta del contenido en fenoles totales (mg/g PF) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Viscozyme© (Visco) y Ultraflo© (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi ($n=3$, $p>0.05$). 103

Figura 48. Superficie de respuesta del contenido en flavonoides totales (mg QE/g PF) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Viscozyme© (Visco) y Ultraflo© (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el

control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi (n=3, p>0.05). 104

Figura 49. Concentración de flavonoides obtenidos por HPLC-UV (280 nm) en ($\mu\text{g/g}$ PS) en extractos etanólicos del *guishe* hidrolizado utilizando dos mezclas enzimáticas comerciales (Ultraflo y Viscozyme), dos mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), y 0:1:2 (CP), y el tratamiento de control sin enzimas. a) cianidina (Cy), delfinidina (D), hesperidina (H), quercetina (Q), apigenina (A), y kaempferol (K), b) flavanona (F), isorhamnetina (I), y c) catequina (Ca), y naringenina (N). Letras diferentes indican una diferencia significativa (Kruskal-Wallis; n=3, p < 0.05). 106

Figura 50. Superficie de respuesta de la capacidad de captación de radicales DPPH (AA, %I DPPH) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Viscozyme® (Visco) y Ultraflo® (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi (n=3, p>0.05). 107

Figura 51. Actividad antioxidante en % de inhibición del reactivo DPPH de los extractos etanólicos según el mix enzimático. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA; n=12, p<0.05). 108

Figura 52. Predicción basada en el modelo de Box-Behnken de la influencia de cada variable en el rendimiento de extracción (% PS). 111

Figura 53. Superficie de respuesta del rendimiento de extracción (% PS) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken (n=3, p<0.05). 112

Figura 54. Superficie de respuesta del contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PS) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken (n=3, p<0.05). 113

Figura 55. Superficie de respuesta del contenido en flavonoides totales (TFC; mg QE/g PS) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken (n=3, p<0.05). 114

Figura 56. Espectros de HPLC-UV (280 nm) de los tres puntos centrales. 115

Figura 57. Superficie de respuesta de la abundancia relativa de a) quercetina, b) hesperidina y c) cianidina en función de la proporción de co-solvente y presión (a) o temperatura (b, y c). La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken (n=3, p<0.05) 116

Figura 58. Superficie de respuesta de la capacidad antioxidante (% I DPPH) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken (n=3, p<0.05) 117

Figura 59. Espectro de HPLC-UV (280 nm) de los extractos obtenidos en la validación experimental de la extracción por fluidos supercriticos. 118

Figura 60. Metabolismo celular de la síntesis y acumulación de los flavonoides en el *guishe* de *A. lechuguilla*. 129

Figura 61. Factores que influyen en el contenido en flavonoides del *Agave lechuguilla* silvestre y cultivada. 138

Lista de tablas

Tabla 1. Actividades biológicas y contenidos en flavonoides reportados en extractos de Agaves	18
Tabla 2. Referencias de acceso de las secuencias de los oligos desarrollados para genes codificantes para enzimas de síntesis de los flavonoides en NCBI. Adaptado de Peukert <i>et al.</i> (2013).	28
Tabla 3. BioProjects de especies de agaves registrados en NCBI.	29
Tabla 4. Proporciones de los carbohidratos en la matriz lignocelulósica del <i>Agave lechuguilla</i> Adaptado de Carmona <i>et al.</i> (2017).	34
Tabla 5. Parámetros físicos del punto crítico de tres solventes, CO ₂ , etanol y agua.	38
Tabla 6. Lista de los estándares de flavonoides usados para la cuantificación por HPLC-UV.	52
Tabla 7. Diseño de experimentos basado en el modelo de Taguchi L9 generado de manera aleatoria para 4 variables a 3 factores: pH (4-6) y concentraciones de lacasa, celulasa y pectinasa (5-15 UI). ..	57
Tabla 8. Diseño de experimentos basado en el modelo de Taguchi L9 generado de manera aleatoria para 4 variables a 3 factores: pH (4-6), proporciones de lacasa, celulasa y pectinasa en el mix enzimático (0-10 UI), temperatura (30-50°C) y tiempo de incubación (0.5-2.5 h).	58
Tabla 9. Diseño de experimentos basado en el modelo de Taguchi L8 generado de manera aleatoria para 4 variables a 2 factores: el mix enzimático comercial, pH (4-6), temperatura (30-50°C) y tiempo de incubación (0.5-2.5 h).	58
Tabla 10. Diseño experimental basado en el modelo de Box-Behnken con tres puntos centrales generado de manera aleatoria (JMP5) para evaluar el efecto de tres variables a tres niveles: porcentaje de co-solvente (EtOH 70%), temperatura (T°C), y presión (P), en los rendimientos y calidad de obtención de flavonoides a partir del <i>guishe</i>	60
Tabla 11. Cantidad e integridad de los <i>pools</i> de ARN total del <i>guishe</i> y de las hojas de <i>A. lechuguilla</i>	66
Tabla 12. Estadísticos del ensamble <i>de novo</i> del <i>Agave lechuguilla</i> obtenido con Trinity.	67
Tabla 13. Enzimas de la biosíntesis de los flavonoides (abreviatura y nombre común) identificadas en el transcriptoma <i>de novo</i> del <i>A. lechuguilla</i> por análisis de BLAST contra UniProtKB, la clasificación de las enzimas (EC) y las ontologías de genes asociadas (GO IDs).	68
Tabla 14. Enzimas de modificación de los flavonoides (abreviatura y nombre común) identificadas en el transcriptoma <i>de novo</i> del <i>A. lechuguilla</i> por análisis de BLAST contra UniProtKB, la clasificación de las enzimas (EC) y las ontologías de genes asociadas (GO IDs).	69
Tabla 15. Factores de regulación de la biosíntesis de los flavonoides (abreviatura común y función) identificados en el transcriptoma <i>de novo</i> del <i>A. lechuguilla</i> por análisis de BLAST contra UniProtKB y las ontologías de genes asociadas (GO IDs).	70
Tabla 16. Flavonoides identificados tentativamente por HPLC-ESI-MS/MS en extractos etanólicos y metanólicos de <i>guishe</i> según la masa experimental (m/z) obtenida en polaridad negativa ([M+H] ⁺) y negativa ([M-H] ⁻), y los iones moleculares por orden de abundancia (ESI-MS/MS).	76
Tabla 17. Condiciones geoclimáticas promedio en agosto para los tres sitios muestreados según la base de datos climáticos de la CONAGUA.	87
Tabla 18. Concentración de flavonoides (µg/g PS) obtenida por análisis cuantitativo por HPLC-UV (280 nm) de los extractos etanólicos de <i>guishe</i> de <i>A. lechuguilla</i> recolectados en tres sitios diferentes.	89
Tabla 19. Perfil cualitativo de los flavonoides en los extractos etanólicos de <i>guishe</i> de <i>A. lechuguilla</i> muestreado en tres sitios diferentes. Los m/z experimentales y los fragmentos principales se obtuvieron mediante análisis de HPLC-MS en polaridad negativa ([M-H] ⁻).	90

Tabla 20. Rendimientos de extracción, contenido en fenoles (TPC) y flavonoides (TFC) totales, y actividad antioxidante (% I DPPH) en respuesta a los diferentes tratamientos de hidrólisis enzimática aplicada en los tres diseños experimentales.....	101
Tabla 21. Rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC), actividad antioxidante (AA), y concentraciones específicas de flavonoides en extractos etanólicos obtenidos de <i>guishe</i> no hidrolizado e hidrolizado.	109
Tabla 22. Rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC), actividad antioxidante (AA), y concentraciones específicas de flavonoides en los extractos metanólicos (MetOH) y etanólicos (EtOH) del <i>guishe</i> de <i>A. lechuguilla</i>	110
Tabla 23. Propiedades fisicoquímicas de los flavonoides del <i>guishe</i> de <i>A. lechuguilla</i>	110
Tabla 24. Tiempo de retención (min) de los flavonoides en dos sistemas HPLC-UV diferentes.	115
Tabla 25. Rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC), actividad antioxidante (AA), obtenido por extracción por fluidos supercríticos (SFE), extracción asistida por ultrasonido (UAE) y extracción convencional (Conv) a partir de <i>guishe</i> hidrolizado.	118
Tabla 26. Ficha técnica del extracto para recomendación	119

Secuencias de aminoácidos y números de acceso

Números de accesos NCBI

- BioProject: [PRJNA598966](#)
- GenBank: GIUJ00000000.1
- BioSamples: [SAMN13735560](#), [SAMN13735561](#), [SAMN13735562](#), [SAMN13735563](#), [SAMN13735564](#)
- Sequence Read Archive (SRA): [SRR11230731](#), [SRR11230732](#), [SRR11230733](#), [SRR11230734](#), [SRR11230735](#)
- Transcriptome Shotgun Assembly (TSA): [GIUJ01000001-GIUJ01969872](#)

1 INTRODUCCIÓN

La recolección de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torrey) para la obtención de material fibroso (*Ixtle*) es una de las principales actividades económicas para los campesinos de las zonas áridas y semiáridas de México. La producción anual de fibra se estima en 55.98 kg/ha (Taylor *et al.*, 2017), y se destina principalmente (93% de la producción) a la exportación (Castillo-Quiroz *et al.*, 2012). La venta del *ixtle* representa un medio de subsistencia para más de 20,000 pobladores y sus familias (Nobel, 1998; Pando-Moreno *et al.*, 2008; Castillo-Quiroz *et al.*, 2012). Sin embargo, con un precio que varía entre 15 y 30 \$MXN/kg (Pando-Moreno *et al.*, 2008), estas comunidades siguen en estado de pobreza y marginación (CONAPO, 2010; CONEVAL, 2015).

Por otro lado, el tallado manual o mecánico de las hojas para la obtención del *ixtle*, genera una pulpa vegetal denominada “*guishe*” que representa el 85% del peso fresco de la cosecha. La mayor parte de este subproducto se desecha en campo abierto o se quema, provocando problemas de contaminación ambiental (Castillo Quiroz *et al.*, 2005) además de presentar un riesgo para la salud humana y animal (Mathews, 1937; Gentry, 1982; Nobel, 1998; Raulf *et al.*, 2019). Por esta razón, desde los aspectos económicos, sociales y ambientales, el aprovechamiento integral de la lechuguilla es una prioridad a nivel nacional y es indispensable desarrollar alternativas para el uso del *guishe*, que permitan un mejor manejo del residuo.

Desde 1996, la recolección de las hojas de *A. lechuguilla* como recurso natural comunitario está regulada por una Norma Oficial Mexicana (NOM-008-SEMARNAT-1996) (SEMARNAT, 2003), que asegura la perennidad de las poblaciones silvestres de *Agave lechuguilla*. Por lo que, el *guishe* que se acumula puede ser considerado como una biomasa renovable y abundante con más de 150 mil toneladas producidas anualmente (Pando-Moreno *et al.*, 2008; Castillo-Quiroz *et al.*, 2012). Y debido a esta acumulación, puede considerarse como un recurso natural valioso dentro de un esquema de biorrefinería para el aprovechamiento integral de la lechuguilla (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Estudios previos demuestran la implementación, a nivel piloto, de la producción de biocombustibles a partir de la fracción sólida del *A. lechuguilla* (Ortíz-Méndez *et al.*, 2017; Morales-Martínez *et al.*, 2020). De la fracción jugosa, se reporta su potencial de aprovechamiento basado en su contenido en

saponinas, esteroides y azúcares (Hernández *et al.*, 2005; Juárez *et al.*, 2014; Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Sin embargo, para la factibilidad de una biorrefinería a mayor escala, la diversificación de los productos derivados es deseable, así como propuesto para otras industrias de Agaves (Santos-Zea *et al.*, 2012; Nava-Cruz *et al.*, 2015; Barreto *et al.*, 2017; Palomo-Briones *et al.*, 2018). Recientemente, el aprovechamiento de residuos agroindustriales se dirige a la obtención de fitoquímicos de alto valor agregado (Mehmood *et al.*, 2021; Reyes *et al.*, 2022).

De los fitoquímicos; moléculas de bajo peso molecular producidos por las plantas; se distinguen los metabolitos especializados, o secundarios, en respuesta a condiciones bióticas y abióticas específicas (Mithöfer y Maffei, 2017; Zahedi *et al.*, 2019). Entre ellos, los polifenoles, en particular los flavonoides son el grupo más diverso y ubicuo en el reino *Plantae* con más de 9,000 derivados descritos (Wu *et al.*, 2018; Nakayama *et al.*, 2019; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019; Corso *et al.*, 2020). Por su diversidad estructural y funcional, los flavonoides se consideran como compuestos de alta eficiencia para su uso como fármacos, nutraceuticos y cosmeceuticos (Lucci *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017a; Perez-Vizcaino y Fraga, 2018; Tungmunnithum *et al.*, 2018). Por lo tanto, el mercado de los flavonoides como productos comerciales se estableció en 410 millones de dolares americanos (USD) en 2015 y se estima una tasa anual compuesta de crecimiento del mercado global de 40% (Gran View Research, 2016).

Los extractos de *A. lechuguilla*, que contienen flavonoles y derivados glicosilados han mostrado potencial antioxidante y anticancerígeno, sugiriendo aplicaciones cosméticas, nutraceútics y farmacológicas (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013b; a; Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018). Asimismo, se han reportado propiedades antifúngicas (Castillo-Reyes *et al.*, 2015) y antibacteriana (Ahumada-Santos *et al.*, 2013) dirigidas a aplicaciones agrícolas. Mientras que los efectos benéficos de extractos que contienen saponinas y flavonoles se han estudiado en salud animal para aplicaciones pecuarias (Jasso-Padilla *et al.*, 2017), y acuícolas (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). Por tal motivo, los diversos usos mencionados sugieren el potencial del *guishe* de la lechuguilla para obtención de polifenoles bioactivos.

Sin embargo, a pesar de las aplicaciones demostradas hasta ahora, el perfil en flavonoides de los extractos derivados de *A. lechuguilla* solo se reporta brevemente, aunque podrían ser

los responsables de las propiedades biológicas observadas. Los perfiles de flavonoides que se reportan, fueron identificados mediante análisis de cromatografía líquida o de gases acoplado masas (HPLC-MS y GC-MS por sus siglas en inglés) (Almaraz-abarca *et al.*, 2009; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a; Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018; Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). Recientemente, se han empleado herramientas *in silico* como un método novedoso para superar los límites de la bioprospección mediante el enfoque tradicional (Rai *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2019). Para esto, el uso combinado de las Omicas con herramientas bioinformáticas ha permitido generar nuevo conocimiento en cuanto al metabolismo específico de los agaves (Simpson *et al.*, 2011; Gross *et al.*, 2013; Shakeel *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2016; Cervantes-Pérez *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018), así como el descubrimiento de nuevos compuestos fenólicos sintetizados por las plantas (Rivas-Morales *et al.*, 2016). De igual manera, el estudio de la relación estructura-actividad de los flavonoides por modelización *in silico* favorece el descubrimiento de propiedades potenciales, por lo que las aplicaciones de dichos compuestos se pueden dirigir de manera específica (Prakash *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020b).

Además, en el ambiente comercial actual, no solo se buscan compuestos naturales de múltiples usos, sino también compuestos obtenidos por procesos sustentables (Arevalo-Gallegos *et al.*, 2017; Reyes *et al.*, 2022). En este contexto, el aprovechamiento de residuos agroindustriales tales como el *guishe* presenta un interés particular (FAO, 2019; Mehmood *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2021). Sin embargo, la obtención de fitoquímicos a partir de estas biomásas está sujeta a desafíos en el manejo y procesamiento para preservar los fitoquímicos y favorecer su extracción (Santos-Zea *et al.*, 2012; Arevalo-Gallegos *et al.*, 2017). En respuesta a esta problemática, se han probado varios pretratamientos del material lignocelulósico de la lechuguilla, tales como: térmicos, ácidos y alcalinos. Si bien son adecuados para producción de bioetanol (Morales-Martínez *et al.*, 2020; Ríos-González *et al.*, 2021), estos procesos tienden a alterar las propiedades químicas y biológicas de los compuestos de alto valor como los flavonoides (Carmona *et al.*, 2017). Como alternativa, el uso de enzimas lignocelulósicas se está desarrollando debido a que preserva la integridad de las biomoléculas de interés (Bilal y Iqbal, 2019).

Adicionalmente, las regulaciones relacionadas con el uso de solventes para procesos de extracción son estrictas, tanto para la calidad del producto final, como para limitar el

impacto ambiental (FAO, 2019; FDA, 2020). En respuesta, se han desarrollado métodos extractivos con menores costos energéticos, que limitan el uso de solventes tóxicos. Entre estos se destaca la extracción por fluidos supercríticos como una alternativa fácilmente escalable para la obtención de bioactivos (Del Valle, 2015; Correa *et al.*, 2017). Esta técnica de extracción aplicada a diversas materias vegetales ha mostrado su eficiencia para la obtención dirigida de flavonoles (Correa *et al.*, 2017; Espinosa-Pardo *et al.*, 2017), flavonas (Liza *et al.*, 2010), isoramnetina y derivados glicosilados (Antunes-Ricardo *et al.*, 2017, 2018), y antocianinas (Babova *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016a; Monroy *et al.*, 2016). Además de la alta pureza de los extractos que se obtienen, también se conservan las bioactividades (Paes *et al.*, 2014; Babova *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016a; Monroy *et al.*, 2016; Espinosa-Pardo *et al.*, 2017), generando productos de alto valor para su uso posterior en diversas aplicaciones. Con base en lo anterior, en este trabajo se contempla al *guishe* de *A. lechuguilla* como una fuente potencial de flavonoides de alto valor para el desarrollo de productos comerciales.

Para ello, se caracterizó su perfil fitoquímico, usando la transcriptómica como método predictivo y confirmando su presencia con métodos analíticos. De tal manera que fuera posible estimar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas por modelización *in silico*. Para la obtención de los flavonoides bioactivos a partir de *guishe*, el bioproceso propuesto considera: el manejo post cosecha del *guishe* obtenido después del tallado de la lechuguilla, un pre-tratamiento enzimático y la extracción supercrítica de los flavonoides de interés industrial. De esta manera, se sustentará el uso del *guishe* como fuente de flavonoides para promover la implementación de una biorrefinería. Asimismo, se vislumbra el desarrollo económico de las comunidades de recolectores de lechuguilla, a través de un bioproceso sustentable y con responsabilidad social.

2 ANTECEDENTES

2.1 *Agave lechuguilla* Torrey

2.1.1 Ecología

El *Agave lechuguilla* descrita por Torrey en 1859 es parte de la familia de las *Asparagaceae*, aunque fue anteriormente clasificada como *Agavaceae* (Tropicos, 2018). Nativa del desierto de Chihuahua, la lechuguilla se caracteriza por formar rosetas de alrededor de 20 a 40 hojas de aproximadamente 50 cm (Nobel y Quero, 1986; Reyes-Agüero *et al.*, 2000) (Fig. 1).



Figura 1. Individuo de *Agave lechuguilla*, Jardín del INIFAP, Saltillo, Coahuila, México.

Es una planta suculenta que, por su morfología característica y su metabolismo CAM (Crassulean Acid Metabolism por sus siglas en inglés), está adaptada a las condiciones ambientales extremas de baja precipitación, con un promedio anual de 150 mm, con el 60% de las precipitaciones anuales concentradas en los meses de verano, y de temperatura que varía entre -18 y 49°C a lo largo del año (Nobel y Quero, 1986). Se encuentra preferencialmente en suelos calizos, calcáreos rocosos y arcillosos de pH de 7.2 a 8.5 (Burciaga *et al.*, 2011) aunque también es posible encontrarla en una gran diversidad de sustratos (Nobel, 2003). Por estas adaptaciones, el *A. lechuguilla* está presente en los tres tipos de vegetación xerófila de las zonas áridas y semi áridas del altiplano mexicano y del sur de Estados Unidos (Reyes-Agüero *et al.*, 2000) (Fig. 2). Su distribución a nivel nacional recubre el 10% del territorio con alrededor de 20 millones de hectáreas (Castillo Quiroz *et al.*, 2005, 2013; Taylor *et al.*, 2017). Es considerada una especie clave del ecosistema matorral desértico rosetófilo debido a que es la especie de mayor distribución y densidad, alcanzando hasta 56 000 individuos por hectárea (Gentry, 1982). En el matorral desértico

micrófilo también es muy abundante con una densidad de colonias promedio de 21,000 individuos por hectárea. Finalmente, en el matorral desértico y subdesértico inerme y espinoso, su densidad está más esparcida (Burciaga *et al.*, 2011). Su amplia distribución y altas densidades se deben también a su alta capacidad de competencia intra e interespecífica, y resistencia a plagas y herbivoría (Sheldon, 1980; Reyes-Agüero *et al.*, 2000).



Figura 2. Área de distribución del *Agave lechuguilla* (Naturalista, 2021).

2.1.2 Usos

2.1.2.1 La industria Ixtlera

Las hojas de la lechuguilla se recolectan desde hace siglos para la obtención de fibra llamada *ixtle*, que se usa para la elaboración de productos como cuerdas, cepillos, brochas y tapetes (Sheldon, 1980; Gentry, 1982). Desde su uso local y tradicional, se expandió al mercado internacional hace más de 70 años (Castillo Quiroz *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2017). México, es el único productor mundial de *ixtle*, con los estados productivos por orden de importancia: San Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, Durango, Tamaulipas, Chihuahua, Hidalgo, México y Oaxaca. La producción nacional anual de *ixtle* se concentra en los seis primeros estados (370 municipios; 46 con mayor producción contando con 325 ejidos con permisos de aprovechamiento) (Pando-Moreno *et al.*, 2008; SAGARPA, 2009),

aproximando los 55.98 kg/ha (Taylor *et al.*, 2017), de lo cual el 93% se destina a la exportación bajo el nombre *Tampico fiber* (Castillo-Quiroz *et al.*, 2012).

Esta fibra se obtiene con el tallado manual o mecánico de las hojas recolectadas (Fig. 3). La organización de la industria Ixtlera está resumida en la figura 4. Los comercializadores de las empresas exportadoras de la fibra (5 en el país) llegan a los ejidos productores a comprar la fibra a un precio que varía del 13 a los 30 pesos mexicanos el kilogramo en base seca (Pando-Moreno *et al.*, 2008; SAGARPA, 2009). Esto basado en la demanda del mercado y la calidad de la fibra para alcanzar exigencias nacionales e internacionales (NMX-FF-113_SCFI-2009) (SAGARPA, 2009; Secretaría de Economía, 2009). El ingreso generado por la venta del *ixtle* representa un medio de subsistencia para más de 20,000 recolectores y sus familias (Nobel, 1998; Pando-Moreno *et al.*, 2008; SAGARPA, 2009; Burciaga *et al.*, 2011; Narcia Velasco *et al.*, 2012). Sin embargo, el bajo precio de venta, sumado al alto grado de marginación y rezago social de estas comunidades, contribuye a que se encuentren todavía en condiciones de pobreza (CONAPO, 2010; CONEVAL, 2015).

La importancia socioeconómica de este recurso silvestre, junto con la tecnificación de la obtención de fibra (Fig. 3.d y Fig. 4), provocaron la explotación irracional de los campos productivos, por lo que fue necesario regular el aprovechamiento para preservar esta especie nativa de México. Con esto, se estableció la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 2003), para reglamentar el uso de recursos forestales no maderables como los cogollos (conjunto de hojas jóvenes), hojas o pencas de especies como el *A. lechuguilla*. La norma indica la altura mínima de recolección del cogollo (25 cm), dado que se necesita entre 12 y 24 meses para su regeneración, dependiendo de las condiciones geoclimáticas (Burciaga *et al.*, 2011; Narcia Velasco *et al.*, 2012). Se usa una cogollera que encierra el cogollo y con un movimiento seco hacia adelante se desprende de la roseta (Fig. 3.a y b). Con este método de recolecta se conserva el meristema de crecimiento de la planta permitiendo la regeneración del cogollo para nueva recolecta (Fig. 3.c). Desde esta reglamentación de la SEMARNAT, la vida productiva de un individuo aumentó hasta aproximadamente 7 años (Narcia Velasco *et al.*, 2012). Asimismo, los turnos técnicos establecidos aseguran la perennidad de las poblaciones de *A. lechuguilla*, así como su aprovechamiento por parte de los Ixtleros. Con base en esto, la recolección de los cogollos

de la lechuguilla se considera una actividad sustentable desde el punto de vista ambiental y socioeconómico (Pando-Moreno *et al.*, 2004, 2008).

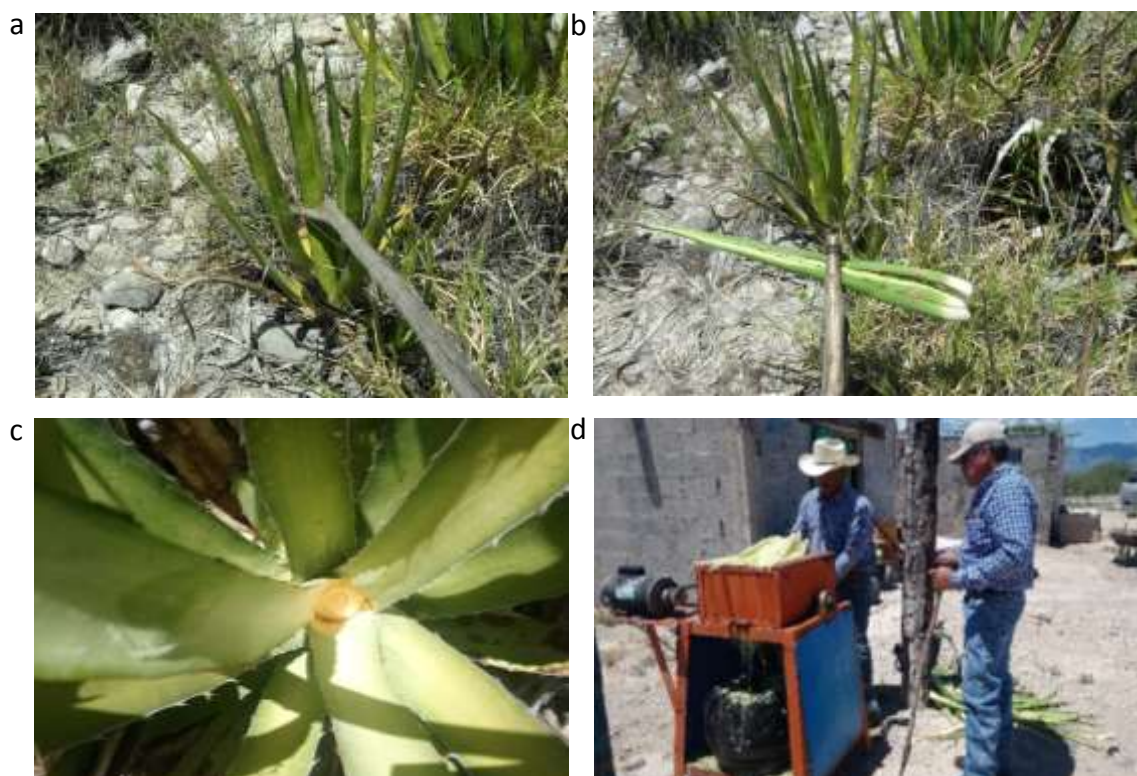


Figura 3. a, b y c) Etapas de recolección del cogollo y c) tallado mecánico para la obtención de fibra, Coahuila, México. Fotos por Zoé Pelletier-Morreuw.

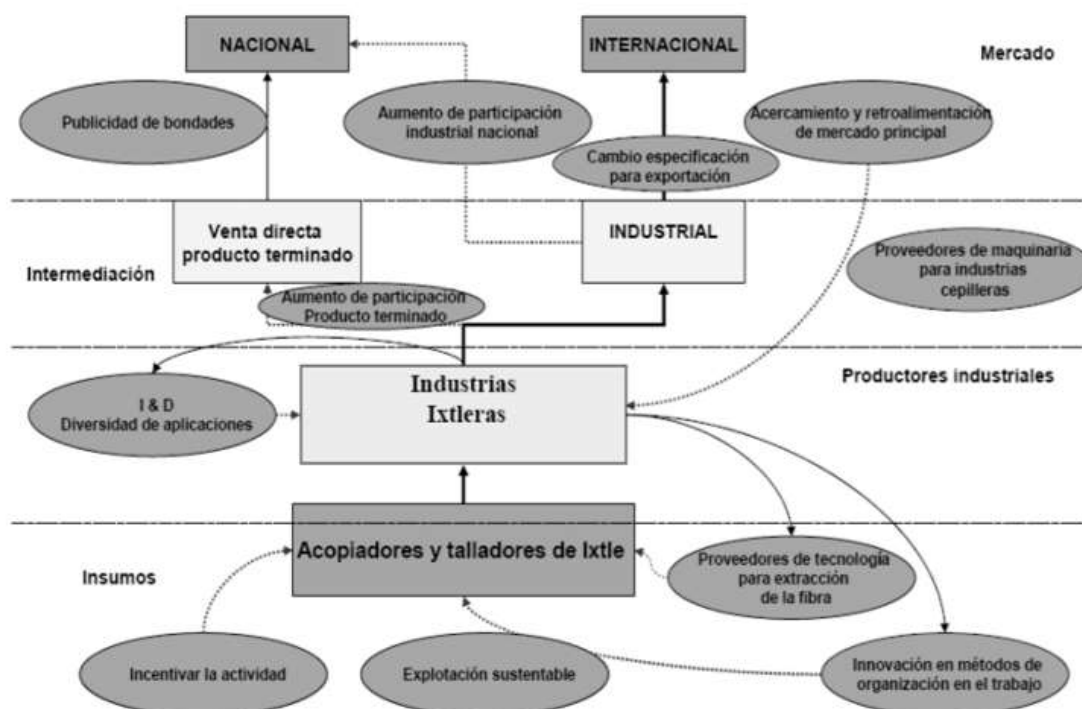


Figura 4. Elementos que agregan valor a la cadena del Ixtle. Reproducido de Secretaría de Economía (2009).

2.1.2.2 Productos derivados de la lechuguilla

Por otra parte, la diversificación de usos de la lechuguilla para incentivar la actividad Ixtlera, promover un aprovechamiento sustentable y explorar productos derivados, aparece como una necesidad a nivel nacional, tal como lo sugiere la Secretaría de Economía (Secretaría de Economía, 2009) (Fig. 5).

En este contexto, existe un creciente interés en el uso del *A. lechuguilla* para la industria bioenergética (Escamilla-Treviño, 2012). Además, este recurso tiene la ventaja de no competir con la soberanía alimentaria y el uso de agua (Morales-Martínez *et al.*, 2014; Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Los estudios de uso del cogollo para producción de hidrógeno han resultado en un bioproceso consolidado (Morales-Martínez *et al.*, 2020). Asimismo, se está estableciendo a nivel piloto la producción de bioetanol (Ortíz-Méndez *et al.*, 2017; Ríos-González *et al.*, 2017; Díaz-Blanco *et al.*, 2018; Ríos-González *et al.*, 2021) y butanol (Oliva-Rodríguez *et al.*, 2019) a partir de la biomasa de lechuguilla.

Del mismo modo, la lechuguilla también se considera para otros usos, tales como en la construcción (Juárez *et al.*, 2007; Picaso y Blnacas, 2018; Dávila-Pompermayer *et al.*, 2020), y para la obtención de polímeros de base biológica (Velásquez-Martínez *et al.*, 2011).

2.1.3 Plantaciones comerciales

Con el objetivo de responder al incremento de la demanda en fibras naturales y para su uso como materia prima de la que se obtengan otros productos derivados de valor agregado, se pretenden establecer plantaciones comerciales por parte de la CONAFOR (Castillo-Quiroz *et al.*, 2012; Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Esto para asegurar una producción perene, complementar el aprovechamiento razonable de los campos naturales y reducir los turnos técnicos para incrementar la productividad de la planta (Castillo Quiroz *et al.*, 2005; Burciaga *et al.*, 2011; Castillo-Quiroz *et al.*, 2012, 2014). Al igual que otras especies de agaves (Escamilla-Treviño, 2012; Stewart, 2015; Davis *et al.*, 2017), la implementación de cultivos de *A. lechuguilla* se justifica por eficiencia de uso de agua debido a que es una especie rústica adaptada a ecosistemas áridos y semi áridos (Nobel y Quero, 1986; Nobel *et al.*, 1989; Hourí y Machaka-Hourí, 2016).

Para el manejo agrónomico del cultivo, las iniciativas del Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), de 2003 a 2005, generaron el conocimiento base para el establecimiento de cultivos de *A. lechuguilla* en zonas anteriormente usadas para otros cultivos, considerando la disponibilidad en agua y su concentración de sales. Después, para iniciar los cultivos, se prefiere el uso de clones o hijuelos provenientes de campos silvestres en lugar de semillas. Con la elección de un ecotipo de *A. lechuguilla* por su productividad, calidad de fibra y resistencia a plagas, se logró reducir el tiempo de regeneración del cogollo a ocho meses, mientras que, con un ecotipo de la región, se estima una reducción del tiempo de madurez de la cosecha a 12-14 meses en lugar de 22-24 meses (Castillo-Quiroz *et al.*, 2012). Asimismo, se recomienda un riego (cada 30 días) y el uso de fertilizante para favorecer el crecimiento, generando mayor producción de fibra y de biomasa para su aprovechamiento subsecuente (Nobel *et al.*, 1989; Castillo-Quiroz *et al.*, 2012).

El efecto de las condiciones ambientales y condiciones de cultivos en la productividad de la lechuguilla y la calidad de su calidad de fibra se ha estudiado (Burciaga *et al.*, 2011; Castillo-Quiroz *et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha considerado su efecto en la obtención de otros productos derivados.

2.2 Aprovechamiento integral de la lechuguilla

2.2.1 El *guishe*

Como producto derivado de la industria ixtlera, el residuo de tallado denominado *guishe*, representa hasta el 85% de la recolecta. Entonces, considerando la colecta anual de lechuguilla en los 46 municipios más productivos a nivel nacional (325 ejidos) y que cuentan con permisos de aprovechamiento (SEMARNAT, 2003; SAGARPA, 2009), se puede estimar la cantidad de *guishe* obtenido en alrededor de 150 mil toneladas (SAGARPA, 2009; Juárez *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2017; Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Por ejemplo, en Matehuala, San Luis Potosí, se reporta una producción de *guishe* semanal de 1.5 toneladas (Medellín-Castillo *et al.*, 2017). Este desperdicio generado por la industria ixtlera no tiene valor comercial por lo que lo desechan en campo abierto (Fig. 5) provocando diversos problemas ambientales.

Anteriormente, se ha intentado responder a la falta de forraje usando el *guishe* para alimentación del ganado. Sin embargo, su consumo en grandes cantidades genera

problemas digestivos, en algunas ocasiones hasta provocar la muerte, generando pérdidas económicas para los campesinos. En el ganado, el daño provocado por el consumo del *guishe* se atribuye a la naturaleza fibrosa que es difícilmente digerible (Burrows y Tyrl, 2013; Carmona *et al.*, 2017). Efecto similar ha sido reportado con el bagazo de *A. tequilana*, sin embargo, los autores reportan el potencial beneficio de azúcares libres para alimentación del ganado (Ramírez-Cortina *et al.*, 2012). En cabras, el consumo de las hojas en grandes cantidades genera daño hepático con fotosensibilidad asociada, llevando a la muerte en 30% de los casos. Dicho efecto fue atribuido a la hepatotoxicidad de las sapogeninas presentes en el *A. lechuguilla* (Mathews, 1937; Gentry, 1982; Nobel, 1998). En contraste, las mulas consumen la lechuguilla sin presentar ningún daño o mortalidad asociada (Burrows y Tyrl, 2013).



Figura 5. *Guishe* de *Agave lechuguilla* obtenido por tallado mecánico, Coahuila, México. Foto por Zoé Pelletier-Morreew

Por otro lado, basado en el conocimiento empírico, algunos pobladores usan pequeñas cantidades de *guishe* para limpiar trastes, para la higiene corporal (jabón para el cabello) o para preparar medicinas tradicionales (Gentry, 1982; Nobel, 1998; Picaso y Blnacas, 2018). Sin embargo, el residuo no se aprovecha a gran escala.

Por ende, la mayor parte de este residuo de tallado sigue siendo desechado. La carga microbiana, el alto contenido en celulosa y azúcares y las condiciones climáticas de la zona, favorecen una fermentación rápida (Carmona *et al.*, 2017), cuando no es incinerado por los

explotadores. En ambos casos se genera contaminación ocasionando impactos negativos en el medio ambiente (Castillo Quiroz *et al.*, 2005).

2.2.2 Biorrefinería

Para el aprovechamiento integral y sostenible de la lechuguilla, se ha planteado un esquema de biorrefinería que preserva la actividad Ixtlera y valoriza el *guishe* como materia prima para la obtención de productos de alto valor agregado (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). El balance de materia revela que de 1 tonelada de *guishe* se pueden obtener: 7.6 L de bioetanol, 24 m³ de hidrógeno, 32 m³ de metano, 15 kg de biocarbón, 260 kg de saponinas, y 104 kg de otros fitoquímicos (Fig. 6).

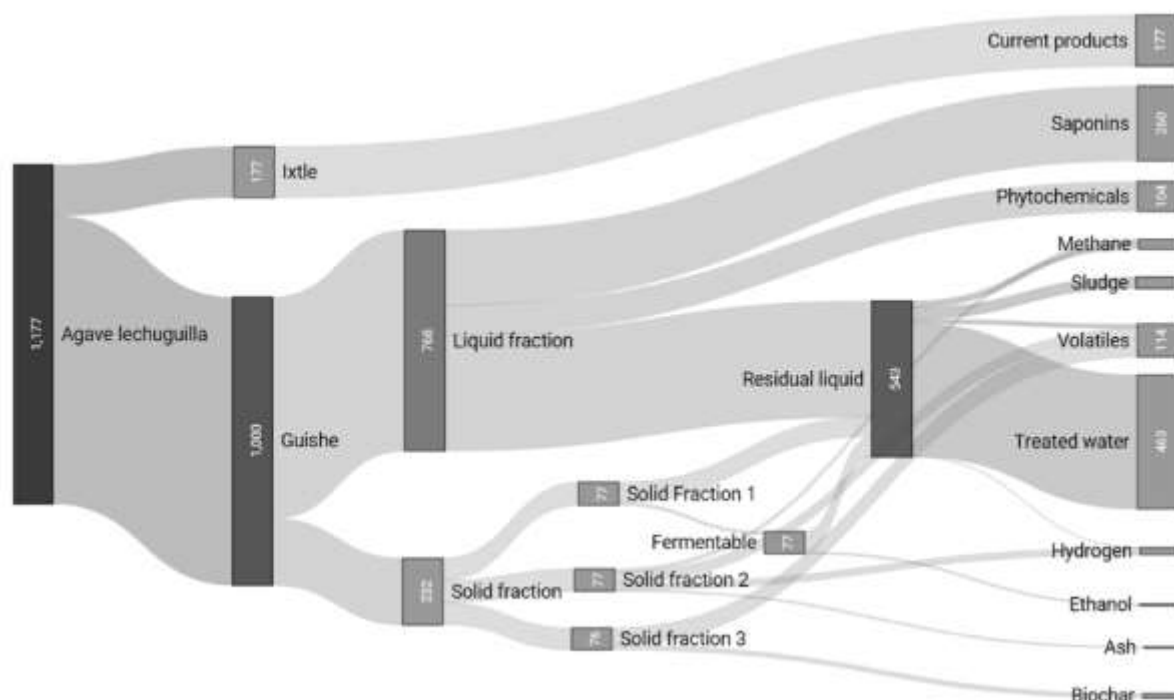


Figura 6. Balance de materia para la transformación del *guishe* en productos de valor agregado. Reproducido de Díaz-Jiménez *et al.* (2019).

En este esquema, las saponinas que son fitoquímicos abundantes en los agaves se distinguen de los otros fitoquímicos, los cuales no se especifican por falta de estudios al respecto.

Además de los fitoquímicos de la fracción líquida que son en su mayoría compuestos hidrosolubles, también se ha sugerido que la fracción sólida constituida por la pulpa de las hojas de *A. lechuguilla* contiene fitoquímicos hidrosolubles, liposolubles y solubles en solventes orgánicos. Por lo general, se reportan como extractivos en los estudios

bromatológicos, con 45.34% (Carmona *et al.*, 2017), 25.69% (Ortíz-Méndez *et al.*, 2017), 37.21% (Díaz-Blanco *et al.*, 2018), 26.2% (Morales-Martínez *et al.*, 2020) en base seca, dependiendo de los tratamientos aplicados.

Por lo tanto, el aprovechamiento del *guishe* de *A. lechuguilla* como fuente de fitoquímicos requiere más estudios de caracterización y extracción para integrar esta vía de valorización dentro del esquema de biorrefinería propuesto.

2.3 Fitoquímicos

2.3.1 Metabolitos especializados

Los fitoquímicos son compuestos químicos sintetizados por las plantas en general en respuesta a condiciones bióticas y abióticas. Se conocen como metabolitos secundarios o especializados, que forman parte de los mecanismos de adaptación y de defensa química de las plantas. Esta estrategia de arsenal químico lleva a la producción de diversos compuestos con una amplia gama de funciones biológicas. En las plantas se han reportado más de 200,000 compuestos de bajo peso molecular. Se clasifican como: derivados de terpenos incluyendo esteroides y saponinas; compuestos nitrogenados como los alcaloides; compuestos fenólicos como los flavonoides y taninos; derivados de la glucosa como glucosinolatos; y derivados de amino ácidos como ciertas fitohormonas (Mithöfer y Maffei, 2017).

2.3.2 Flavonoides

Entre ellos, los compuestos fenólicos y en particular el grupo de los flavonoides es uno de los más diverso y abundantes, distribuidos en todo el reino *Plantae* (Brown, 1980; Pollastri y Tattini, 2011; Nakayama *et al.*, 2019; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019; Corso *et al.*, 2020). La estructura básica de los flavonoides se caracteriza por un núcleo de dos anillos bencénicos (A y B) con un heterociclo pirano o flavano en medio (C) que derivan de dos vías biosintéticas del metabolismo primario: la ruta metabólica del ácido malónico derivado del acetil-CoA y de la ruta del ácido shikímico con la fenilalanina (Fig. 7).

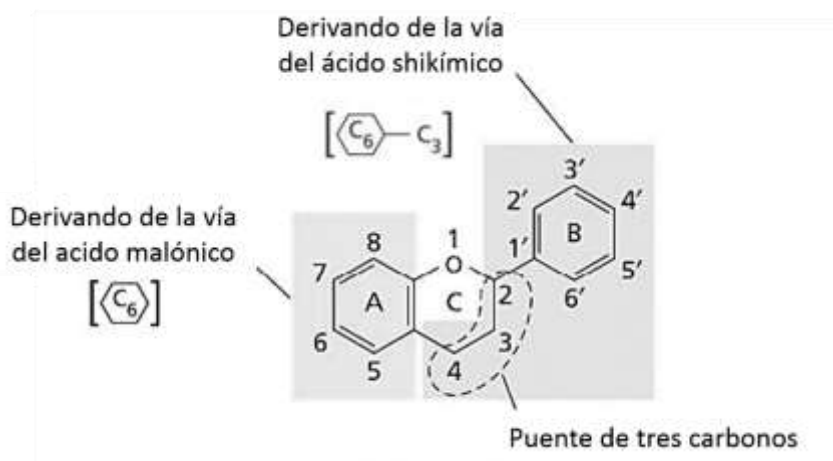


Figura 7. Esqueleto básico de los flavonoides. Adaptado de Taiz y Zeiger (Taiz y Zeiger, 2003).

Se reportan al menos 9,000 variantes descritas en todas las plantas clasificadas como flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas según el perfil de sustitución del anillo C (Mierziak *et al.*, 2014; Lucci *et al.*, 2017). La síntesis de las diferentes clases de flavonoides involucra una diversidad de enzimas (Fig. 8) y ocurre en su mayoría, en complejos enzimáticos del RE (retículo endoplásmico), del lado citoplasmático, y se acumulan principalmente en la vacuola cuando no son volátiles (Pollastri y Tattini, 2011).

En las plantas, las formas glicosiladas son más abundantes (Taiz y Zeiger, 2003; Cuyckens y Claeys, 2004). Por ejemplo, la quercetina (flavonol) presenta más de 70 derivados glicosilados (Brown, 1980; Sisa *et al.*, 2010). Otros tipos de modificaciones se llevan a cabo por medio de enzimas específicas como la metilación, la hidroxilación, la insaturación y la oxidación. Estas modificaciones afectan la polaridad, solubilidad, la reactividad y la estabilidad de estos compuestos (Sisa *et al.*, 2010; Mierziak *et al.*, 2014; Lucci *et al.*, 2017).

Mientras que la glicosilación favorece la solubilidad de los compuestos, la presencia de los grupos hidroxilo y metilo le confieren propiedades más hidrofóbicas (Taiz y Zeiger, 2003).

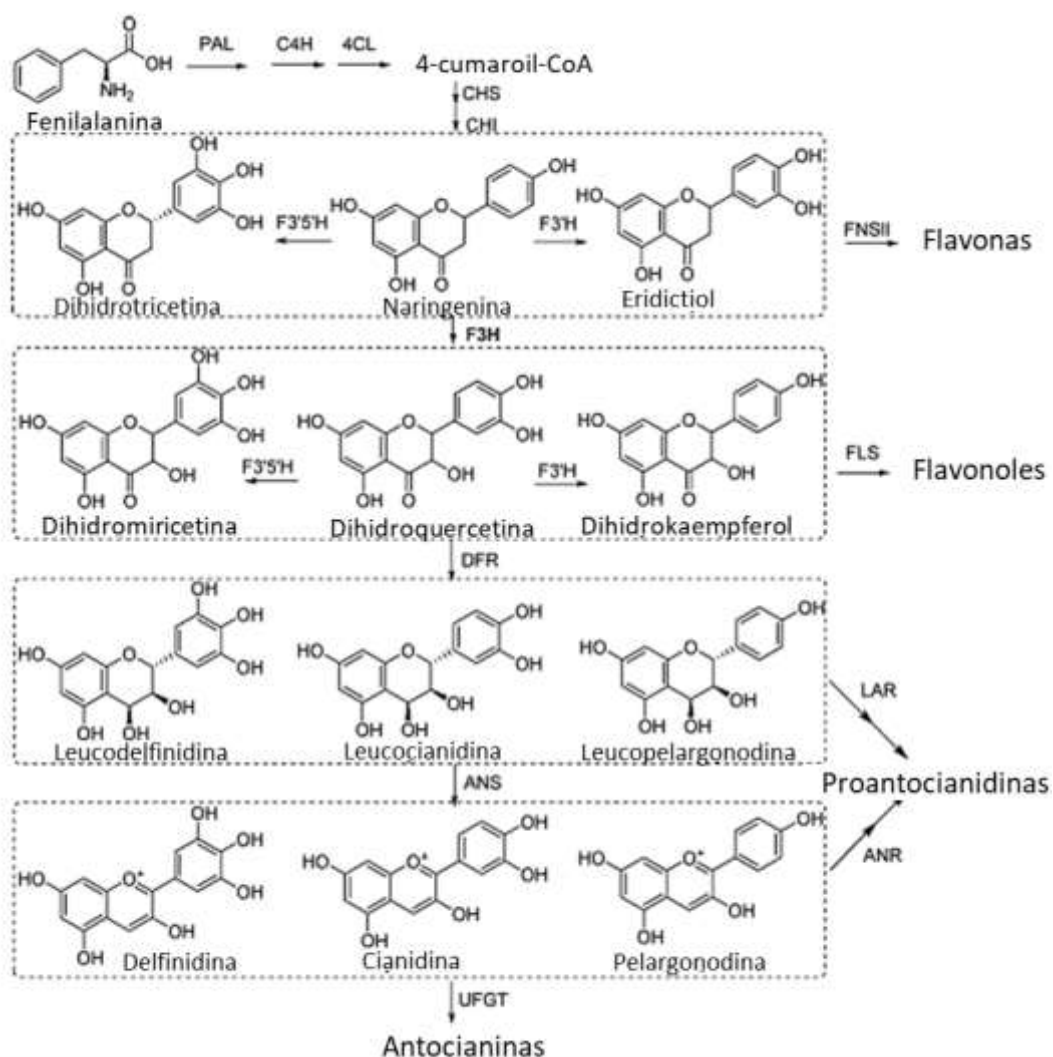


Figura 8. Diversificación de la vía de biosíntesis de los flavonoides. Adaptado de Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2017).

Aunque se observa una variación significativa entre las familias debido a los metabolismos intrínsecos, se ha mostrado que las especies cercanas filogenéticamente presentan una estructura de defensa parecida. En el caso de plantas de zonas desérticas como el *A. lechuguilla*, el tipo de metabolismo primario CAM determina las rutas metabólicas secundarias que se inducen de manera preferencial (Nobel, 1998; Pollastri y Tattini, 2011; Maeda, 2019). Eso puede influir en la presencia de azúcares para la síntesis de flavonoides glicosilados, por ejemplo.

2.3.3 Los flavonoides de Agaves

En el caso de los agaves, la síntesis y acumulación de flavonoides está inducida por los factores ambientales, en particular las radiaciones UV, que están relacionadas con la

producción de flavonas y flavonoles para mantener la homeostasis frente a estrés oxidativo (Taiz y Zeiger, 2003; Pollastri y Tattini, 2011; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019). Asimismo, otros tipos de estrés abióticos como la temperatura, la disponibilidad en agua y en nutrientes impactan la síntesis de estos flavonoides en agaves (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013b; Puente-Garza *et al.*, 2017b). Por otra parte, la síntesis de isoflavonoides y flavanoles está relacionada con la presencia de microorganismos patógenos ya que son compuestos que tienen propiedades antimicrobianas (Mithöfer y Maffei, 2017). Al contrario, algunos flavonoles favorecen las simbiosis con microorganismos benéficos de la rizosfera para la fijación de nutrientes por lo que su síntesis está influenciada por la calidad del suelo (Mierziak *et al.*, 2014). Por otra parte, los flavonoides e isoflavonoides se sintetizan en las hojas como parte de la defensa contra insectos y nemátodos limitando el desarrollo de huevos de estos parásitos como un ejemplo de mecanismo de acción (Herbert-Doctor *et al.*, 2016; Mithöfer y Maffei, 2017). De igual manera, los taninos, que son polímeros de flavonoides, actúan como repelente para prevenir la herbivoría debido a su toxicidad. Sin embargo, en su forma hidrolizada tienen un papel nutritivo para los organismos que la consumen, como es el caso de las quinonas (Taiz y Zeiger, 2003; Mithöfer y Maffei, 2017).

Por último, los flavonoides de tipo pigmento o volátiles se producen al momento de la reproducción para atraer a los insectos (Taiz y Zeiger, 2003).

Debido a su importancia fisiológica, los compuestos fenólicos incluyendo flavonoides y homoisoflavonoides son abundantes y presentan una gran diversidad en los agaves. Según la especie, la fase de desarrollo, el tejido considerado, la composición en flavonoides es muy variable ya que depende de las necesidades fisiológicas específicas ante las condiciones ambientales (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a; b; Rahmani y Toumi Benali, 2016; Puente-Garza *et al.*, 2017b, 2018).

Por ejemplo, 51 flavonoides se encontraron en *A. striata* y *A. victoria-reginae*, de los cuales 26 flavonoles, 19 dihidroflavonoides y seis flavonas fueron identificados (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a). En *A. durangensis* se describió la fracción de flavonoles glicosilados en particular derivados de kaempferol (Almaraz-abarca *et al.*, 2009) y en *A. salmiana*, las formas agliconas y glicosídicas de kaempferol y quercetina (Puente-Garza *et al.*, 2017b, 2018). En *A. sisalana* se describen tres flavonoides y siete homoisoflavonoides (Chen *et al.*, 2009). De igual

manera, El-Hawary *et al.* (2020) describen seis flavonoides y dos homoisoflavonoides en cinco especies de agaves diferentes.

De las hojas de *A. lechuguilla*, algunos estudios referencian el contenido en fenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC) (Tabla 1) y Almaraz-Abarca *et al.* (2013a) describe su contenido en flavonoles agliconas (20.6 ± 14.5 mg/g PS) y glicosídicos (33.9 ± 5.8 mg/g PS). Estos compuestos cuantificados en *A. lechuguilla* difieren de los compuestos mayoritarios en *A. victoriae-reginae* y *A. striata* (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a). Sin embargo, no se ha descrito de manera detallada el perfil en flavonoides de la lechuguilla y a la fecha no se han encontrado reportes para el *guishe* a parte de los trabajos de nuestro grupo de trabajo.

2.4 Actividades biológicas de los flavonoides de agaves

Además de sus papeles fisiológicos intrínsecos, los flavonoides son considerados como los fitoquímicos de mayor eficiencia para su uso como nutracéuticos o fármacos (Pistelli y Giorgi, 2012; Lucci *et al.*, 2017; Perez-Vizcaino y Fraga, 2018; Tungmunnithum *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). La diversidad de propiedades biológicas reportadas de los flavonoides genera un gran interés para el desarrollo de productos naturales bioactivos.

Extractos de diferentes especies de agaves incluyendo el *A. lechuguilla* han mostrado actividades antioxidantes, antimicrobianas (bacteria y hongos), antiparasíticas (nematodos e insectos), antiinflamatoria, anticancerígena e inmunomoduladora. En algunos estudios, estas actividades biológicas se atribuyeron a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides caracterizados en los extractos (Tabla 1). Además de lo reportado en la Tabla 1, también se han descrito efectos benéficos de alimentos derivados de agaves en salud humana y animal, aunque atribuyeron el efecto a otros compuestos como saponinas, fructanos o terpenoides (Santos-Zea *et al.*, 2012, 2016). Sin embargo, como se usan extractos complejos que no fueron caracterizados, no se puede excluir el papel de los flavonoides en los efectos observados. Por ejemplo, el potencial antioxidante de los jarabes de agaves se atribuye al alto contenido en polifenoles totales (Hernández-Ramos *et al.*, 2020). Por eso mismo, es importante identificar los metabolitos como los flavonoides en el *A. lechuguilla* y sus productos derivados.

Tabla 1. Actividades biológicas y contenidos en flavonoides reportados en extractos de Agaves

Espece y tejido	Extracto	Flavonoides ¹	Actividades	Ref
A. atroviens Hojas	Acuoso	(±)-Taxifolina (dihidroquercetina), Quercetol C, Isopedicina, Peonidina 3-sophoroside 5-glucósido, Malvidina 3-cafeoilrutinosido-5-glucósido	Antioxidante: 8.5 ± 1.4 µmol TE/g PS (FRAP) 10.5 ± 0.3 µmol TE/g PS (ORAC) Activación de la repuesta a estrés oxidativo por la vía NRF2 en línea celular HepG2	(Olvera-Garcia <i>et al.</i> , 2017)
	Acuoso procesado	(±)-Taxifolina (dihidroquercetina), Quercetol C, Isopedicina, Peonidina 3-sophoroside 5-glucósido, Malvidina 3-cafeoilrutinosido-5-glucósido	Antioxidante: 5.2 ± 0.8 µmol TE/g PS (FRAP) 13.9 ± 0.3 µmol TE/g PS (ORAC) Activación de la repuesta a estrés oxidativo por la vía NRF2 en línea celular HepG2	(Olvera-Garcia <i>et al.</i> , 2017)
	Butanólicos	(±)-Taxifolina (dihidroquercetina), Quercetol C, Isopedicina, Peonidina 3-sophoroside 5-glucósido, Malvidina 3-cafeoilrutinosido-5-glucósido	Antioxidante: 5.5 ± 0.9 µmol TE/g PS (FRAP) 11.6 ± 0.1 µmol TE/g PS (ORAC) Activación de la repuesta a estrés oxidativo por la vía NRF2 en línea celular HepG2	(Olvera-Garcia <i>et al.</i> , 2017)
	Metanólicos	TPC: 39.35 ± 0.69 mg GAE/100g). TPC: 304.8 ± 5.02 mg CE/100g	Antioxidante: 73.97 ± 1.49% de inhibición de radicales libres (DPPH) a 0.1 mg/mL Actividad hemolítica <i>in vitro</i>: 1.46 ± 0.14 % Antimicrobiana: MIC de 0 a 250 mg/mL en cepas bacterianas y de hongos patógenos para humano	(Rizwan <i>et al.</i> , 2012)

	Butanólicos	TPC: 10.65 ±1.24 mg GAE/100g. TFC: 71.5 ±2.96 mg CE/100g	Antioxidante: 65.21 ±0.98 % de inhibición de radicales libres (DPPH) a 0.1 mg/mL Actividad hemolítica in vitro: 1.01 ± 0.04 % Antimicrobiana: MIC de 15 a 120 mg/mL en bacterianas y hongos patógenos para humano	(Rizwan <i>et al.</i> , 2012)
A. fourcoydes Polvo	NA	Flavonoides, antocianinas, taninos	Inmunomoduladora in vivo: incrementó la concentración de IgG en suero de conejos alimentados. 1.5% en la dieta	(Iser <i>et al.</i> , 2016)
A. lechuguilla Hojas	Acuosos	TPC; Taninos totales: 2.10×10 ⁴ ppm	Antifúngica in vitro: <i>Phytophthora cinnamomi</i> , IC50 de 28.87 ppm	(Castillo-Reyes <i>et al.</i> , 2015)
	Etanólicos (sonicación, 90 min, etanol 96%)	TPC: 23.44 ± 1.47 µg GAE/mg de extracto TFC 19.62 ± 1.23 µg QE/mg de extracto Flavonoles (kaempferol y quercetina), biflavonoides (afzelechina 4-β-8 quercetina), y derivados glicosilados de quercetina	Antioxidante: 87.36 ± 3.57 µg TE/mg de extracto (TEAC) 1962.99 ± 3.57 µg TE/mg de extracto (ORAC) Anticáncer (SK-LU-1): IC50 109.40 ± 0.07 µg/mL	(Anguiano-Sevilla <i>et al.</i> , 2018)
	Hidrolizado (metanol 50% + HCl 1.2 M, 80°C, 2h)	TPC: 37.45 ± 3.57 µg GAE/mg de extracto; TFC 3.08 ± 0.00 µg QE/mg de extracto; flavonoles (kaempferol y quercetina), biflavonoides (afzelechina 4-β-8 quercetina), y derivados glicosilados de quercetina	Antioxidante: 46.53 ± 0.72 µg TE/mg de extracto (TEAC) 1216.83 ± 4.88 µg TE/mg de extracto (ORAC) Anticáncer (SK-LU-1): IC50 133.9 ± 0.10 µg/mL	(Anguiano-Sevilla <i>et al.</i> , 2018)
	Fraccionado (hidrolizado pasado por una columna C18, elución con etanol)	TPC: 2.69 ± 0.12 µg GAE/mg de extracto TFC 1.47 ± 0.00 µg QE/mg de extracto Flavonoles (kaempferol y quercetina), biflavonoides (afzelechina 4-β-8 quercetina), y derivados glicosilados de quercetina	Antioxidante: 6.12 ± 0.91 µg TE/mg de extracto (TEAC) 49.20 ± 0.80 µg TE/mg de extracto (ORAC) Anticáncer (SK-LU-1): IC50 6.96 ± 0.15 µg/mL	(Anguiano-Sevilla <i>et al.</i> , 2018)

	Etanólicos	Compuestos fenólicos (++)	Antifúngica in vitro: <i>Phytophthora cinnamomi</i> , IC50 de 2032 ppm	(Castillo-Reyes <i>et al.</i> , 2015)
	Lanonina	TPC (++) Taninos totales: 4.26×10 ⁴ ppm	Antifúngica in vitro: <i>Phytophthora cinnamomi</i> , IC50 de 23.07 ppm <i>Rhizoctonia solani</i> , IC 50 de 1.70 ×10 ⁴ ppm	(Castillo-Reyes <i>et al.</i> , 2015)
	Manteca de coco	TPC (-) Taninos totales: 1.60×10 ⁴ ppm	Antifúngica in vitro: <i>Phytophthora cinnamomi</i> , IC50 de 252.7 ppm <i>Rhizoctonia solani</i> , IC 50 de 6.72 ×10 ⁴ ppm	(Castillo-Reyes <i>et al.</i> , 2015)
	Etanólicos	Flavonoides	Insecticida: <i>Bemisia tabaci</i> , LC 1035 ppm	(Ontiveros-Guerra <i>et al.</i> , 2020)
	Acuosos	Fenoles y taninos	Antifúngica: Inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> de 2- 32%	(Martínez Hernández, 2017)
	Etanólicos	Fenoles y taninos	Antifúngica: Inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> de 29- 96%	(Martínez Hernández, 2017)
Raíces	Acuosos	Fenoles y taninos	Antifúngica: Inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> de 2- 38%	(Martínez Hernández, 2017)
	Etanolicos	Fenoles y taninos	Antifúngica: inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> al 83- 100%	(Martínez Hernández, 2017)
<i>guishe</i>	Crudo	Flavonoles (quercetina, kaempferol)	Efecto benéfico de 0.3% de inclusión en la dieta en el crecimiento del camarón blanco del Pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>)	(Peña-Rodríguez <i>et al.</i> , 2020)
<i>A. salmiana</i> Hojas	Metanólicos	Flavonols (++)	Antioxidante: 146 μM TE/g PS	(Puente-Garza <i>et al.</i> , 2018)

A. sisalana Hojas	Acuosos	Flavonoides (++) (+)	Antimicrobiana: MIC de 20-40 mg/mL contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Candida albicans</i>	(Hammuel <i>et al.</i> , 2011)
	Metanólicos	Flavonoides (++) (+)	Antimicrobiana: MIC de 10 mg/mL contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Candida albicans</i>	(Hammuel <i>et al.</i> , 2011)
	Metanólicos purificados	Homoisoflavones	Antiinflamatoria in vitro (PBMC): IC50 de 19.4 a 58.8 µM, disminución de la producción de IL-2 y IFN-γ	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
Sub-producto de hojas	Crudo	TPC: 1.27 ± 0.4%	Inocuidad in vitro (BALB/3T3): IC50 de 0.252 mg/mL Fototoxicidad in vitro: No apto para pruebas <i>in vivo</i>	(Barreto <i>et al.</i> , 2017)
	Etanolicos	TPC: 2.53 ± 0.4%	Inocuidad in vitro (BALB/3T3): 90% a la máxima concentración probada de 20 mg/mL Sin fototoxicidad in vitro Inocuidad in vivo (piel, humanos): Inocuo a una concentración de 1%	(Barreto <i>et al.</i> , 2017)
A. tequilana Jugo	NA	Flavonoides	Antiparasítica: Inhibición del crecimiento de nematodos fitopatógenos a una concentración de 6%	(Herbert- Doctor <i>et al.</i> , 2016)
Agave spp. Hojas	Metanólicos	TPC de 2.06 ± 0.25 a 12.37 ± 2.37 mg GAE/d PS Flavonoides totales (+) Taninos totales (+)	Antioxidante: 5-30 µM TE/g PS (DPPH)	(Ahumada- Santos <i>et al.</i> , 2013)
		TPC de 2.06 ± 0.25 a 12.37 ± 2.37 mg GAE/d PS Flavonoides totales (+) Taninos totales (+)	Antibacteriana: <i>Streptococcus A-4</i> (MIC 5- 15 mg/mL), <i>Salmonella enterica</i> (MIC 5-10	(Ahumada- Santos <i>et al.</i> , 2013)

	mg/mL), <i>Shigella dysenteria</i> (MIC 5-15 mg/mL), <i>Escherichia coli</i> (MIC 10 mg/mL), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC 5-15 mg/mL)	
Quercetina hexosil rutinósido, Kaempferol deoxiexosil-di-dehósido, Kaempferol di-deoxihexosil hexósido, Kaempferol deoxihexosil hexósido, Eucomol (homioisoflavonoide), Dihidroeucumina (homioisoflavonoides,	Antiinflamatoria e inmunomoduladora in vivo: 55-70% de inhibición de formación de edema (200 mg/kg) disminución de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-10 y TNF- α).	(El-Hawary <i>et al.</i> , 2020)
	Efecto ulceroprotector in vivo: 70-85% de protección	

Nota: ¹ Las concentraciones relativas se reportan entre paréntesis (+).

La inocuidad de los extractos derivados de *A. lechuguilla* se ha comprobado en camarón blanco hasta un nivel de inclusión de 0.6% en la dieta formulada (Peña-Rodríguez *et al.*, 2020). Asimismo, extractos etanolicos de hoja de *A. lechuguilla* se reporta con una LD50 46.3 μ g/mL en prueba de citotoxicidad *in vivo* con camarón de salmuera (*Artemia*) (Florita Ramos Casillas, 2012). De otros agaves, la alimentación de ratas con 2 g/kg por 24h tuvieron un 100% de supervivencia (El-Hawary *et al.*, 2020). Por otro lado, es interesante resaltar la especificidad de la citotoxicidad hacia células cancerígenas mientras no se observa toxicidad en células sanas (Florita Ramos Casillas, 2012; Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018). Asimismo, para usos cosméticos se evidencia la diferencia de concentración en fenoles totales entre extractos acuosos y etanolicos, de los cuales solo el extracto etanólico con mayor TPC cumplió los requisitos para pruebas en humano (Barreto *et al.*, 2017).

Esta revisión de la literatura sugiere el potencial de las hojas de los agaves y sus subproductos como fuente de flavonoides bioactivos de múltiples usos. Por otro lado, se demuestra la variabilidad del contenido en flavonoides dependiendo de los solventes usados, lo que impacta la bioactividad. Por lo tanto, la implementación de métodos de identificación y de extracción de tales compuestos de interés comercial es relevante.

2.5 Identificación de flavonoides

2.5.1 Química analítica

De manera clásica, la identificación de los metabolitos se realiza con métodos de química analítica. Para la identificación de los flavonoides, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se prefiere sobre la cromatografía de gases (GC) ya que no requiere un pretratamiento de los extractos y permite analizar compuestos polares (Stefova *et al.*, 2003; Kumar, 2017).

El HPLC acoplado a detector por espectrometría UV con arreglos DAD o PDA (Diode-Array Detector y Photodiode Array Detector por sus siglas en inglés) permite la detección de flavonoides ya que tiene absorbancias máximas en este rango de radiaciones (240-285 nm y 300-400 nm) (Markham y Mabry, 1975; Sisa *et al.*, 2010).

El uso de una columna C18 RP (fase reversa) (Cuyckens y Claeys, 2004) y la elución con solventes isocráticos o por gradiente de disolventes (Merken y Beecher, 2000; Stefova *et al.*, 2003) permite una separación eficiente de la mayoría de las clases de flavonoides previamente mencionados, debido a que los perfiles de insaturación, hidroxilación, metilación y glicosilación influyen en las interacciones con la columna (Fig. 9).

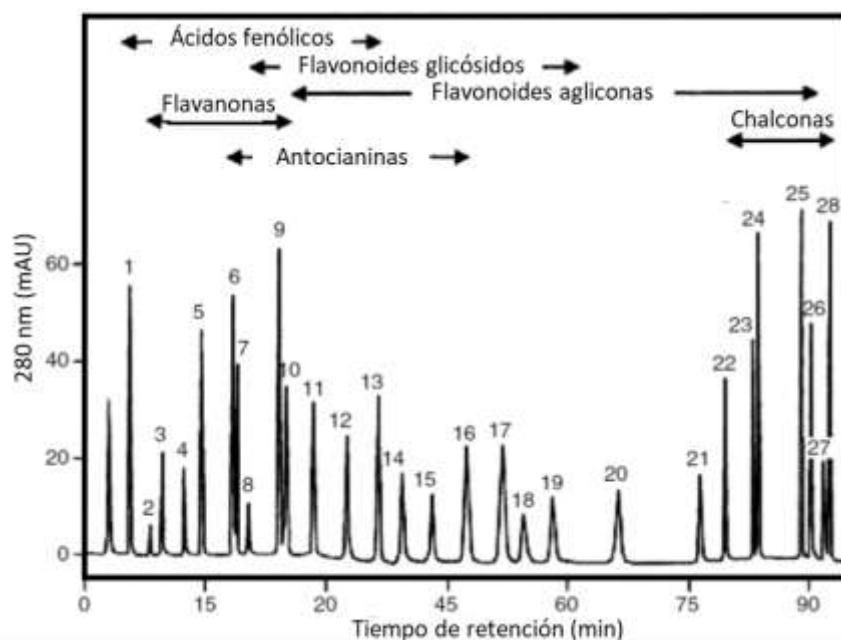


Figura 9. Cromatograma del HPLC-UV (280 nm) de un extracto complejo de fenoles. Adaptado de Sakakibara *et al.* (2003).

A pesar de su amplio uso en estudios de flavonoides, el HPLC-UV tiene límites tales como la necesidad de espectros de estándares. Además, difícilmente se aplica para una caracterización estructural de los flavonoides que eluyen en grupos de polaridad similar (Kumar, 2017).

Usando el HPLC de manera preparativa, se pueden separar los grupos de flavonoides para identificar los compuestos presentes de forma más precisa (Fig 10). Pero la caracterización estructural de los flavonoides y el descubrimiento de nuevos derivados se asocia al acoplamiento del HPLC con espectrometría de masas (Cuyckens y Claeys, 2004; Kumar, 2017).

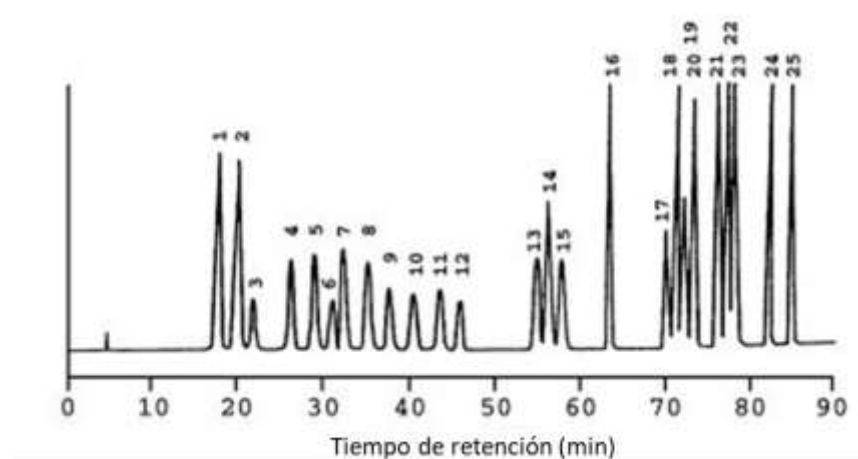


Figura 10. Separación de 25 flavonoides estándares, en orden: erocitrina, neoerocitrina, robinetina, narirutina, naringina, rutina hesperidina, neohesperidina, isohioifolina, roifolina, diosmina, neodiosmina, neoponcirina, quercetina, poncirina, luteolina, kaempferol, apigenina, isorhamnetina, diosmetia, rhamnetina, isoakuranetina, sinensetina, acacetina y targeretin. Adaptado de Stefova *et al.* (2003).

La espectrometría de masa incluye la ionización previa al análisis de masas. La ionización se realiza principalmente por electroespray (ESI) y por química a presión atmosférica (APCI) de los cuales el ESI es el método más usado en metabolómica para analizar un amplio rango de masas (m/z 50-1200) (Tugizimana *et al.*, 2018). Con base en esto, la muestra se nebuliza en fase gaseosa a través de un capilar donde ocurre la fragmentación inducida por colisión, entre otros. Por evaporación del solvente frente al campo eléctrico se fija la carga en los iones (Fabre *et al.*, 2001; Tugizimana *et al.*, 2018). En el caso de los flavonoides, se usa preferencialmente una ionización negativa, aunque la ionización positiva puede

complementar la elucidación de las estructuras de los compuestos (Cuyckens y Claeys, 2004; Tsimogiannis *et al.*, 2007).

Posteriormente, los fragmentos son clasificados según la masa y carga (m/z), en un analizador de masa, entre los que se destacan el IT (Ion Trap) caracterizado por la disociación iónica a través de un campo magnético o eléctrico no homogéneo, y el Q-TOF (Quadrupole-Time Of Flight) que, por variación constante del voltaje, y por las radiofrecuencias aplicadas, retiene de manera diferencial los iones antes de liberarlos en el campo eléctrico del equipo TOF que mide la aceleración de los iones. Por último, el detector de espectrometría de masas (MS) permite la adquisición de los espectros para su análisis (Kumar, 2017; Lucci *et al.*, 2017; El-Hawary *et al.*, 2020).

Entonces, con el análisis HPLC-MS, basado en los perfiles de fragmentación de los iones moleculares, se obtiene información de los flavonoides agliconas en extractos complejos; los tipos, secuencia, y posición de los carbohidratos; así como de otros sustituyentes presentes. Los anillos insaturados están sujetos a la reacción de fragmentación de Retro-Diels-Alder (RDA) lo que ocurre frecuentemente en el anillo C de los flavonoides (Merken y Beecher, 2000; Tsimogiannis *et al.*, 2007). Además de la protonación ($[M+H]^+$) o deprotonación ($[M-H]^-$), también se observa la pérdida de pequeñas moléculas neutras y estables tales como CO (28 Da), H₂O (18 Da), CH₃ (15 Da) y C₂H₂O (42 Da) entre otros lo que lleva a una reorganización molecular. La abundancia de estos fragmentos en las muestras analizadas informa en cuanto a los sustituyentes de los anillos A y B principalmente (Fabre *et al.*, 2001). Adicionalmente, durante la fragmentación, los compuestos O-glicosilados son más susceptibles que los C-glicosilados por la naturaleza del enlace. Por lo tanto, la frecuencia de los iones reducidos de hexósido (162 Da), desoxi-hexósido (142 Da) o pentósido (132 Da) evidencia la estructura y secuencia de los derivados glicosídicos como en el ejemplo de la apigenina glicosilada representados en la Fig. 11.

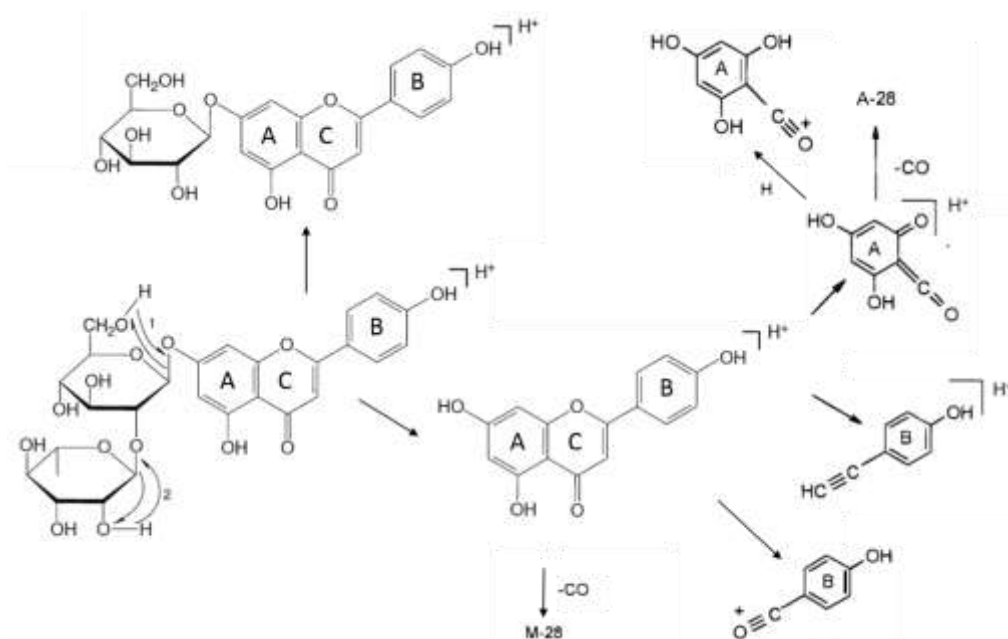


Figura 11. Perfil de fragmentación de la apigenina-7-*O*-neohesperidósido y reacción de Retro-Diels-Alder del ion molecular de la apigenina. Adaptado de Cuyckens y Claeys (2004), y Merken y Beecher (2000).

Estas técnicas robustas, presentan la ventaja de ser cualitativas, cuantitativas e informativas. Sin embargo, la identificación de los fitoquímicos en extractos complejos sigue siendo un reto (Fig. 12) (El-Hawary *et al.*, 2020; Atanasov *et al.*, 2021). Los autores previamente citados han reportado limitaciones en cuanto a la detección y cuantificación de los flavonoides por HPLC-UV-MS. Entre ellas, la sensibilidad de los equipos generalmente arriba de 1×10^{-5} AU, la co-elución de compuestos de pesos moleculares similares (exactitud de masa de 1.0 a 0.1 Da), y la dificultad de identificación de algunas sustituciones como la acetilación y sulfatación, por ejemplo.

Por otro lado, tienen como desventaja la necesidad de una extracción y purificación previa al análisis, que la mayoría de las veces consumen recursos que encarecen a los bioprocesos. Por lo que, para la identificación y cuantificación, la extracción previa puede generar falsos negativos o mezclas de metabolitos difíciles de separar (Atanasov *et al.*, 2021). Con este argumento, es importante proponer alternativas metodológicas de identificación de productos naturales. Además de que estas técnicas son tardadas, de altos costos y generan gran cantidad de residuos tóxicos.

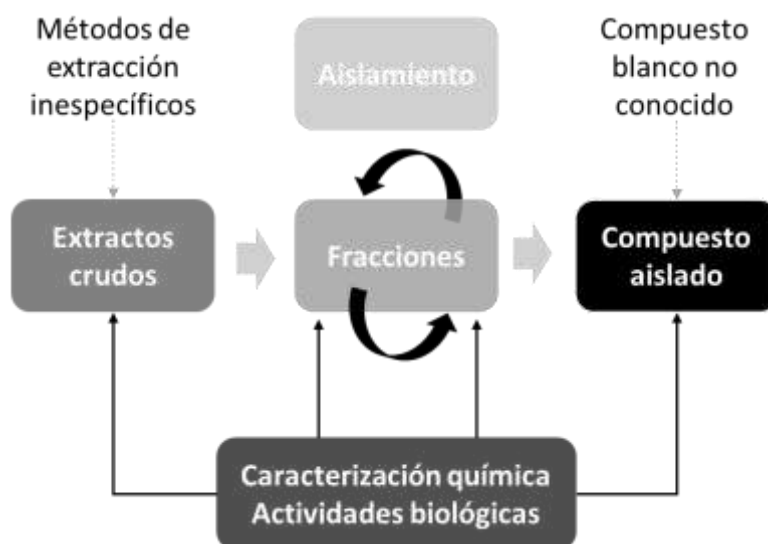


Figura 12. Proceso de identificación de compuestos naturales en extractos complejos. Adaptado de Anatasov *et al.* (2021).

2.5.2 Las “Omicas”

Con los avances en las herramientas de biotecnología moderna como las ciencias “ómicas”, la búsqueda de metabolitos puede llevarse a cabo con métodos *in silico* que permiten la identificación de enzimas involucradas en las rutas metabólicas de síntesis de los compuestos de interés (Rai *et al.*, 2017). Esto debido a que siempre es más preciso el enlace entre transcriptómica, proteómica y metabolómica (Fiehn O *et al.*, 2000; Ning *et al.*, 2012; Hoopes *et al.*, 2018). Por lo tanto, se ha logrado correlacionar los perfiles de genes involucrados en vías metabólicas de interés y la abundancia de los metabolitos asociados (Shoeva *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017). Por lo tanto, el análisis transcriptómico como método predictivo para establecer modelos metabólicos hacia la identificación y cuantificación relativa de fitoquímicos se presenta como un método eficiente y novedoso (Han *et al.*, 2016; Rai *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2019).

En este sentido, los genes involucrados en las rutas metabólicas de síntesis de los flavonoides se identificaron en plantas modelo (Pollastri y Tattini, 2011; Ma *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2020), de tal manera que se desarrollaron oligos específicos para genes involucrados en su biosíntesis (Tabla 2).

Tabla 2. Referencias de acceso de las secuencias de los oligos desarrollados para genes codificantes para enzimas de síntesis de los flavonoides en NCBI. Adaptado de Peukert *et al.* (2013).

Genes candidatos	Números de acceso en NCBI
Fenilalanina ammonia-lisasa (PAL)	AB367438, X97313, X99482, X99483, Z49145, Z49146, Z49147
Cinnamato 4-hidrokilasa (C4H)	NM_001051180, NM_001053349, NM_001053354, NM_001061725
Chalcona sintasa (CHS)	Y09233, U43494
Flavanona 3-hidroxilasa (F3H)	X58138
Dihidroflavonol reductasa (DFR)	NM_00150192, Hv.23226

Por otro lado, mediante el uso de microarreglos, se evaluó la expresión de genes estructurales involucrados en la síntesis de flavonoides (*Chs*, *Chi*, *F3h*, *F3'h*, *Dfr* y *Ans*) mostrando que su co-expresión resultó en la producción de antocianina, revelada por HPLC-UV. Además, se evaluó la relación entre el gene *Ant2* (acceso GenBank HM370298) como regulador de los genes de estructura y la biosíntesis de antocianinas (Shoeva *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Otros factores de regulación de la síntesis de antocianinas han sido identificados de las familias de los MYB, MYC and WD40. Dentro de ellos, se identificó el *Ant 13* como factor de regulación de los genes *Ant 17*, *18*, *19*, *22* y *26* que determinan la estructura de los flavonoides (Xu *et al.*, 2015).

Debido al polimorfismo de estos genes codificantes, el contenido en flavonoides se ha visto impactado. En efecto, se ha mostrado que un nivel de expresión mayor del gen *Fe4CL2*, llevó a una mayor producción de rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxiavona-3-ramnoglicósido) en comparación con la expresión de otros genes homólogos. En el caso de la quercetina, precursor de la rutina, se identificaron isoformas del gen codificante para la enzima FLS, y se correlacionaron sus perfiles de expresión con la abundancia diferencial de los metabolitos (Li *et al.*, 2014).

De la misma manera, la anotación funcional del transcriptoma *de novo* de varias plantas medicinales y plantas modelo permitió la identificación de genes de la biosíntesis de los flavonoides, y la sobre expresión de diferentes *clusters* de estos genes se relacionó con la presencia de flavonoides específicos en los extractos (Chen *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, los datos necesarios para realizar transcriptómica funcional y comparativa como método predictivo de la presencia de flavonoides en *A. lechuguilla* están disponibles en las diferentes bases de datos públicas.

Pocos estudios de transcriptómica o genómica en especies de agaves han sido publicados y ninguno de *A. lechuguilla* (Tabla 3). En general se enfocan en la determinación del metabolismo CAM y respuestas a estrés abióticos (Simpson *et al.*, 2011; Gross *et al.*, 2013; Shakeel *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2016; Cervantes-Pérez *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019).

Sin embargo, estos estudios han generado el conocimiento básico del genoma de los agaves como base para nuevos estudios. De acuerdo con el tamaño del transcriptoma de *A. tequilana* (293.5 Gbp) y *A. deserti* (184.7Gbp) (Gross *et al.*, 2013), y del genoma de *A. americana* (556.9 Gpb) (Abraham *et al.*, 2016), se estima que la cantidad de datos necesarios para para obtener una buena representación de la población de ARNm para el análisis transcriptómico (RNA-Seq) de *A. lechuguilla* es de 950 millones de lecturas crudas de 150 pb.

Tabla 3. BioProjects de especies de agaves registrados en NCBI.

Especies de <i>Agave</i>	Tipo de proyecto	Numero de acceso NCBI
<i>A. americana</i>	Genoma del cloroplasto	PRJNA356554
	Genoma completo	PRJNA323312
	Transcriptoma	PRJNA244686
<i>A. attenuata</i>	Genoma del cloroplasto	PRJNA359954
<i>A. deserti</i>	Transcriptoma	PRJNA193173
<i>A. sisalana</i>	Transcriptoma	PRJNA359581
<i>A. tequilana</i>	Genoma completo	PRJNA253745
		PRJNA507288
	Transcriptoma	PRJNA193469

2.6 Evaluación de las propiedades biológicas

2.6.1 *In vitro e in vivo*

Una vez que los flavonoides están caracterizados, se pueden evaluar sus propiedades biológicas para sugerir aplicaciones. Ante todo, se establece que un compuesto bioactivo es una molécula que tiene la capacidad y la habilidad de interactuar con uno o varios componentes de un tejido vivo y que presenta una amplia diversidad de efectos (Guaadaoui *et al.*, 2014). Para demostrar estos efectos, se requiere de pruebas diseñadas de manera específica.

Las propiedades biológicas de los flavonoides se relacionan con sus funciones de secuestro de radicales de oxígeno y metales, por interactuar con enzimas inhibiendo o activando sus actividades, y por lo regular de la señalización celular y la expresión génica (Granato *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Estos compuestos actúan de manera exógena o endógena a diferentes niveles de las cadenas de reacciones celulares (Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018).

Los flavonoides como compuestos antioxidantes no enzimáticos pueden detener, retardar o prevenir el daño oxidativo actuando a lo largo de la cascada de reacciones que producen radicales libres (Suzuki y Mittler, 2006). Los diferentes tipos de estrés oxidativo que generan especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) pueden ser físicos, químicos o biológicos. Las pruebas de actividad antioxidante (AA) se clasifican según el mecanismo que se pretende neutralizar. Por lo tanto, 29 métodos *in vitro* e *in vivo* de caracterización de la AA se han desarrollado (Alam *et al.*, 2013; Granato *et al.*, 2018).

De igual manera, los flavonoides pueden influir en mecanismos celulares relacionados con las reacciones inmunes y el mecanismo inflamatorio involucrados en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades como diabetes, cáncer, patologías cardíacas, y enfermedades causadas por agentes patógenos (Antunes-Ricardo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Las propiedades antiinflamatoria e inmunomoduladora se evalúan *in vitro* principalmente en líneas celulares, midiendo parámetros tales como los niveles de citoquinas. Asimismo, en bioensayos *in vivo*, se determina la producción de estas enzimas en muestras de sangre con pruebas ELISA, por ejemplo (Chen *et al.*, 2009; El-Hawary *et al.*, 2020). Existe una plétora de líneas celulares y organismos que pueden ser usados para el cribado de los efectos terapéuticos de los flavonoides. Asimismo, hay una gran diversidad de mediadores enzimáticos y no enzimáticos involucrados en las respuestas celulares que pueden ser medidos para determinar sus mecanismos de acción.

Por ejemplo, la actividad anticancerígena se relaciona con la actividad inmunomoduladora, tomando a la apoptosis como el mecanismo clave (Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018). Hasta hace poco, la investigación se limitaba al cribado de los compuestos en las 60 líneas celulares del catálogo NCI60 (National Cancer Institute), ahora existe más de 1,000 líneas celulares en la CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia por sus siglas en inglés) (Ghandi *et al.*, 2019; Warren *et*

al., 2021), de las cuales cada laboratorio puede tener sus propias variantes (Fusenig *et al.*, 2017).

La determinación de tales efectos (antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno e inmunomodulador) de los compuestos en líneas celulares es un proceso clave en el desarrollo de medicinas. Sin embargo, se ha mostrado que debido a la especialización de tales líneas en cultivos *in vitro*, los mecanismos celulares difieren de lo encontrado *in vivo* en muestras de tejidos cancerígenos (Warren *et al.*, 2021).

Por otro lado, el efecto benéfico de los flavonoides se relaciona con su potencial prebiótico, en particular en el caso de los flavonoides glicosilados (Martinez-Gutierrez *et al.*, 2017). En general, *in vitro*, la evaluación del potencial prebiótico se realiza por estimación del efecto sobre el crecimiento de microorganismos benéficos. De igual manera, el efecto antimicrobiano se evalúa *in vitro* midiendo el efecto de inhibición de crecimiento de cepas patógenas cultivadas en medio sólido o líquido (Castillo *et al.*, 2010; Rizwan *et al.*, 2012; Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Sin embargo, es recomendable realizar pruebas *in vivo* con aplicaciones en organismos (tanto plantas como animales) de interés y realizar retos de patogenicidad, debido a la complejidad de los mecanismos involucrados (Jorgensen y Ferraro, 2009; Iser *et al.*, 2016; Jasso-Padilla *et al.*, 2017). Para medir el efecto, la metagenómica se emplea como un método de alto rendimiento que permite evaluar el efecto de los compuestos en la modulación de las comunidades microbianas considerando la proporción entre microorganismos benéficos y patógenos por ejemplo (Ortiz-Estrada *et al.*, 2019).

En resumen, hay una gran diversidad de pruebas disponibles para evaluar las propiedades biológicas y mecanismos de acción de los flavonoides *in vitro* e *in vivo*. En general, aun cuando se eligen las pruebas de acuerdo al enfoque de investigación, es necesario realizar varios ensayos para poder proponer la aplicación de un producto bioactivo. Esto puede llevar mucho tiempo antes de identificar una actividad efectiva, y demostrarla cumpliendo los requisitos de comercialización.

2.6.2 *In silico*

Con base en lo anterior, el uso de herramientas de química computacional se establece como una metodología exploratoria que permite dirigir y entonces limitar a lo mínimo las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, la CADD (Computer-Aided Drug Design por sus siglas en inglés) permite el descubrimiento o diseño de nuevas moléculas bioactivas de manera dirigida específicamente a algún agente patógeno, o algún mecanismo celular blanco como la inflamación o las vías de desarrollo de cáncer (Schilke *et al.*, 2020; Kuypers *et al.*, 2021).

Estas herramientas informáticas se basan en las características fisicoquímicas de una molécula para predecir su potencial de interacción con moléculas blanco. Primero se considera la estructura 2D y 3D de la molécula (*ligand*) y se compara con bases de datos como Zinc DB, DrugBank, PubChem, ChEMBL, Chemspider, Molecule DB y Approved Drugs, para estimar las similitudes con otros agentes activos. Posteriormente, se eligen los receptores blancos (*target*) por cribado virtual de la librería de *ligand* con bases de datos de *target*, de las cuales la más usada es PDB (Grosdidier *et al.*, 2007; Daina *et al.*, 2014). Finalmente, se predicen las interacciones entre el *ligand* y el *target* considerando la dinámica molecular y la energía libre (cargas) de ambas moléculas para modelizar las reacciones espontaneas entre las dos moléculas. Estas interacciones pueden ser polares, apolares y por formación de puente de hidrógeno (Torres *et al.*, 2019).

Este método ya se aplicó para elucidar el mecanismo de acción de los flavonoides identificados en los extractos de hojas de *A. lechuguilla* en la actividad anticáncer observada *in vitro* en líneas celulares del cáncer del pulmón. Para esto, cribaron el efecto de los tres flavonoides con 18 proteínas involucradas en la apoptosis de células cancerígenas. Se ha demostrado el potencial de acoplamiento del bioflavonoide con tres de las proteínas cribadas con interacciones polares, no polares y puentes de hidrógeno. La quercetina se acopla con cinco receptores por interacciones polares y puente de hidrogeno. No se observó interacción apolar. Entre ellos el TNF-R1 considerado como el principal mediador de inducción de la apoptosis sugiriendo el efecto de estos flavonoides como anticáncer exógeno. El kaempferol se acopló con otra proteína distinta de la cadena de reacción, la Fas/CD95 que es intracelular, por lo que se considera como agente anticáncer endógeno (Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018).

Al igual que el uso de la identificación de flavonoides con transcriptómica, la predicción *in silico* de la bioactividad de los flavonoides se inscribe en el desarrollo de una metodología base de bioprospección de alto rendimiento, efectiva, y ahorradora de tiempo y costos de análisis. Asimismo, se puede proponer el *guishe* como fuente de flavonoides bioactivos los cuales tienen que obtenerse por medio de métodos adecuados para su uso posterior.

2.7 Obtención de los flavonoides

2.7.1 Procesamiento de la biomasa

2.7.1.1 Secado

Para la conservación de los fitoquímicos de interés como los flavonoides, la liofilización es considerada como el mejor procedimiento, ya que impide la actividad enzimática intrínseca de la fuente orgánica que podría degradar los compuestos, además de que mantiene la estructura de los compuestos y en consecuencia sus propiedades biológicas (Marston y Hostettman, 2006). Sin embargo, aunque es ampliamente empleada a nivel laboratorio, la liofilización es demandante en energía y tiempo de proceso por lo que no es adecuada para su uso a nivel industrial, a menos que el costo de su uso sea compensado con la demanda de los productos que se formulen (Rodríguez *et al.*, 2016).

Por tal motivo, existen técnicas alternativas para el secado de la biomasa de *Agave spp.* a grandes escalas, como el secado en condiciones naturales (temperatura ambiente y luz) (Iser *et al.*, 2020) y en condiciones artificiales en horno a 45°C (Rios-González *et al.*, 2018), 60°C (Iser *et al.*, 2020), 105°C (Valdez-Vazquez *et al.*, 2020). Sin embargo, la temperatura y la exposición a la luz son los factores determinantes en la estabilidad de la estructura y la función de los flavonoides (Biesaga, 2011; Antunes-Ricardo y Gutiérrez-Urbe, 2018; Santana-Jiménez *et al.*, 2020). Por lo tanto, su efecto en los flavonoides del *guishe* se debe considerar para proponer un método de secado y de almacenamiento adecuado.

2.7.1.2 Pretratamiento de la biomasa

Uno de los retos más importantes en cuanto al aprovechamiento de residuos vegetales para la obtención de bioactivos naturales se relaciona con los rendimientos para obtener la mayor cantidad de los compuestos de interés (Santos-Zea *et al.*, 2012; Arevalo-Gallegos *et al.*, 2017; FAO, 2019; Mehmood *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2021). Antes que el aspecto

técnico de los procesos, la estructura limitante más importante durante la extracción de compuestos como los flavonoides es la pared celular compuesta principalmente de polímeros complejos de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina (Gil-Chávez *et al.*, 2013; Boulila *et al.*, 2015).

En el caso de la lechuguilla, la composición del material lignocelulósico se reportó previamente en los estudios para su uso en bioenergía (Tabla 4). Asimismo, los pretratamientos ácidos, alcalinos y térmicos de la biomasa de *A. lechuguilla* han sido estudiados como pasos previos para la producción de biogás y biocombustibles (Díaz-Blanco *et al.*, 2018; Ríos-González *et al.*, 2021). Sin embargo, se sabe que estos procesos modifican las propiedades físico-químicas de los compuestos fenólicos (Puri *et al.*, 2012). Por ejemplo, Carmona *et al.* (2017) reporta una disminución de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de *A. lechuguilla* pretratada a pH alcalino.

Tabla 4. Proporciones de los carbohidratos en la matriz lignocelulósica del *Agave lechuguilla* Adaptado de Carmona *et al.* (2017).

Componente químico	Composición (% base seca)
Celulosa	17.72 ± 0.68
Hemicelulosa	17.15 ± 0.91
Lignina soluble	3.64 ± 0.34
Lignina insoluble	3.68 ± 0.21

En contraste, la hidrólisis enzimática permite una digestión eficiente de la matriz lignocelulósica sin afectar a los compuestos bioactivos (Gil-Chávez *et al.*, 2013; Huynh *et al.*, 2014; Nadar *et al.*, 2018; Bilal y Iqbal, 2019; Mill *et al.*, 2019). Esta técnica, permite liberar los compuestos fenólicos integrados en la pared celular (Fig. 13). Por ejemplo, en el caso de las matrices de alimentos, el 24% del contenido total en fenoles (TPC) se encuentra ligado a la celulosa, hemicelulosa y pectina (Nadar *et al.*, 2018).

Por lo que, con el uso de este tipo de extracción se favorece la liberación de los compuestos de interés como los flavonoides, sin importar el método de purificación final. Por ejemplo, la extracción de kaempferoles glicosilados (Huynh *et al.*, 2014) e isoramentinas glicosiladas (Mill *et al.*, 2019), se incrementó usando los mix enzimáticos Viscozyme y Rapidase (Novozyme). Del mismo modo, usando un mix preparado con pectinasa y celulasa (1:2, w/w)

se lograron extraer 16 flavonoides con mayores rendimientos que sin pretratamiento enzimático (Xu *et al.*, 2018).

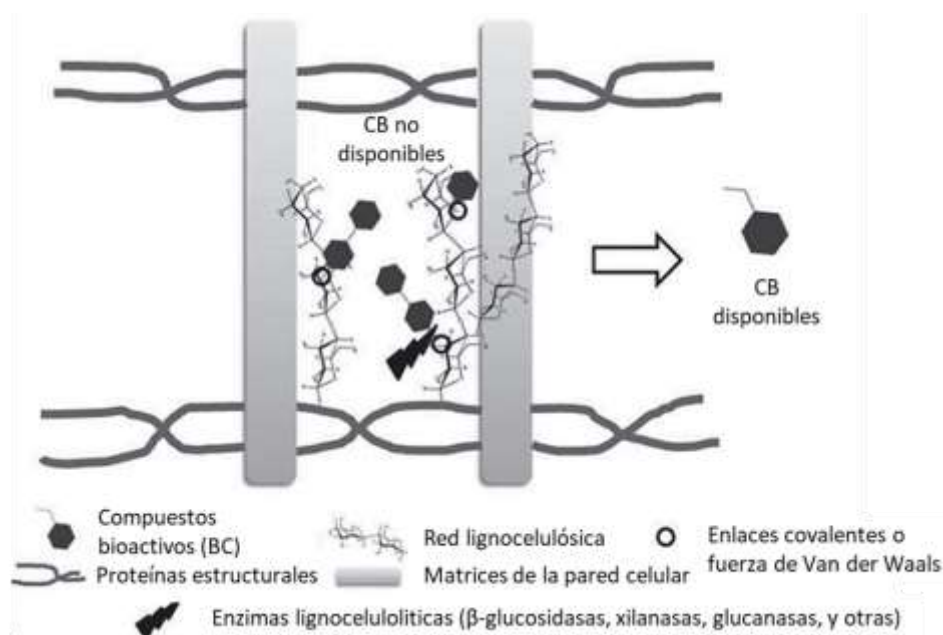


Figura 13. Hidrólisis enzimática para la liberación de compuestos bioactivos ligados a la matriz lignocelulósica de las plantas. Adaptado de Gil-Chavez *et al.* (2013).

Además, bajo el concepto de biorrefinería el pretratamiento enzimático pretende facilitar la extracción de los metabolitos secundarios (Nadar *et al.*, 2018), y a su vez liberar los azúcares necesarios para la fermentación como parte de la producción de biocombustibles (FitzPatrick *et al.*, 2010; Ortíz-Méndez *et al.*, 2017). Así, la integración de una etapa de hidrólisis previa a la extracción es relevante tanto para mejorar la recuperación de flavonoides como para ser contemplado como paso común en el concepto de biorrefinería.

2.7.2 Técnicas de extracción

2.7.2.1 Método convencional

Entre las técnicas convencionales, la extracción Soxhlet es la más empírica y la más usada a nivel industrial para la extracción de compuestos fenólicos con un tiempo de extracción que varía de 1h a 24h según la biomasa. Asimismo, se usan diversos solventes dependiendo de la polaridad de los compuestos que se busca extraer, con una preferencia para el metanol, etanol, acetato de etilo y acetona (Paes *et al.*, 2014; Caballero Galván *et al.*, 2017; Dávila *et al.*, 2017; Farooq *et al.*, 2020). Sin embargo, tanto el tiempo del proceso como la cantidad de solventes usados hace que el uso de esta técnica de extracción sea siempre controversial por los impactos ambientales negativos que genera.

Como alternativa al uso de solventes orgánicos se ha probado el uso de manteca de coco y lanolina para la obtención de compuestos fenólicos de *A. lechuguilla*, pero reportan contenidos de TPC mucho más bajos que con el uso de metanol por ejemplo (Mendez *et al.*, 2012; Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Por otro lado, los extractos acuosos de agaves que presentan buenos contenidos en compuestos fenólicos y flavonoides relativos, también están relacionados con una mayor citotoxicidad (Barreto *et al.*, 2017), y una menor actividad antimicrobiana (Hammuel *et al.*, 2011; Martínez Hernández, 2017).

2.7.2.2 Métodos no convencionales

Por lo tanto, se busca preferencialmente el uso de nuevas técnicas no convencionales como la extracción asistida por ultrasonido y la asistida por microondas. Estas técnicas son muy eficientes para la obtención de flavonoides, en particular debido al efecto físico en las matrices vegetales por la aplicación de frecuencias u ondas, lo que favorece la extracción de los metabolitos (Wong Paz *et al.*, 2015; Barba *et al.*, 2016; Périno *et al.*, 2016; Farooq *et al.*, 2020). Estas técnicas son consideradas como amigables para el medio ambiente porque limitan el tiempo de operación y la cantidad de solventes en comparación a la extracción por Soxhlet. Sin embargo, siguen siendo métodos que son difícilmente selectivos por lo que se requieren pasos de purificación (Atanasov *et al.*, 2021). La purificación agrega todavía uso de diversos solventes orgánicos al proceso. Además de generar pérdida de los compuestos de interés entre las diferentes fases de elución por polaridad (Del Valle *et al.*, 2005). Asimismo, las trazas de solventes en los productos finales puede llevar a restricciones de uso, posteriormente. Por otro lado, la extracción por sonicación o microondas han mostrado límites en el escalamiento y en la automatización de los métodos (Périno *et al.*, 2016; Caballero Galván *et al.*, 2017).

Debido a lo anterior, se ha explorado el uso de extracción en campos eléctricos (PEF, POH, y HVED), modificando las propiedades de los solventes (ASE, DES, HSAE), aplicando altas presiones (PLE, HHP, HPP, y PHWE) y usando las propiedades críticas de los fluidos (SbFE y SFE) (Barba *et al.*, 2016; Castro-López *et al.*, 2017; Leong *et al.*, 2019; Chemat *et al.*, 2019; Panzella *et al.*, 2020). Entre ellas, la extracción por fluidos supercríticos (SFE) presenta la ventaja de ser un proceso de extracción y purificación al mismo tiempo, y se considera como sustentable y factible para su escalamiento a nivel industrial (Shan *et al.*, 2012; Del Valle,

2015; Ciarlini *et al.*, 2017). De hecho, se aplica a nivel industrial desde los años 80 como proceso para descafeinar el café (Zosel, 1981).

2.7.2.3 Extracción por fluidos supercríticos

La extracción por fluidos súpercríticos se fundamenta en conceptos fisicoquímicos de la materia, tomando principios de la termodinámica, y la transferencia de masa (Del Valle y Aguilera, 1999; Cox y Chapman, 2001; Logan, 2003; García-Pérez *et al.*, 2017; Murias *et al.*, 2017). Básicamente, los fluidos en condiciones supercríticas tienen estructura, propiedades y comportamiento en dos estados de la materia, gas y líquido. Cuando se aumenta la temperatura, se aumenta la agitación de las moléculas y el volumen ocupado por un fluido por lo que se limitan las interacciones intermoleculares. A ese fenómeno, cuando se adiciona una presión suficiente, se limita la expansión térmica del volumen por lo que no alcanza el cambio de estado y se encuentra justo al límite (Fig. 14). Los fluidos en condiciones supercríticas tienen un poder de solubilización incrementado debido a la baja viscosidad y un alto potencial de difusión a través de tejidos vegetales (Chemat *et al.*, 2019).

Uno de los solventes más utilizados en esta técnica es el CO₂ que es de bajo costo, es reciclable, no inflamable e inocuo (Barba *et al.*, 2016). Además, sus parámetros en condición supercrítica (Tabla 5) permiten conservar la integridad de las moléculas extraídas. En este estado, el CO₂ tiene una densidad de 10² a 10³ kg/m³, una difusividad de 10⁻⁷ m²/s y una viscosidad de 5x10⁻⁴-10⁻⁵ Pa/s (Del Valle y Aguilera, 1999).

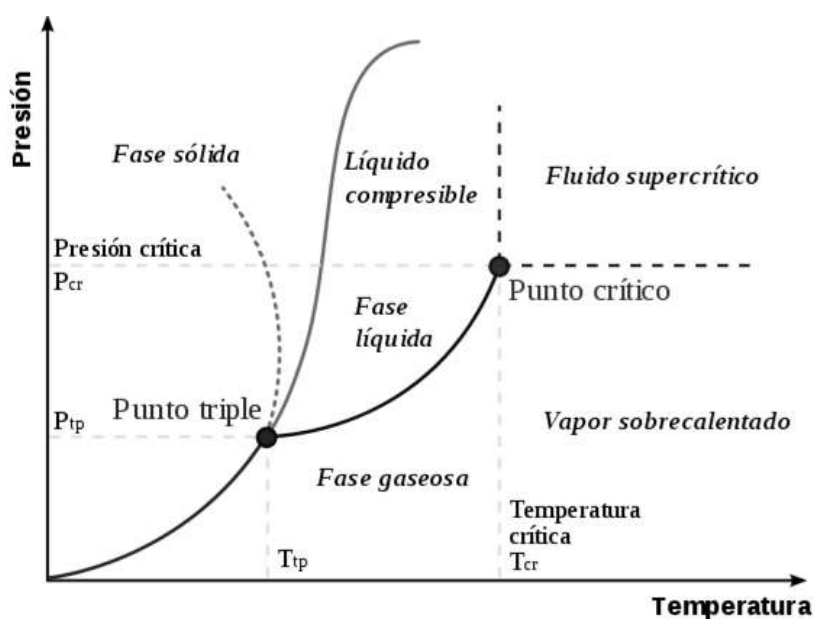


Figura 14. Diagrama de estado de un fluido en función del aumento de temperatura y presión. Adaptado de Logan (2003).

Tabla 5. Parámetros físicos del punto crítico de tres solventes, CO₂, etanol y agua.

Solvente	Peso molecular (g/mol)	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (MPa)	Densidad crítica (g/cm ³)
CO ₂	44.01	31.25	7.38	0.469
Etanol	30.07	32.3	4.87	0.203
Agua	18.02	374.3	22.12	0.348

Para extraer un compuesto de manera específica por SFE, es necesario conocer las características fisicoquímicas precisas del compuesto a extraer para evaluar el efecto de los parámetros de la técnica en los extractos (Antunes-Ricardo *et al.*, 2017). En el caso de los flavonoides, las características fisicoquímicas son diversas debido a la variedad de estructuras. De manera general, por la polaridad de los flavonoides, es necesario agregar un co-solvente para aumentar la polaridad CO₂ y así favorecer la solubilidad de los compuestos en el CO₂. Con esto, se incrementan los rendimientos específicos de extracción (Fleck *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998; Pieck *et al.*, 2015). El co-solvente más utilizado es el etanol debido a sus características supercríticas del mismo rango que los del CO₂ en comparación al agua que es el solvente más polar (Tabla 5).

En el contexto de extracción de compuestos bioactivos de interés, en trabajos previos se han logrado extraer moléculas con rendimientos comparables o superiores a los métodos extractivos convencionales (Shan *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016a; Correa *et al.*, 2017;

Santos *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha mostrado una mayor conservación de la actividad biológica, en particular de la capacidad antioxidante, en los productos extraídos (Liza *et al.*, 2010; Paes *et al.*, 2014; Babova *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016b; Monroy *et al.*, 2016).

Por ejemplo, se logró extraer de manera específica la emodina en mayores proporción en los extractos obtenidos por SFE (1 ml/min CO₂ + 35% etanol, 40°C, 15 MPa) que por Soxhlet, y los rendimientos específicos, el contenido en TPC y la actividad antioxidante de los extractos se encuentran en los mismos rangos confirmando la eficiencia de la SFE en comparación con el método convencional (Fig. 15). En otro estudio, se extrajeron isorhamnetinas glicosiladas por SFE (80 g/min CO₂ + 5% etanol, 50°C, 300 bar) y quercetina metilada (100 g/min CO₂ + 5% etanol, 35°C, 400 bar) a partir del nopal (*Opuntia ficus-indicus*) por lo que se propuso esta técnica como alternativa a la extracción por solvente (Antunes-Ricardo *et al.*, 2017). Considerando los flavonoides previamente descritos en la lechuguilla (quercetina, kempferol y derivados glicosídicos), el uso de la SFE tomando como referencia el proceso aplicado al nopal aparece como una alternativa prometedora a la extracción por solventes.

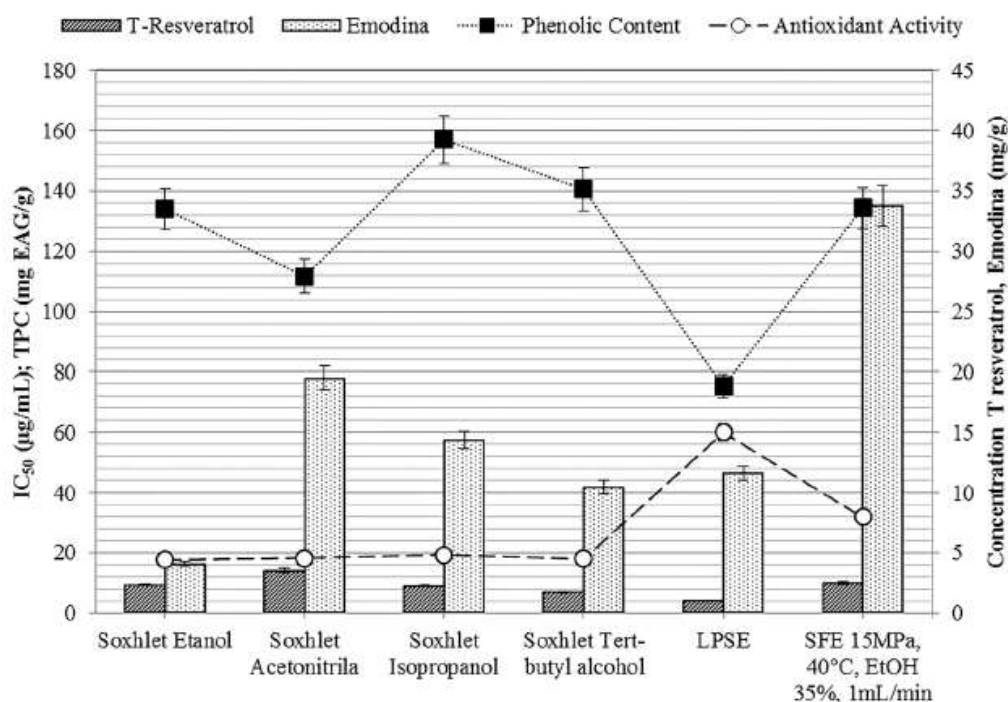


Figura 15. Concentración de compuestos fenólicos (mg/g), concentración en fenoles totales y IC₅₀ (µg/mL) de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con diferentes métodos de extracción. Reproducido de Santos *et al.* (2017).

Asimismo, con la determinación de las condiciones adecuadas para la extracción de los flavonoides a partir del *guishe* con la implementación de la SFE se pretende obtener extractos

enriquecidos en compuestos bioactivos de alta calidad. Además, usando solventes aprobados, se obtiene un extracto purificado que cumple con los requisitos para aplicaciones posteriores (FDA, 2020). Por lo tanto, se pueden establecer las recomendaciones para uso de estos extractos en la formulación de productos comerciales.

2.8 Requisitos para establecimiento de fichas técnicas

Para llegar al mercado, un producto tiene que cumplir con varios requisitos. Como se ha mencionado anteriormente, según la aplicación a la que se dirige el producto final, se tienen que realizar una serie de pruebas *in vitro* e *in vivo* basadas en los protocolos establecidos a nivel internacional como los de la OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) como pruebas de citotoxicidad *in vitro* IC50 (OECD 129, 2010), de fototoxicidad *in vitro* (OECD 432, 2004) y de inocuidad *in vivo* (OECD 423, 2001). Posteriormente, los resultados se presentan frente a comités de ética para autorizar ensayos *in vivo* más avanzados para comprobar la efectividad de los productos. En farmacología por ejemplo esto corresponde a la fase de ensayo clínico.

Sin embargo, al igual que para la bioprospección y la evaluación de la bioactividad, también existen herramientas de predicción *in silico* de las características farmacodinámicas como alternativas al uso de estas pruebas. En efecto, ya se pueden predecir las características de adsorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) de una molécula de manera precisa y aceptada (Daina y Zoete, 2016; Daina *et al.*, 2017; Guéniche *et al.*, 2021; Rameshkumar *et al.*, 2021).

3 JUSTIFICACIÓN

La industria del aprovechamiento de la lechuguilla para la obtención de fibras, genera un residuo (*guishe*) que representa el 85% de la cosecha. Esta materia vegetal se desperdicia por completo, generando problemas ambientales y económicos. Sin embargo, debido al esquema de producción establecido para la fibra a nivel nacional, y al desarrollo de plantaciones comerciales, *el guishe* puede considerarse como un recurso abundante, perenne y relevante. De tal manera que puede usarse como una materia prima con potencial biotecnológico.

En este contexto, los estudios previos de caracterización del residuo han descrito los beneficios de los extractos de *A. lechuguilla* como antioxidantes, anticancerígenos, aditivos alimenticios, antibacterianos y antifúngicos. Por tal motivo, el *guishe* de la lechuguilla como fuente sustentable de fitoquímicos, es interesante para diversos sectores productivos como el cosmético, el farmacéutico, el agrícola, el acuícola, o la industria alimenticia. Y como una alternativa a los productos sintéticos.

Por otro lado, los estudios relacionados con los análisis químicos de estos extractos son escasos, y muestran la presencia de saponinas, terpenos, fructanos y polifenoles. Las saponinas y fructanos de la lechuguilla y de los agaves en general están ampliamente estudiados, mientras que los polifenoles, y específicamente los flavonoides solo se describen escasamente y de manera superficial. Aun cuando son reconocidos por tener una amplia gama de actividades y un mercado abierto con potencial a corto plazo.

En relación al grupo de los flavonoides del *A. lechuguilla*, la descripción de los perfiles se ha limitado debido a la inespecificidad y complejidad del análisis con métodos de química analítica. Por esta razón, en la presente investigación se propone iniciar con la caracterización de los flavonoides del *guishe* de *A. lechuguilla* usando la bioprospección *in silico* con la identificación de los flavonoides por medio de análisis transcriptómicos y la predicción de sus actividades biológicas por modelización computacional de la relación estructura-actividad. Estos métodos se han propuesto, en los últimos años, como una alternativa robusta, de menor costo, y mayor eficiencia para la identificación de fitoquímicos bioactivos.

Adicionalmente, la generación del primer transcriptoma del *A. lechuguilla* y la validación del uso de la bioprospección por análisis de transcriptómica permitirá proponer tanto los datos generados, como la metodología base para investigar otros compuestos bioactivos del *guishe*. De igual manera, la predicción *in silico* de las propiedades biológicas de los flavonoides identificados, permitirá dirigir la aplicación final de los productos derivados, limitando la cantidad de pruebas *in vitro* e *in vivo* que atrasan el desarrollo de productos innovadores y comerciales.

Además, la valorización del *guishe* de la lechuguilla por su contenido en flavonoides, está sustentada por los cambios de consumo, y los nuevos objetivos internacionales que promueven el uso de residuos agro-industriales como fuentes naturales de bioactivos de usos múltiples.

Sin embargo, el aprovechamiento de biomásas vegetales residuales es un reto en varios aspectos. Por un lado, la composición variable de los fitoquímicos según el origen de la biomasa, el manejo postcosecha, y su procesamiento hasta obtener el producto de interés. Por lo tanto, es necesario considerar la implementación de tecnologías que limiten el impacto ambiental de los bioprocesos y aseguren la calidad de los productos derivados. Con todos estos retos, resulta indispensable evaluar el perfil en flavonoides del *guishe* entre las regiones productivas, los métodos de secado, las condiciones de pretratamiento y los métodos de extracción para la obtención de productos naturales de alta calidad, con lo que se podrá recomendar su implementación a nivel industrial, así como su integración dentro un esquema de biorrefinería que se pretende desarrollar para el uso integral del *A. lechuguilla*.

Finalmente, con base en lo anterior, se pretende, además, impulsar la cadena de valor de la lechuguilla, con el objetivo de beneficiar a los campesinos que viven de su cosecha, a través del aprovechamiento industrial del *guishe* como materia prima para la extracción de flavonoides. Que como externalidad positiva permitirá limitar la contaminación por el desecho y quema de este residuo en las zonas productivas.

4 HIPÓTESIS

Si se identifican y extraen de manera óptima flavonoides con propiedades bioactivas a partir del *guishe* de *Agave lechuguilla*, entonces será una fuente de insumos para formulación de productos naturales de aplicación industrial

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y extraer flavonoides de interés comercial del residuo de tallado de *Agave lechuguilla* para proponerlos como insumos para la industria.

5.2 Objetivos particulares

- 1) Identificar y cuantificar el contenido en flavonoides en el *guishe* de *Agave lechuguilla* por análisis de transcriptómica y análisis bioquímicos.
- 2) Evaluar las propiedades bioactivas de los flavonoides identificados en el *guishe*.
- 3) Proponer un bioproceso de obtención de los flavonoides de interés a partir de *guishe*, considerando su disponibilidad regional y el desarrollo inicial de un paquete tecnológico.
- 4) Establecer las características de los extractos para proponerlos como componentes en formulación de productos innovadores para su aplicación a nivel industrial.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Caracterización de los flavonoides en el *guishe*

La metodología que se planteó para la caracterización de los flavonoides en el *A. lechuguilla* y el *guishe* se resumió un diagrama de flujo (Fig. 16).



Figura 16. Diagrama de flujo de la metodología para la identificación de los flavonoides del *guishe*

6.1.1 Identificación mediante transcriptómica

6.1.1.1 Material vegetal

Las muestras de *guishe* y hojas completas del *Agave lechuguilla* se obtuvieron el 25 de agosto del 2017 del el Ejido Tuxtepec (26°11'29.8" LN; 101°11'0.96" LW). La recolección del cogollo se efectuó respetando la NOM-008-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 2003) y con pobladores registrados. Los cogollos se llevaron al pueblo donde se realizó el tallado mecánico de los cogollos completos. Los pobladores aprovecharon el *Ixtle* mientras se almacenó el *guishe* en bolsas negras para proteger de la luz durante el transporte hasta

Ramos-Arizpe Coahuila, México, para su procesamiento. A llegar, el *guishe* se congeló con nitrógeno líquido (LN₂) y se almacenó a -80°C para limitar el desarrollo microbiano y detener todas la reacciones químicas y enzimáticas endógenas.

6.1.1.2 Extracción de ARN de guishe y hoja de *Agave lechuguilla*

A partir del tejido de hoja y *guishe* almacenados previamente a -80°C, se trituró una fracción en mortero con nitrógeno líquido, evitando la descongelación de las muestras. Se colocaron aproximadamente 2 mg de polvo en tubos de 2ml y se agregaron 1.5 ml de Trizol (Sigma-Aldrich), se homogeneizó y se colocó en hielo durante 10 min. La muestra se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo, se homogeneizó e incubó por 10 min y se centrifugó 15 min con los mismos parámetros anteriores. Se recuperó el sobrenadante, se agregaron 500 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich), y después de 1h de precipitación se centrifugó nuevamente 10 min a las mismas condiciones. El sobrenadante fue recuperado y se le adicionó 1 ml de etanol-agua (EtOH) (70/30, v/v). Se centrifugó 5 min a 7500 rpm a 4°C antes de eliminar el EtOH 70% y se secó a aire libre durante 15 min.

El ARN fue resuspendido en 20-50 µl de agua libre de RNasa y se incubó 10 min a 55°C. La integridad del ARN fue corroborada en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) adicionándole 0.525 µl de cloro comercial. Las muestras preparadas previamente con gel red fueron cargadas en el gel y separadas por electroforesis, 1h a 80 V, el gel se reveló por fluorescencia. La cantidad de ARN en las muestras fue medida por espectrofotometría usando el equipo Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA).

A partir de las cuatro muestras previamente obtenidas, se generaron los *pools* de ARN de la hoja y del *guishe*, mediante una mezcla equilibrada. Se midieron nuevamente las concentraciones y la integridad para elegir los dos *pools* de hoja y los dos *pools* de *guishe* de mayor calidad.

6.1.1.3 Elaboración de las librerías y secuenciación RNA-Seq

Los *pools* de ARN total precipitado se enviaron a la empresa Genewiz®, New Jersey, USA, en donde se evaluó la cantidad e integridad de las muestras en Nanodrop 2000 (ThermoFisher

Scientific) y Qubit (Invitrogen), y el RIN (RNA Integrity Number por su sigla en inglés) se evaluó en TapeStation (Aligent).

La elaboración de las librerías *paired-end* la realizó la compañía de servicios siguiendo el método descrito en el protocolo Illumina® TruSeq RNA Library Prep Kit. Se utilizaron los adaptadores universales: *forward* AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAAC TCCAGTCAC y *reverse* AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA AGAGTGTA. La secuenciación de las librerías se realizó en plataforma Illumina HiSeq 2000 con una profundidad de secuenciación de 350 Mb y un tamaño de lecturas de 150 pares de bases.

6.1.1.4 Ensamblaje del transcriptoma de novo

La calidad de las lecturas se verificó con el programa FastQC y la limpieza de las lecturas de baja calidad se realizó con el programa Trimmomatic-0.32 siguiendo los parámetros sugeridos en el programa (Bolger *et al.*, 2014). Se eliminaron las secuencias de los adaptadores con la opción ILLUMINACLIP con el archivo conteniendo las secuencias específicas, se cortaron las 10 primeras bases de cada lectura para mejorar la calidad especificando la opción HEADCROP:10, y se retuvieron las lecturas mayores a 50 pb con MINLEN:50.

El ensamble *de novo* se obtuvo con el programa Trinityrnaseq-2.6.6 (Haas *et al.*, 2013) especificando diferentes tamaños de los *k-mers* a de 17-31 pb. Para cada tratamiento se evaluaron los estadísticos del ensamble, obteniendo el número de genes predictivos, el N50 y la repartición de tamaño de los *contigs*. Se eligió el ensamble de mayor calidad estadística para llevar a cabo los análisis siguientes.

6.1.1.5 Anotación funcional

Los algoritmos de alineamiento BLAST-X para homologías de secuencias nucleotídicas y BLAST-P para homologías de secuencias proteicas (Altschul *et al.*, 1990) se corrieron desde el programa Trinotate-3.0.2 (trinotate.github.io) buscando homologías en la base de datos Swissprot (57,012 entradas). Adicionalmente, se hizo un filtrado por BLAST-P del ensamble comparando con las bases de datos Embryophyta-Uniprot (5,545,476 entradas) y Viridiplantae-Uniprot (5,789,593 entradas), para asegurar el origen vegetal de las secuencias

y eliminar los contaminantes (Hoopes *et al.*, 2018). Se generaron dos bases de datos adicionales con las secuencias peptídicas de *A. tequilana* y *A. deserti* reportadas por Gross *et al.* (Gross *et al.*, 2013), y se realizó un BLAST-P para identificar los genes que tienen en común. Además, para identificar los genes involucrados en la biosíntesis de los flavonoides se procesó un BLAST-P con la base de datos Flavonoid-Uniprot (3,564 entradas) generada previamente a partir de Uniprot. Adicionalmente, se efectuó la predicción de los dominios proteicos con el programa HMMER con la base de datos Pfam (Finn *et al.*, 2011, 2014). También, se identificaron los péptidos señales por uso del programa SignalP (Petersen *et al.*, 2011), y se predijeron los dominios transmembranales con tmHMM (Krogh *et al.*, 2001). Finalmente, se verificó la ausencia de secuencias de ARNr con RNAMMER (Lagesen *et al.*, 2007). Los datos generados por estos programas fueron cargados en una base de datos SQLite dentro de Trinotate para obtener el reporte de anotación funcional de los transcritos ensamblados, que contiene información ontológica (Gene Ontology Consortium, 2004), homologías con enzimas de rutas metabólicas reportadas en KEGG (Kanehisa *et al.*, 2002) y Egnog (Powell *et al.*, 2012).

6.1.1.6 Identificación de las enzimas

Con base en la filtración de la información entre las diferentes bases de datos de manera dirigida a la caracterización de enzimas involucradas en la síntesis de los flavonoides y factores de regulación, se extrajeron los IDs de las anotaciones. Estos datos se identificaron de manera precisa y se mapearon en herramientas en línea como KEEG, PANTHER y Egnog. Con el mismo proceso se consideraron IDs de los genes sobre regulados en el *guishe*.

6.1.1.7 Expresión diferencial

Previo al análisis de expresión diferencial se estimó la abundancia de transcritos presentes en las librerías de hoja y *guishe* mediante el paquete RSEM incluido en el programa Trinity (Haas *et al.*, 2013). Se ejecutó el análisis de expresión diferencial usando el paquete edgeR (Robinson *et al.*, 2009) por lo que, procesando las matrices de datos, se obtuvieron los valores de Fold Change (logFC) > 4, False Discovery Rate (FDR) < 0.02 y p-value < 0.05. Posteriormente, se obtuvo el heatmap de los perfiles de expresión entre librerías y entre *guishe* y hoja utilizando ggplot2 (Wickham, 2011). El análisis de expresión diferencial permitió obtener los genes sobre expresados en las librerías de *guishe* en comparación con

las librerías de hoja completa. De estos genes sobre expresados y anotados se complementaron los datos de biosíntesis de los flavonoides en el *guishe* por medio de herramientas en líneas como REVIGO (Supek *et al.*, 2011).

6.1.1.8 Enriquecimiento de ontologías de genes (GO enrichment)

Para enriquecer la anotación funcional, se usó el comando `extract_GO_assignments` como parte de Trinotate y las asignaciones obtenidas fueron cargadas en Trinity y procesadas por el paquete GSeq (Young *et al.*, 2010) para obtener información de procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares en los cuales están involucrados los genes regulados diferencialmente.

6.1.2 Análisis bioquímicos del contenido en flavonoides del *guishe*

6.1.2.1 Extracción de los flavonoides

A partir de una muestra de *guishe* congelada en nitrógeno líquido, liofilizada y reducida en polvo se obtuvieron fracciones complejas por extracción con solventes. Los solventes más apropiados para la extracción de fenoles y flavonoides son el etanol y metanol en mezcla con agua. De la muestra de *guishe* se tomaron aproximadamente 300 mg de polvo en 5 ml de etanol-agua (70/30, v/v) (EtOH 70%) y metanol-agua (60/40, v/v) (MetOH 60%) para su maceración durante 45 min con asistencia de ultrasonidos a 80 Hz y a una temperatura inferior a 40°C para prevenir la degradación térmica de los compuestos. Posteriormente, se centrifugó a 5500 rpm, 15 min a 25°C, y se recuperaron los sobrenadantes que contiene la mayoría de los polifenoles. Se efectuaron las etapas de maceración y centrifugación dos veces más a partir de la misma biomasa para incrementar el rendimiento de extracción. Los sobrenadantes se juntaron para concentrarlos en Rotavapor (IKA) controlando la temperatura de la tina a 60°C lo que resulta en una temperatura en el envase de 40°C debido al vacío. Se solubilizaron los extractos con 1mL de agua destilada para luego liofilizarlos 24h a -49°C a presión inferior a 0.120 Pa. Por último, se estimaron los rendimientos de extracción por diferencia de peso.

6.1.2.2 Determinación de contenido en flavonoides de los extractos

Para la complementariedad de las técnicas e implementar la detección de todos los flavonoides potencialmente presentes en los extractos etanólicos y metanólicos, se llevaron

a cabo diferentes tipos de corrida usando distintas columnas y parámetros de operación. Los datos obtenidos se compararon con los datos bibliográficos según las metodologías usadas y las bases de datos tales como Phenol-Explorer, ChemSpider y MassBank. Finalmente, con el índice de retención y la caracterización de los espectros de masas obtenidos respectivamente, se determinó el contenido en los flavonoides en el *guishe*.

6.1.2.2.1 HPLC-ESI-Q-TOF-MS

La separación de los metabolitos se llevó a cabo en un sistema de HPLC equipado de un sistema de toma de muestra automático y una bomba de inyección cuaternaria de alta presión (1260 Infinity, Agilent Technologies®), así que un controlador de temperatura de la columna (1290 Infinity, Agilent Technologies®). Los extractos (10 mg/mL) y el estándar de quercetina (10-500 ppm) preparados en metanol y filtrados a 0.45 μ m, se inyectaron a un volumen de 5 μ L en dos columnas: una C18 (Sigma-Aldrich), con un tamaño de 250 mm, un diámetro interno de 4.6 mm y con partículas de 5 μ m, y una de bisfenol Kinetex (Phenomenex) de un tamaño de partícula de 2.6 μ m y mediciones de 50 por 2.1 mm. La temperatura de las columnas se mantuvo a 40°C. La corrida se operó con un flujo de 0,4 mL/min con un gradiente de acetonitrilo en agua dividido en 1) 1.5 min a 5%; 2) de 1.5 a 2.5 min de 5 a 100%; 3) de 2.5 a 8.50 min a 100%; 4) de 8.5 a 10 min a 100% a 5%; y 5) de 10 a 15 min a 5%. Para la inyección de los solventes de elución, se requiere algún tipo de modificador por lo que se usó el ácido fórmico a 0.1%, con el fin de eliminar la ionización de los grupos fenólicos y así incrementar la resolución de los espectros.

Para la detección de alta resolución las fracciones pasaron por el equipo ESI-Q-TOF 6530 de Agilent Jet Stream en polaridad negativa y positiva a 2 GHz. Los parámetros de operación se fijaron a un flujo de nitrógeno a 12.0 L/min, una temperatura de 325°C, una presión de 40 psig, y un voltaje del nebulizador a 4.0 kV, del capilar a 65V, del fragmentador a 150V, y del octapole RF Peak a 750V.

Los espectros se adquirieron con el software MassHunter Workstation de Agilent (versión B.02.00) y los flavonoides se identificaron haciendo una predicción de los fragmentos presentes con un programa Isotope Distribution Calculator.

6.1.2.2.2 HPLC-PDA-ESI-IT-MS/MS

La identificación de los flavonoides se complementó en un sistema RP-HPLC-MS contando con un auto-muestreador (Varian ProStar 410, USA) y una bomba de inyección ternaria (230I, Varian ProStar 230I, USA). Las muestras y estándares se inyectaron con un volumen de 5 μ L en la columna Denali C18 (Sigma-Aldrich), de tamaño de partículas de 3 μ m, una longitud de 150 mm, un diámetro interno de 2.1 mm mantenida a una temperatura de 30°C. Como fase móvil se manejó un gradiente de acetonitrilo en agua acidificada (0.2% ácido fórmico) con un flujo de 0.2 mL/min. El gradiente se manejó de la siguiente manera: 1) 0-5 min, 3-9%, 2) 5-15 min, 16% linear, 3) 15-45 min, 50% linear. De 45 a 60 min se limpia y reacondiciona la columna. Al salir de la columna, se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm por el detector PDA (Varian ProStar 330, USA).

Posteriormente, las fracciones se inyectaron en el equipo ESI y se analizaron los fragmentos ionizados en polaridad negativa en el IT (Varian 500-MS IT Mass Spectrometer). Durante el proceso, se usó el nitrógeno gas de nebulización a un flujo de 0.2 mL/min, una temperatura de 350°C, y un voltaje de 5.0 kV del nebulizador y de 90 V para el capilar.

Los datos de cromatografía se analizaron con el software Chromatography Workstation Star Toolbar de Varian (versión 6.30) y los datos de espectrometría de masas se procesaron en modo *full scan* y MS/MS con el software MS Workstation de Varian (versión 6.9).

6.1.2.2.3 Cuantificación por cromatografía líquida

Con base a los compuestos identificados por transcriptómica y HPCL-MS, se realizó una cuantificación de los flavonoides agliconas de interés (Tabla 6) por HPLC usando el segundo método descrito anteriormente (apartado 6.1.2.2.2). Para la mayoría de los estándares, se preparó la curva estándar en metanol/agua (50/50, v/v) con cinco concentraciones de 10-1000 mg/mL, y para la delfinidina y isorhamnetina de 5-500 mg/mL. Las muestras se prepararon en el mismo solvente a una concentración de 10 mg/mL. Los estándares y muestras se filtraron a 0.22 μ m.

Tabla 6. Lista de los estándares de flavonoides usados para la cuantificación por HPLC-UV.

Estándares	Abreviación	Proveedor	Peso molecular (g/mol)	Pureza
Apigenina	A	Sigma-Aldrich	270.24	95%
Catequina	Ca	Sigma-Aldrich	290.27	99%
Cianidina	Cy	Sigma-Aldrich	322.70	95%
Delfinidina	D	Sigma-Aldrich	338.70	95%
Flavanona	F	Sigma-Aldrich	224.25	98%
Hesperidina	H	Sigma-Aldrich	610.56	90%
Isorhamnetina	I	Sigma-Aldrich	316.26	95%
Kaempferol	K	Sigma-Aldrich	286.24	90%
Naringenina	N	Sigma-Aldrich	272.25	95%
Quercetina	Q	Sigma-Aldrich	302.24	95%

Una vez que se obtuvieron los espectros, se aseguró la presencia de los dichos compuestos con los espectros de masas y se estimó la abundancia de cada compuesto en mg/g de materia seca usando las siguientes ecuaciones (Stefova *et al.*, 2003):

$$\text{Concentración del compuesto } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Área del pico} - \text{Punto de intersección}}{\text{Pendiente de la curva estándar}} \quad (1)$$

$$\text{Concentración en } \left(\frac{\text{mg}}{\text{gMS}}\right) = \frac{\text{Concentración (a)} * \text{factor de dilución}}{\text{cantidad inicial de materia seca}} \quad (2)$$

6.2 Evaluación del potencial bioactivo

6.2.1 Predicción *in silico*

Con base en los flavonoides identificados por transcriptómica y con su presencia validada por análisis en HPLCV-UV-MS/MS, se elaboraron librerías de metabolitos. Para eso, las estructuras de los compuestos obtenidos con el programa ChemDraw Professional (V15.1; PerkinElmer Informatics, MA, USA). El análisis de similitudes con las bases de datos ChEMBL y PubChem se llevó a cabo cargando las estructuras en la herramienta virtual SwissSimilarity (Zoete *et al.*, 2016), y se realizó el cribado de receptores blanco en la base de datos de proteínas PDB con SwissTargetPrediction (Daina *et al.*, 2019).

Para la preparación de las moléculas para la predicción de interacción, las estructuras proteicas se descargaron de la base de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank; <https://www.rcsb.org/>; acceso en octubre 2021), y se visualizaron y se prepararon con la herramientas de AutoDock (1.5.7rc1). Se quitaron las moléculas de agua y se agregaron las cargas parciales de de Kollman. Asimismo, se minimizó la energía de los flavonoides

aplicando el campo de fuerza MMFF94 y se agregaron las cargas parciales de Gaesteiger como lo recomienda Torres *et al.* (2019).

Posteriormente, se realizó la predicción de interacción de los flavonoides con las proteínas procesando el análisis con la extensión Autodock (versión 4.2.6) desde la interface ChemDraw 3D (versión 15.1; PerkinElmer Informatics, MA, USA). Cada experimento de acoplamiento (*docking*) se configuró para terminar después de un máximo de 2,500,000 evaluaciones de energía con un tamaño de población fijado en 20 y se aplicó un paso de traslación de 0.2 Å, y de torsión de 5Å.

Por otro lado, usando la interface en línea SwissDocking (Grosdidier *et al.*, 2007) se obtuvieron los detalles de las interacciones por visualización de los resultados con el programa Chimera (Versión 1.15).

6.2.2 Prueba *in vitro*

La capacidad de captación de radicales libres se evaluó por la prueba del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Los extractos se disolvieron en agua destilada a 10 mg/mL y se prepararon diluciones. Como control positivo se usó el Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxilico), a concentraciones de 400 µM y como controles negativos se usó el agua destilada y el etanol. Se depositaron 20 µl de estas soluciones en microplacas con 180 µl de solución de DPPH previamente preparada a 25 mg/L en etanol a 4°C. Se incubó 30 h a la oscuridad y las DO se evaluaron a 540 nm. Para el estudio cinético, se incubó por 90 min a 25°C con una medición de DO cada 10 min. De manera general la capacidad de captación de radicales libres se expresa en porcentaje de inhibición del DPPH (%) en base de materia seca (Ecuación 3) (Kedare y Singh, 2011).

$$\% \text{ inhibición de radicales libres} = \left(\frac{Abs_{Radical DPPH} - Abs_{Muestra}}{Abs_{Radical DPPH}} \right) \quad (3)$$

6.3 Obtención de los flavonoides bioactivos del *guishe*

Para establecer las condiciones adecuadas para la obtención de los flavonoides bioactivos a partir del *guishe*, se consideró su variabilidad regional, el método de secado, el pretratamiento enzimático de la biomasa y el método extractivo más sostenible para la implementación del bioproceso a nivel industrial (Fig. 17).

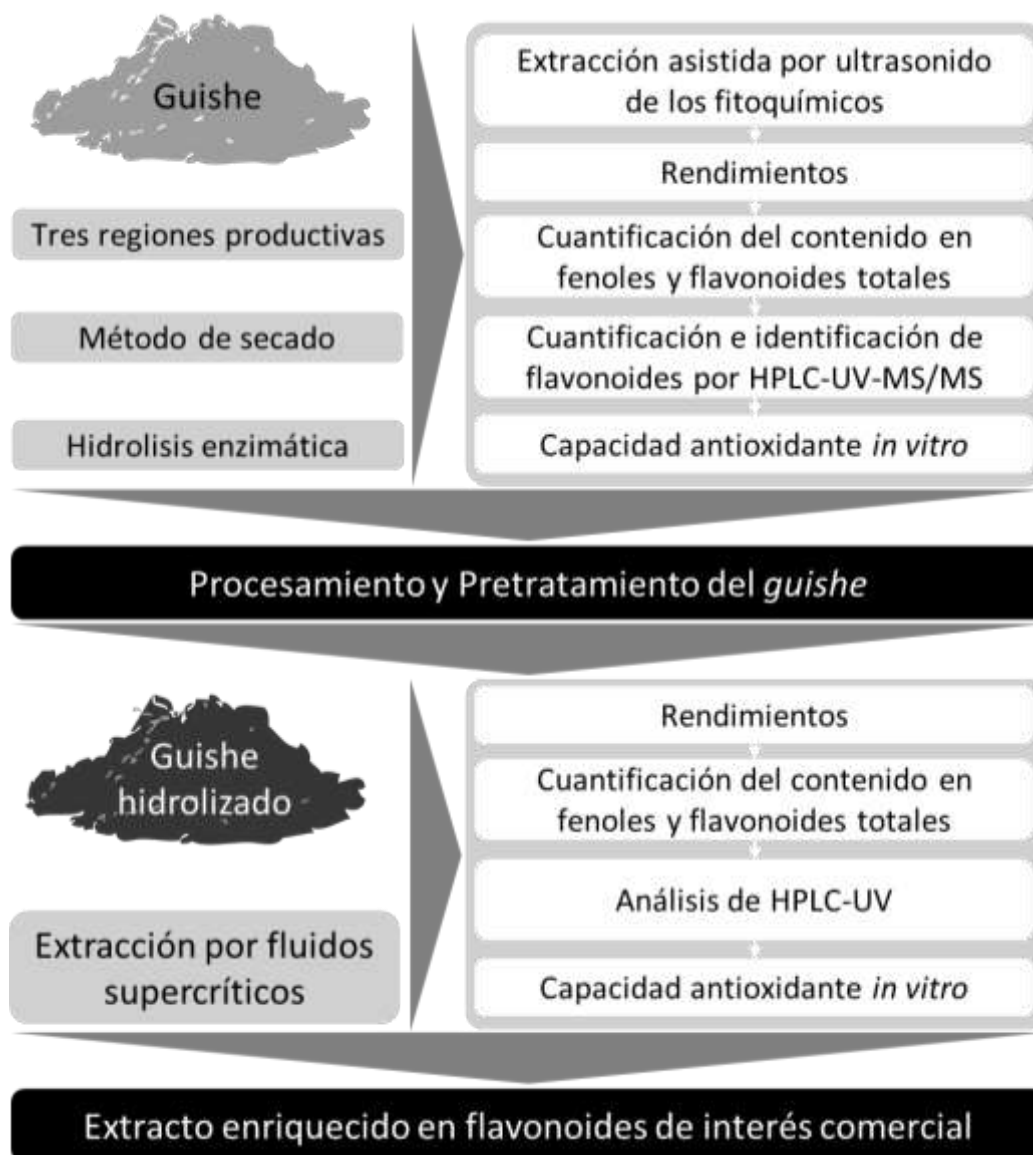


Figura 17. Diagrama de flujo de la metodología usada para establecer las condiciones adecuadas de obtención de los flavonoides de interés comercial a partir del *guishe*.

6.3.1 Variabilidad geográfica del perfil en flavonoides

6.3.1.1 Muestreo

Las muestras de *guishe* de *Agave lechuguilla* se obtuvieron de tres localidades, considerando el nivel de producción de *ixtle* y eligiendo las de mayor producción: el Ejido Matehuala, San Luis Potosí (23°28'54.3" LN; 100°37'22.1" LW), y dos Ejidos de municipios de Ramos Arizpe, Coahuila, el Ejido Cosme (25°86'76.87" LN; 101°33'08.86" LW) y el Ejido Tuxtepec (26°11'29.8" LN; 101°11'0.96" LW) con fecha de muestreo respectiva el 16, 24 y 25 de Agosto del 2018.

6.3.1.2 Datos ambientales

Los datos de humedad, temperatura, y exposición luminosa de las regiones muestreadas se obtuvieron de las bases de datos de la CONAGUA (<https://smn.conagua.gob.mx/>) para el mes de agosto y se capturaron al momento de la recolección de la muestra. También se inventariaron las especies de plantas asociadas y se observaron las especies animales, así como las marcas de enfermedad potenciales. Todo esto, con el objetivo de referenciar las condiciones bióticas y abióticas que pueden afectar al *A. lechuguilla* en el campo ya que es determinante en el contenido en fitoquímicos.

6.3.1.3 Extracción de los flavonoides

La extracción de los flavonoides del *guishe* proveniente de las tres regiones se llevó a cabo a partir de biomasa liofilizada (48 h, -49°C, 0.080 Pa) y reducida en polvo (2mm). Su extracción asistida por ultrasonido (40°C, 80 Hz) se realizó con etanol/agua (70/30, v/v) con una proporción biomasa/volumen del 1/10 por tres ciclos de 45 min con recuperación del sobrenadante entre cada ciclo. Los extractos se concentraron en evaporador rotatorio (IKA) hasta la eliminación completa del etanol previo a la liofilización (48 h, -49°C, 0.120 Pa). Todo el procedimiento se llevo a cabo cuidando los extractos de la exposición a la luz.

6.3.2 Procesamiento del guishe

6.3.2.1 Material vegetal

En cada ejidos de Coahuila, Cosme y Tuxtepec, se recolectaron aproximadamente 5 kg en de *guishe* fresco que sirvieron para la optimización de las diferentes etapas de bioproceso.

Las muestras fueron criopreservadas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta el secado.

6.3.2.2 Método de secado

Con la visión de transferir el método de obtención de flavonoides a partir de *guishe* a nivel industrial, es necesario considerar un método de secado económico y potencialmente aplicable directamente en campo por los que se consideraron cinco métodos de secado. La liofilización se manejó a -49°C, 0.080 Pa, por 48 h, con un tratamiento a la oscuridad (LO) y un tratamiento con exposición a la luz (natural y artificial) (LL). Como método más sustentable se secó al sol (S) como ocurre en campo, con una temperatura oscilando entre

28 y 38°C. Adicionalmente, se secó en condiciones controladas usando un horno por convección (Koleff-KL10, Querétaro, México) por lo que se colocó la muestra en cámara oscura con una temperatura regulada a 40°C. En ambos casos se secó por 24 h.

Para cada método se revisó la humedad de 0.5 g de muestra en termobalanza (MB45, Ohaus, México) durante 15 min a 120°C para obtener un tejido con menos de 10% de humedad y así limitar el desarrollo bacteriano y asegurar la buena conservación de las muestras. Una vez secas, las muestras fueron reducidas en polvo a un tamaño de partículas máximo de 2 mm con un molino industrial (Retsch-SM100, Hann, Alemania).

6.3.2.3 Almacenamiento

Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas cerradas herméticamente a temperatura ambiente y oscuridad.

6.3.3 Pretratamiento enzimático

6.3.3.1 Material vegetal

Para la optimización de la hidrólisis enzimática, se utilizó la biomasa de Cosme secada al horno a 40°C por 24 h.

6.3.3.2 Optimización de la hidrólisis enzimática

Los parámetros que se consideraron para el tratamiento enzimático son: las cantidades de las enzimas en unidad internacional (UI), el pH, la temperatura y el tiempo de incubación. Se eligió el diseño de experimentos (DOE por su sigla en inglés) basado en el modelo de Taguchi puesto que para la aplicación a nivel industrial es necesario reducir al máximo la variabilidad además de considerar las condiciones óptimas para la digestión enzimática. Los DOE se obtuvieron usando el programa JMP versión 5 (SAS Institute Inc, Cary, N.C.).

El primer DOE (DOE I) tenía por objetivo establecer el mix enzimático más adecuado para digerir las paredes celulares (Tabla 7). Las enzimas que se evaluaron por sus actividades lignocelulolítica fueron: lacasa (con actividad fenoloxidasa, de *Pycnoporus sanguineus* CS43; Grupo SAB, ITESM), celulasa (con actividad endo-1,4-β-D-glicosidasa, de *Aspergillus niger*; Sigma-Aldrich) y pectinasa (con actividad poligalacturonasa, de *Aspergillus niger*; Sigma-

Aldrich). Considerando la cantidad de lignina (3.6% PS), de celulosa (17.7% PS) y de hemicelulosa (17.1% PS), se estableció la cantidad mínima necesaria a 5 UI de las enzimas y se probó hasta tres veces la concentración mínima. Antes de cada prueba, se determinaron las actividades enzimáticas para ajustar las concentraciones y asegurar la reproducibilidad. El pH de la solución tampón de fosfato preparado a 0.1 M se ajustó con ácido cítrico (Sigma-Aldrich) concentrado (10 M) con valores de 4, 5, y 6. La digestión enzimática se llevó a cabo con 300 mg de materia seca en un volumen final de 10 mL y se incubó 1 h a 40°C con agitación a 180 rpm. Al final de tiempo de incubación, la reacción enzimática se detuvo por ultracongelación a -80°C.

Tabla 7. Diseño de experimentos basado en el modelo de Taguchi L9 generado de manera aleatoria para 4 variables a 3 factores: pH (4-6) y concentraciones de lacasa, celulasa y pectinasa (5-15 UI).

Taguchi L9	pH	Lacasa (UI)	Celulasa (UI)	Pectinasa (UI)	Patrón
1	4	5	5	5	----
2	4	10	10	10	-000
3	4	15	15	15	-+++
4	5	5	10	15	0-0+
5	5	10	15	5	00+-
6	5	15	5	10	0+-0
7	6	5	15	10	+--+0
8	6	10	5	15	+0-+
9	6	15	10	5	++0-

Con base en los resultados del DOE I, se establecieron los mix enzimáticos más eficientes que sirvieron para evaluar el efecto de las condiciones físico-químicas en el pretratamiento enzimático. Asimismo, se realizó el segundo diseño experimental, considerando el pH de 4 a 6 ajustado con ácido cítrico concentrado, la temperatura de incubación de 30 a 50°C y el tiempo de incubación de 0.5 a 2.5 h (Tabla 8). La digestión enzimática se manejó tal como se describió anteriormente.

Tabla 8. Diseño de experimentos basado en el modelo de Taguchi L9 generado de manera aleatoria para 4 variables a 3 factores: pH (4-6), proporciones de lacasa, celulasa y pectinasa en el mix enzimático (0-10 UI), temperatura (30-50°C) y tiempo de incubación (0.5-2.5 h).

Taguchi L9	pH	Ratio L:C:P (UI)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Patrón
11	4	0 :5 :10	30	0.5	----
12	4	5 :5 :10	40	1.5	-000
13	4	5 :5 :5	50	2.5	-+++
14	5	0 :5 :10	40	2.5	0-0+
15	5	5 :5 :10	50	0.5	00+-
16	5	5 :5 :5	30	1.5	0+-0
17	6	0 :5 :10	50	1.5	++0
18	6	5 :5 :10	30	2.5	+0-+
19	6	5 :5 :5	40	0.5	++0-

Finalmente, se realizó un tercer diseño experimental para probar dos mix enzimáticos comerciales de Novozyme® los cuales se elaboraron de manera específica para la degradación de las paredes celulares de vegetales de todos tipos. El Viscozyme compuesto de celulasa, hemicelulasa, pectinasa, arabinosa y xilanas, y el Ultraflo con celulasa y xilanas como enzimas claves del mix enzimático. Se consideraron los mismos parámetros de pH, temperatura y tiempo de incubación, tomando los valores extremos de cada uno (Tabla 9). De igual manera, se llevó a cabo la digestión enzimática a partir de 300 mg de materia seca en 10 mL bajo agitación a 180 rpm.

Tabla 9. Diseño de experimentos basado en el modelo de Taguchi L8 generado de manera aleatoria para 4 variables a 2 factores: el mix enzimático comercial, pH (4-6), temperatura (30-50°C) y tiempo de incubación (0.5-2.5 h).

Taguchi L8	Mix comercial	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Patrón
21	Viscozyme	4	30	0.5	----
22	Viscozyme	4	50	2.5	--++
23	Viscozyme	6	50	0.5	++--
24	Viscozyme	6	30	2.5	++--
25	Ultraflo	4	50	0.5	+--+
26	Ultraflo	4	30	2.5	+--+
27	Ultraflo	6	30	0.5	++--
28	Ultraflo	6	50	2.5	++++

6.3.3.3 Validación experimental

Se hidrolizaron un total de 2.1 kg de biomasa en considerando y previendo las necesidades para el la optimización de la extracción supercrítica. La hidrólisis del *guishe* se realizó respetando la balanza biomasa/solución tampón de 1/10 (w/v). El pH del buffer fosfato preparado a 0.1 M se ajustó usando ácido cítrico a 1 M. Se colocaron 35 g de *guishe* seco y molido en matraces de 500 mL con un volumen de buffer de 350 mL. La incubación se llevó a

cabo a 40°C, 180 rpm y a la oscuridad durante 2.5 h. Posteriormente, se colocaron los hidrolizados en charolas cubiertas de aluminio para el secado en estufa, 48 h a 40°C. La biomasa seca e hidrolizada se trituro para obtener un polvo de tamaño de partícula promedio de 2 mm (Fig. 18).

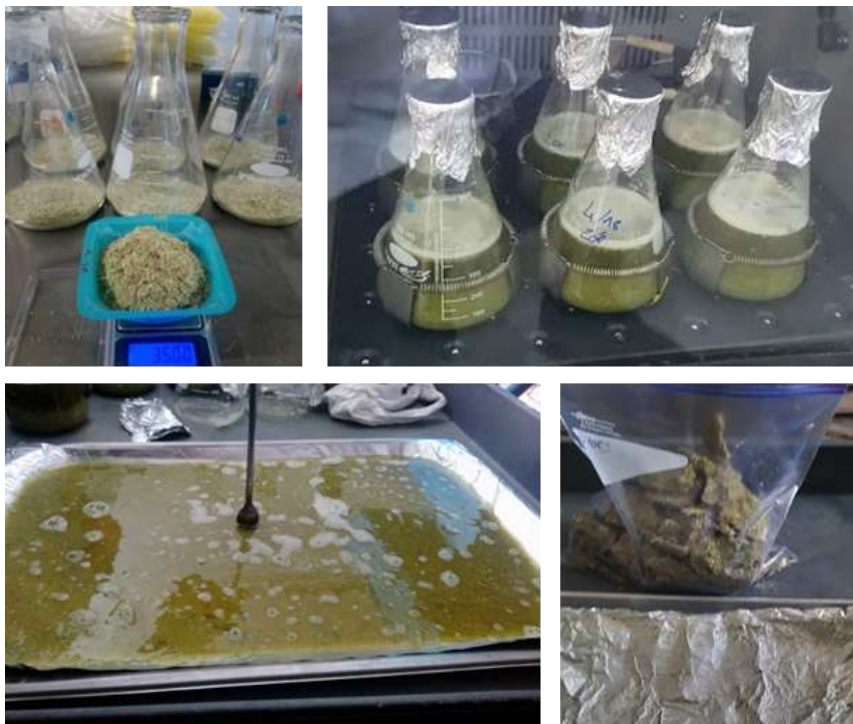


Figura 18. Hidrólisis enzimática del *guishe* a nivel matraz y secado de la biomasa hidrolizada en charolas.

6.3.4 Extracción de los flavonoides

6.3.4.1 Extracciones convencionales

Con el objetivo de optimizar la extracción por fluidos supercríticos, se busca comparar con extractos obtenidos de manera convencional a partir de la biomasa hidrolizada y almacenada bajo las exactas mismas condiciones.

Por lo tanto, se realizó una extracción convencional en triplicado con una relación biomasa/solvente de 1/10 (w/v) usando etanol/agua (70/30, v/v) e incubando 3 h a 40°C bajo agitación de 200 rpm.

Por otra parte, se repitió la extracción etanólica asistida por ultrasonido de igual manera que lo previamente reportado (3 × 45 min, 40°C, 80 Hz) usando etanol/agua como solvente (70/30, v/v).

6.3.4.1.1 Extracción por fluidos supercríticos

6.3.4.1.1.1 Optimización

Las propiedades fisicoquímicas de los flavonoides identificados en el *guishe* se estimaron con ChemDraw Professional (versión 15.1, PerkinElmer Informatics, MA, USA) basado en el método de fragmentación de Joback para temperatura crítica, presión crítica, volumen molecular crítico, capacidad calorífica y entalpía, y el método de fragmentación de Joback modificado por S.E. Stein para temperatura de fusión.

Como variables independientes que influyen más en la especificidad de la SFE, se estableció un rango de temperatura de 40 a 70 °C, y de presión de 150 a 350 bar. Por otra parte, debido a la polaridad de los flavonoides se utilizó el CO₂ como fluido principal con una polaridad modulada por un co-solvente de extracción. Considerando las restricciones de uso de algunos solventes para aplicaciones posteriores, así como la eficiencia de los co-solventes para extracción de flavonoides, se eligió como co-solvente el etanol/agua, 70/30 (v/v). Con el fin de minimizar el consumo de solvente en comparación a la extracción convencional, se manejó una proporción de co-solvente del 5 al 15 % del flujo de CO₂. Finalmente, se aplicó un diseño de experimentos basado en el modelo de Box-Behnken con tres componentes centrales, se determinó el número mínimo de pruebas en equipo de 15 (Tabla 10).

Tabla 10. Diseño experimental basado en el modelo de Box-Behnken con tres puntos centrales generado de manera aleatoria (JMP5) para evaluar el efecto de tres variables a tres niveles: porcentaje de co-solvente (EtOH 70%), temperatura (T°C), y presión (P), en los rendimientos y calidad de obtención de flavonoides a partir del *guishe*.

Exp	Tiempo (min)	Flujo CO ₂ (g/min)	% Etanol/ flujo CO ₂	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Patrón
1	60	40	15	70	250	++0
2	60	40	15	55	350	+0+
3	60	40	10	55	250	000
4	60	40	15	40	250	+0
5	60	40	5	70	250	-+0
6	60	40	10	70	350	0++
7	60	40	10	40	350	0-+
8	60	40	10	55	250	000
9	60	40	10	40	150	0--
10	60	40	10	70	150	0+-
11	60	40	10	55	250	000
12	60	40	5	55	150	-0-
13	60	40	15	55	150	+0-
14	60	40	5	40	250	--0
15	60	40	5	55	350	-0+

La extracción supercrítica se procesó en el sistema de extracción por fluidos supercríticos Waters® (Thar, México) constituido de un regulador de presión, un regulador de temperatura, una bomba de CO₂ y una bomba de co-solvente. Se uso una celda de extracción de 1 L y una celda de separación de 200 mL. El control de las condiciones de trabajo se lleva a cabo con el programa Thar Instruments Process Suite (Fig. 19).

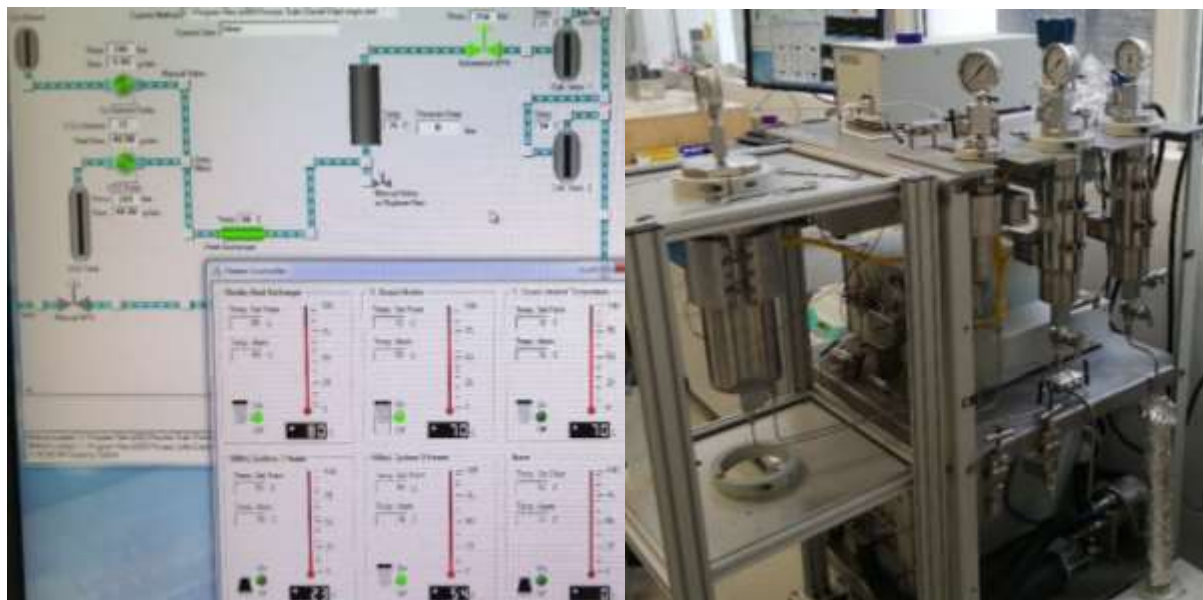


Figura 19. Sistema de extracción supercrítica con equipo Waters® operado con el programa Thar Instruments Process Suite.

Los 50 g de *guishe* se cargaron en la celda de extracción. El flujo de CO₂ se mantuvo a 40 g/min por un tiempo de 60 min para mantener la relación heurística de 50 g CO₂/ g de biomasa. De manera a recuperar todo el extracto, se manejó un periodo de secado sin co-solvente de 20 min manteniendo constante el flujo de CO₂ y condiciones de presión y temperatura determinadas por el experimento.

6.3.4.1.1.2 Validación experimental

Con un enfoque en la obtención de antocianinas se reprodujeron experimentalmente las condiciones óptimas de extracción determinadas a 250 Pa, 60°C, 15% de co-solvente. Cuatro replicas de extracción se llevaron a cabo a partir de 50 g de *guishe* hidrolizado.

Para evaluar la especificidad de la extracción y purificación por fluidos supercríticos, se usaron las siguientes ecuaciones de rendimiento específico (ecuación 4) (Fleck *et al.*, 1998), factor de enriquecimiento (ecuación 5) (Pieck *et al.*, 2015), y de selectividad (ecuación 6) (Sato *et al.*, 1998):

$$\text{Rendimiento específico (\%)} = \frac{Q_m \times x_s}{F \times x_s^A} \quad (4)$$

Q_m : Flujo de masa de la fracción enriquecida con los compuestos (kg/h)

x_s : Cantidad de los compuestos en la fracción enriquecida (g)

F : Cantidad de biomasa (k/h)

x_s^A : Cantidad de los compuestos en la biomasa (g)

$$\text{Factor de enriquecimiento} = \frac{x_s}{x_s^A} \quad (5)$$

x_s : Cantidad de los compuestos en la fracción enriquecida (g)

x_s^A : Cantidad de los compuestos en la biomasa (g)

$$\text{Selectividad} = \frac{Y_{\text{compuesto a}}/X_{\text{compuesto a}}}{Y_{\text{compuesto b}}/X_{\text{compuesto b}}} \quad (6)$$

Y : Cantidad de los compuestos en la fracción enriquecida (g)

X : Cantidad de los compuestos en la biomasa (g)

6.3.5 Variables de respuesta

6.3.5.1 Rendimientos

Los diferentes extractos obtenidos para el estudio del método de secado, la hidrólisis enzimática y el método de extracción con maceración, asistida por ultrasonido y por fluidos supercríticos fueron repartidos con un volumen de 30 mL en tubos cónicos de 50 mL previamente tarado. Se concentraron durante 4 h bajo un flujo saturado en nitrógeno para evaporar el etanol. Posteriormente, los extractos se liofilizaron por 48 h a la oscuridad para evaporar la fracción acuosa remanente. El peso final de los tubos al terminar la evaporación completa del solvente residual permitió establecer los rendimientos de extracción para cada experimento.

6.3.5.2 Contenido total de fenoles

El contenido de compuestos fenólicos se estimó mediante el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Los extractos se solubilizaron en agua destilada a 10 mg/mL y se realizaron diluciones con la finalidad de ajustar una absorbancia final de 0.5 a 1.0. Adicionalmente, se preparó la curva de calibración con el ácido gálico (GA) (Sigma-Aldrich) con concentraciones de 0 a 500 mg/l de acuerdo con el contenido establecido de

fenoles en *Agave spp.* (Ahumada-Santo *et al.*, 2013). 20 µl de las soluciones a dosificar, de las soluciones de curva de calibración y los controles se depositaron en microplacas 96 posos. Se adicionaron 10 µl del reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico) (Sigma-Aldrich), 40 µl de Na₂CO₃ a 200 g/L y 130 µl de agua destilada. La reacción se incubó durante 30 min a 40°C y posteriormente se colocó la microplaca en hielo para detener la reacción. Se leyeron las densidades ópticas (DO) a 735 nm debido a que la absorción máxima del reactivo se encuentra entre 725 y 750 nm. Se determinó el contenido en polifenoles totales (TPC) de los extractos por regresión lineal ($y = 0.0057x + 0.0023$, $R^2 = 0.999$) y se expresó en µg equivalente ácido gálico (GAE) por gramos de materia seca o fresca tomando en cuenta los rendimientos de extracción y la humedad de la muestra.

6.3.5.3 Contenido total de flavonoides

El contenido en flavonoides (TFC) en los extractos de *guishe* se evaluó por el método de cloruro de aluminio (AlCl₃) descrito por Lauranson-Broyer y Lebreton (Lauranson-Broyer y Lebreton, 1993) con adaptaciones menores. Se preparó la curva estándar con la quercetina (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0 a 1400 µg/mL con rango de 100 µg. Se llevó a cabo la reacción colorimétrica en microplacas, depositando 20 µl de los extractos, las soluciones de la curva de calibración y el blanco (EtOH 70%). Se adicionó 7.5 µl de NaNO₂ al 5% (Analytika), 30 µl de AlCl₃ al 2.5% (Jalmek), 50 µl de NaOH 1 M (Fermont) y 50 µl de agua destilada. Se homogeneizó después de cada adición de reactivos y se incubó 5 min a temperatura ambiente entre cada paso. Después de 5 min de incubación se midieron las DO a 425 nm. El TFC se estimó con el análisis de regresión lineal con la curva de calibración ($y = 0.0009x + 0.0451$, $R^2 = 0.992$), y se reportó en mg equivalente a quercetina (QE) por gramos de materia seca o fresca considerando el rendimiento de extracción y porcentaje de humedad de la biomasa.

6.3.5.4 Perfil específico en flavonoides

La identificación de los flavonoides en los extractos por HPLC-PAD se realizó en el sistema Agilent Technologies equipado de toma de muestra automático (1260 Infinity) y una bomba de inyección binaria de alta presión (1260 Infinity), y un controlador de temperatura de la columna (1290 Infinity). Los extractos secos se solubilizaron en metanol/agua (50/50, v/v) a una concentración stock de 20 g/L y se filtraron a 0.22 µm (Whatman Uniflow Syringe

Filters). Se inyectaron en el sistema HPLC a una concentración de 2 a 10 ppm con un volumen de inyección de 5 μ L. La columna C18 (150 mm x 2.1 mm, tamaño de partículas de 2.6 μ m, Kinetex, Phenomex) se mantuvo a 30°C. Se manejó un gradiente de acetonitrilo en agua acidificada (0.2% ácido fórmico) del 3 al 80%, con un flujo de 0.2 mL/min por 60 min. Al salir de la columna, se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm por el detector PDA. Los espectros se obtuvieron y analizaron con el programa ChemStation (Agilent, versión B.04.03).

6.3.5.5 Actividad antioxidante

La capacidad de captación de radicales libres se evaluó por medio de la prueba del DPPH (Apartado 6.2.2) como un indicador de la conservación del potencial bioactivo y entonces de la integridad reactiva de los flavonoides en los extractos obtenidos en los diferentes experimentos.

6.3.6 Análisis de datos

Los diferentes resultados se reportaron con desviación estándar al promedio por replicas técnicas. Para comparar los tratamientos, se llevaron a cabo análisis estadísticos usando el software R (versiones 3.6.3 a 4.1.1). Se evaluó primero la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilcoxon y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett. Cuando la normalidad se confirmó se realizó un ANOVA seguido por una prueba post-hoc de Tukey HSD. En caso de que los datos no sean normales se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis. Se tomó como rango de error aceptado $\alpha=0.05$. Los resultados se representan con la media, desviación estándar y significatividad de las pruebas estadísticas en forma de tabla o gráficos trabajados con Excel (versión 16.0).

Los diseños de experimentos se obtuvieron con el programa JMP versión 5 (SAS Institute Inc, Cary, N.C.). El efecto de los parámetros probados se evaluó para cada variable de respuesta independientemente por modelización al modelo de DOE usado (Taguchi o Box-Behnken) y se evaluó el efecto combinado de los parámetros por superficie de respuesta de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas. Se graficaron los resultados por medio de Statistica (versión 8). Adicionalmente, se complementó el estudio con análisis de componentes principales (PCA) y de variación con factores múltiples (MANOVA) usando R (versión 4.1.1). Se usó un rango de error aceptado $\alpha=0.05$.

6.4 Elaboración de las fichas técnicas del producto final

Considerando los flavonoides identificados en el extracto obtenido del *guishe* de *A. lechuguilla* por fluidos supercríticos, la predicción de las propiedades fisicoquímicas se obtuvieron *in silico* con ChemDraw Profesional (versión 15.0) y las características de adsorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET por sus siglas en inglés) se predijeron a través de la plataforma en línea SwissADME de SwissDrugDesign (Daina *et al.*, 2017).

7 RESULTADOS

7.1 Identificación de flavonoides

7.1.1 Transcriptómica

7.1.1.1 Extracción de ARN

De la extracción de ARN total de *guishe* y de hoja se obtuvo una concentración promedio de 0.778 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con una relación de absorbancia $A_{260/280}$ de 1.42 para el *guishe* y de 1.141 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con una $A_{260/280}$ de 1.63 para la hoja. Posteriormente se realizaron *pools* de ARN, que presentaron los mismos promedios de concentración y calidad que los replicas separadas. Por ende, con la última precipitación, los *pools* enviados para la elaboración de la librerías y secuenciación cumplieron los requisitos para asegurar la confiabilidad de los datos generados (Tabla 11).

Tabla 11. Cantidad e integridad de los *pools* de ARN total del *guishe* y de las hojas de *A. lechuguilla*.

Pools G: <i>guishe</i> H: hoja	Nanodrop 2000				Qubit		Tape Station
	Conc. (ng/ μL)	Cantidad (ng)	$A_{260/280}$	$A_{260/280}$	Conc. (ng/ μL)	Cantidad (ng)	RIN
G17P1	102.5	9840	1.5	0.91	84.60	8122.00	5.2
G17P2	76.24	7319.04	1.51	0.88	83.34	8000.20	4.9
H17P1	79.59	7640.64	1.86	1.25	118.36	11362.15	7.5
H17P2	82.91	7959.36	1.83	1.22	127.86	12274.46	7.5

7.1.1.2 Elaboración de librerías y secuenciación

De la primera secuenciación de las cuatro librerías se generaron 359,547,387 lecturas con un total de 108.5 Mbp secuenciadas con una calidad promedio de 37.25 (Anexo A). Considerando la baja calidad de los primeros ensambles obtenidos se tuvo que secuenciar con mayor cobertura para generar más datos y mejorar el ensamble. Con la segunda secuenciación se complementó el número de lecturas a 561,107,103 con el 94.54 % de las lecturas con un valor de phred >30 generando un total de 169.0 Mbp.

7.1.1.3 Ensamble *de novo*

El ensamble *de novo* que presentó estadísticas de mayor calidad se obtuvo con un tamaño de *k-mers* máximo permitido por el programa Trinity que es de 31 pb (Tabla 12). Por ende, el ensamble mostró un total de 524.9 Mbp ensambladas con un número total de 991,511

transcritos. La predicción de genes, tomando en cuenta solo las isoformas más largas, resultó en un transcriptoma de 581,094 genes con un total de 255.7 Mpb.

Tabla 12. Estadísticos del ensamble *de novo* del *Agave lechuguilla* obtenido con Trinity.

Parametros	Transcritos	Genes
Contig N10	2186	1927
Contig N20	1544	1225
Contig N30	1152	833
Contig N40	867	606
Contig N50	658	468
Media de tamaño de contigs	345	303
Promedio de tamaño	529.43	440.14
Bases ensambladas	524,938,013	255,762,186

7.1.1.4 Anotación funcional

7.1.1.4.1 Blast

De la búsqueda de homologías de secuencias de ácidos nucleicos contra la base de datos de Uniprot, se anotó el 81.3% del ensamble y se encontraron homologías para el 52.1% de los genes por comparación de secuencias proteicas. Con la filtración contra las bases de datos Viridiplantae y Embryophyta, se descartaron el 53.2% de los transcritos anotados, y se identificaron 464,027 *contigs* como específicos para plantas. Finalmente, de los 196,549 genes que quedaron, 859 presentaron homologías con la base de datos específica de biosíntesis de los flavonoides lo que representa el 0.8% del transcriptoma *de novo* de la lechuguilla. De estos genes relacionados con flavonoides, 767 se anotaron con PFAM de los cuales 611 estuvieron referenciados en la base de datos de KEGG incluyendo las 43 anotaciones de HMMER como dominios proteicos transmembranales. Adicionalmente, ninguna anotación se reportó como péptidos señales con SignalP.

Para elucidar la ruta metabólica de los flavonoides del *A. lechuguilla*, se tomaron en cuenta todas las homologías de secuencias con las diferentes bases de datos usadas. Con esto se identificaron las enzimas de los primeros pasos de la biosíntesis con las dos rutas metabólicas de origen de los flavonoides: la ruta del shikímato derivando de la vía de los fenilpropanoides, y la ruta del malonil-CoA (Tabla 13). También se identificaron las enzimas específicas al metabolismo secundario como las enzimas de modificaciones: oxigenasas, metilasas, acetilasas y glicosiltransferasas (Tabla 14). Finalmente, se encontraron varios factores de regulación positiva de la síntesis de los flavonoides (Tabla 15).

Tabla 13. Enzimas de la biosíntesis de los flavonoides (abreviatura y nombre común) identificadas en el transcriptoma *de novo* del *A. lechuguilla* por análisis de BLAST contra UniProtKB, la clasificación de las enzimas (EC) y las ontologías de genes asociadas (GO IDs).

	Enzimas	UniProtKB	EC	GO IDs
PAL	Fenilalanina amonía liasa	PAL1_ARATH	EC:4.3.1.24	GO:0045548
		PAL1_DAUCA		
		PAL1_PRUAV		
		PAL1_PHAVU		
		PAL3_PETCR		
		PALY_BROFI		
		PALY_VITVI		
		PALY_POPTR		
		PALY_PERA		
C4H	Cinamoil-4-hidroxilasa	YAY ¹ _SCHPO	EC:1.14.14.91	GO:0016705
				GO:0016207
F6H	Bifuncional cumaroil CoA y feruloil CoA orto-hidroxilasa	F6H21_IPOBA	EC:1.14.11.62	GO:0009805
4CL	4-cumarato CoA ligasa	4CL1_ORYSJ	EC:6.2.1.12	GO:0016207
CCR	Cinamoil-CoA reductasa	CCR2_ARATH	EC:1.2.1.44	GO:0016621
HCT	Shikímato <i>O</i> -hidroxi cinamoil transferasa	HST_ARATH	EC:2.3.1.133	GO:0047172
C3H	5- <i>O</i> -(4-cumaroil)-D-quinato 3'-monoxigenasa	C98A3_ARATH	EC:1.14.14.96	GO:0016709
				GO:0046409
CHS	Chalcona sintasa / Naringenina-chalcona sintasa	CHS6_SOYBN	EC:2.3.1.74	GO:0016210
		CHSY_ARATH		
		CHSY_PUEML		
		CHSY_CHRAE		
		CHS ¹ _CAMSI		
		CHS1_SINAL		
PKS	Policétidos sintasa/ Aloesona sintasa	PKS5_ALOAR	EC:3.40.47.10	GO:0016747
		PKS3_ALOAR	EC:2.3.1.74	GO:0042803
		CFI3_ARATH		
CFI	Chalcona-Flavanona isomerasa	CFI_ALLCE CFI_PYRGO CFI_CAMSI	EC:5.5.1.6	GO:0045430
F3'H	Flavonoide 3'-hidrolisasa	F3PH_ARATH	EC:1.14.14.82	GO:0016711
	Flavonoide 3'-monoxigenasa			GO:0016020
F3'5'H	Flavonoide 3,5'-hidrolisasa	C75B3_ORYSJ C75B4_ORYSJ	EC:1.14.13.21	GO:0044550
F3H	Flavanona-3-dioxigenasa / Naringenina-3-dioxigenasa / Naringenina-2-oxoglutarato-3-dioxigenasa	FL3H ¹ _ORYSJ FL3H_PETHY FL3H_MALDO FL3H_PETCR	EC:1.14.11.9	GO:0009813
				GO:0045486
				GO:0020037
				GO:0016709
FLS	Flavonol sintasa	FLS_MATIN	EC:1.14.20.6	GO:0045431
	Flavanona-3-hidroxilasa	FLS2_ARATH	EC:1.14.11.23	
FNS	Flavona sintasa	DMR6_ARATH	EC:1.14.20.5	GO:0033759
				GO:0042742
				GO:0009617
				GO:0002229
				GO:0009620

Nota: ¹ Indica que se encontró varias IDs UniProtKB de la misma enzima con números distintos.

Tabla 14. Enzimas de modificación de los flavonoides (abreviatura y nombre común) identificadas en el transcriptoma *de novo* del *A. lechuguilla* por análisis de BLAST contra UniProtKB, la clasificación de las enzimas (EC) y las ontologías de genes asociadas (GO IDs).

	Enzimas	UniProtKB	EC	GO IDs
DFR	Dihidroflavonol 4-reductasa/ dihidrokaempferol 4-redactasa/ Flavanona 4-reductasa	DFRA_SYNY3 DFRA_MALDO DFRA_MAIZE	EC:1.1.1.219	GO:0045552 GO:0047890 GO:0016616
LDOX	Leucoantocianidina dioxigenasa	LDOX_MALDO	EC:1.14.20.4	GO:0010023 GO:0050589
ANS	Antocianina sintasa	DIOX4_ARATH DIOX5_ARATH DIOX6_ARATH DTX41_ARATH DTX35_ARATH ANRCS_VITVI	EC:1.14.11.19 EC:1.14.20.4	GO:0051213 GO:0046872 GO:0050589 GO:0046872 GO:2000022 GO:0016616
ANR	Antocianidinas reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol)	ANRPN_VITVI ANRCH_VITVI ANR_GINBI	EC:1.3.1.112 EC:1.3.1.77	GO:0033729 GO:0016854 GO:0050661
OMT	Flavonoide <i>O</i> -metiltransferasa específica del ciclo aromático B	FOMT2_WHEAT	EC:2.1.1.169	GO:0000871 GO:0046983
Q8OMT	8-hidroquercetina-8- <i>O</i> - metiltransferasa	Q8OMT_MENPI	EC:2.1.1.88	GO:0030761
3GT	Dafnetina-3- <i>O</i> -glucosiltransferasa Flavonol-3- <i>O</i> -glucosiltransferasa Miricetina-3- <i>O</i> -glucosiltransferasa Quercetina-3- <i>O</i> -glucosiltransferasa	U71 ¹ , U73 ¹ , U74 ¹ , U83A1, U85 ¹ , U86 ¹ , U89A2, U90A1, U92A1_ARATH	EC:2.4.1.91	GO:0102360 GO:0047893 GO:0102425 GO:0080043
	Flavonoide-3- <i>O</i> -glucosiltransferasa	UFOG6_FRAAN	EC:2.4.1.91	
	Antocianidina-3- <i>O</i> - glucosiltransferasa	U78D ¹ _ARATH	EC:2.4.1.115	GO:0047213
ANGT	Antocianina <i>O</i> -glicosiltransferasa	ANGT_GENTR	EC:2.4.1.258	GO:0033837
	Bifuncional <i>O</i> -glicosil y <i>N</i> -glicosil transferasa	U72B1_ARATH	EC:2.4.1.-	GO:0080043 GO:0080044
UGT	Xiloglucano glicosiltransferasa	GT2_ORYSJ CSLCC_ARATH XXT1_ARATH	EC:2.4.1.99	GO:0016757
	<i>O</i> - β -D-glucosiltransferasa	SCGT_TOBAC	EC:2.4.1.128	GO:0050275
2GT	Chalcona/ Dihidrochalcona-2'- <i>O</i> - glucosiltransferasa Cianidina-3- <i>O</i> -glucosil-2- <i>O</i> - glucosiltransferasa	U88 ¹ _ARATH	EC:2.4.1.-	GO:0016758 GO/0102160
7GT	Quercetina-7- <i>O</i> -glucosiltransferasa	U80B1_ARATH	EC:2.4.1.173	GO:0080044
URT	Flavonol-3- <i>O</i> -glucósido L- ramnosiltransferasa	U91 ¹ _ARATH	EC:2.4.1.159	GO:0047230 GO:003338
I7GT	Isoflavone 7- <i>O</i> -glucosiltransferasa	UGT1_PUEML UGT13_PUEML	EC:2.4.1.170	GO:0050004
ICGT	Isoflavone C-glucosiltransferasa	UGT43_PUEML UGT6_PUEML	EC:2.4.1.-	GO:0016758
HID	2-hidroxi-flavanona deshidratasa	HIDH_SOYBN HIDM_GLYEC	EC:4.2.1.105	GO:0033987
VESTR	Vestitona reductasa	VEST_MEDSA	EC:1.1.1.348	GO:0016491 GO:0006952

GH	Isoflavonoide-7-O- β -apiosil-glucósido β -glicosidasa	BAGBG_DALNI	EC:3.2.1.161	GO:0033956
SOT	Flavonoide sulfotransferasa	SOT ¹ _ARATH	EC:2.8.2.	GO:1990135

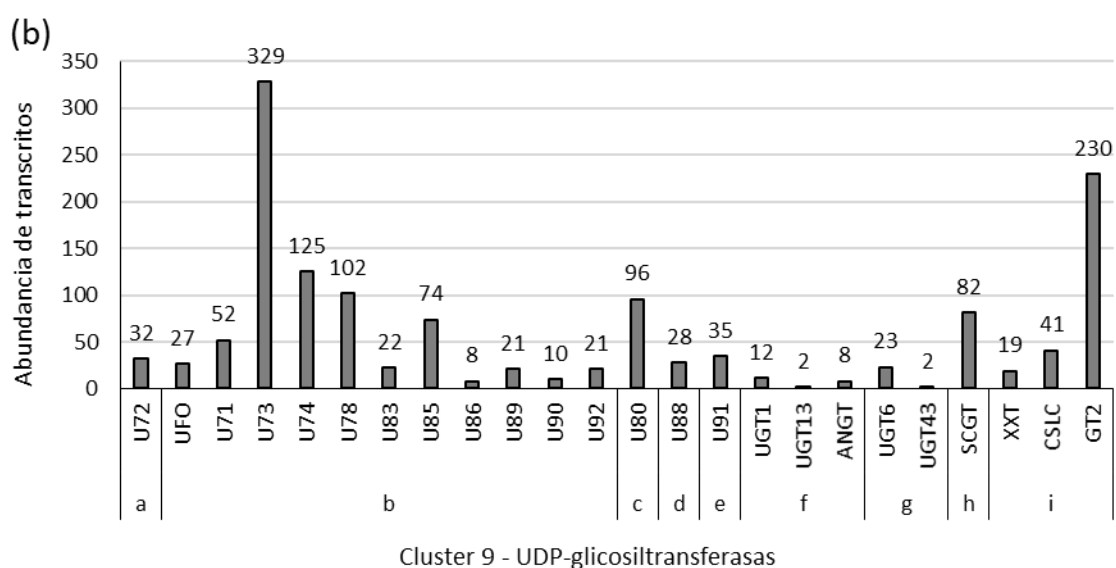
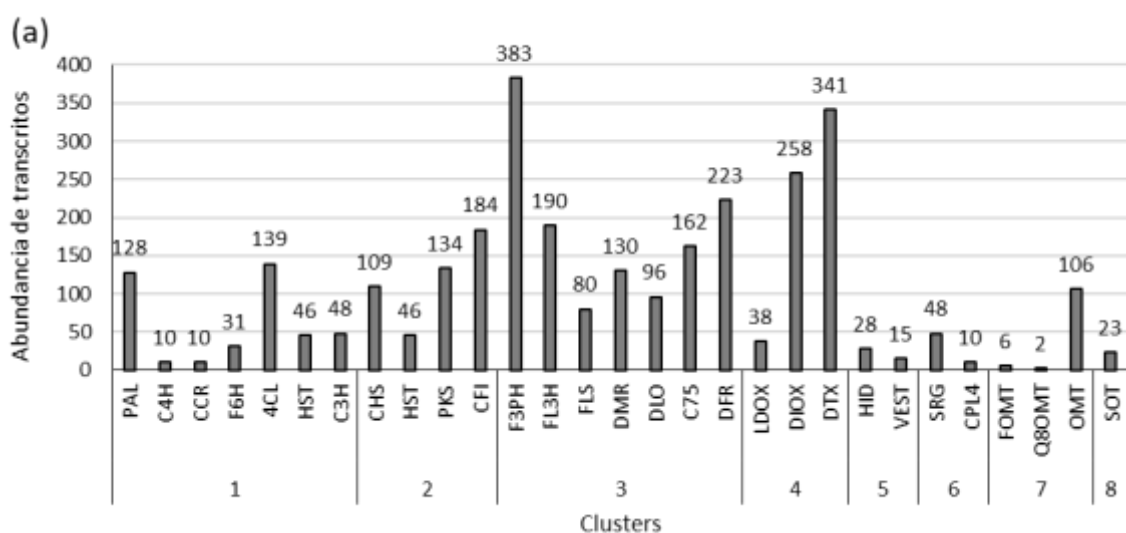
Nota: ¹ Indica que se encontró varias IDs UniProtKB de la misma enzima con números distintos.

Tabla 15. Factores de regulación de la biosíntesis de los flavonoides (abreviatura común y función) identificados en el transcriptoma *de novo* del *A. lechuguilla* por análisis de BLAST contra UniProtKB y las ontologías de genes asociadas (GO IDs).

	Factores de transcripción	UniProtKB	GO IDs	
NAC082	Regulación positiva de la transcripción	NAC82_ARATH	GO:0003700	
NAC078	Regulación positiva de la transcripción, Regulación del proceso de biosíntesis de los flavonoides	NAC78_ARATH	GO:0009962	GO:0003700
			GO:0045893	GO:0009962
			GO:0009644	GO:0006351
			GO:0006355	GO:0044212
BHLHM	Proteína básica truncada de hélice-bucle-hélice A Actividad de dimerización de proteínas Biosíntesis de flavonoides	BHLHW_PEA	GO:0009813	GO:0046983
			GO:0003700	GO:0051555
			GO:1900386	GO:0000981
MYB12	Regulación positiva del proceso de biosíntesis del flavonol Regulación positiva de la transcripción, provocada por el ADN Regulación de la transcripción por la ARN polimerasa II	MYB12_ARATH	GO:0043565	GO:0001135
			GO:0030154	GO:0009813
			GO:1900386	GO:0045893
			GO:0006357	GO:0009733
			GO:0009723	GO:0009416
MYB3	Factor de transcripción de antocianinas	MYB3_ARATH	GO:0009651	GO:0010224
			GO:0006351	
			GO:0031540	
MYC2	Regulación positiva de la transcripción Regulación positiva del proceso biosintético de los flavonoides Regulación de la transcripción desde el promotor de la ARN polimerasa II en respuesta al estrés oxidativo	MYC2_ARATH	GO:0005634	GO:0009963
			GO:0003700	GO:0046983
			GO:0043565	GO:0009738
			GO:0045893	GO:0051289
			GO:2000068	GO:0051090
			GO:0043619	GO:0009737
			GO:0009269	GO:0009753
MYC4	Regulación positiva del proceso biosintético de los flavonoides Regulación positiva de la transcripción, templada por el ADN Regulación de la actividad del factor de transcripción de unión al ADN	MYC4_ARATH	GO:0009611	GO:0006952
			GO:0006351	GO:2000652
			GO:0009718	GO:0006952
			GO:0045893	GO:2000652
MAX	Regulación positiva del proceso biosintético de los flavonoides Citocromo P450 711A1	MAX1_ARATH	GO:0006355	GO:0010374
			GO:0043425	GO:0003677
			GO:0003700	GO:0003677
			GO:0046983	
			GO:0009926	GO:0016117
			GO:0016705	GO:0009963

Otras anotaciones asociadas a la biosíntesis de los flavonoides, son los factores de señalización para el transporte de los flavonoides hacia la pared celular (GO:0071555) o la acumulación en la vacuola (GO:19033415).

Por otro lado, se clasificaron los genes asociados a la biosíntesis de los flavonoides según la actividad enzimática catalizada, distinguiendo 11 *clusters* biosintéticos (Fig. 20). Los *clusters* contienen las enzimas 1) sintetizando el precursor de las chalconas, 2) tipo chalcona sintasas y chalcona isomerasas, 3) de diversificación de la ruta metabólica de los flavonoides produciendo las diferentes clases flavanonas, flavanoles, flavonas, flavonoles y los precursores de antocianinas, 4) de síntesis de las antocianinas, 5) de producción de isoflavonas, 6) con actividad de oxigenación, 7) de metilación, 8) de sulfatación de los flavonoides. El *cluster* 9 agrupa los genes que codifican a las enzimas con actividad UDP-glicosiltransferasa con una subclasificación según la estructura del derivado producido. Finalmente, los factores de regulación de la transcripción de los genes del metabolismo de los flavonoides se unieron en el *cluster* 10, por su parte el *cluster* 11 se compone de los genes involucrados en el transporte y acumulación de los flavonoides en la vacuola.



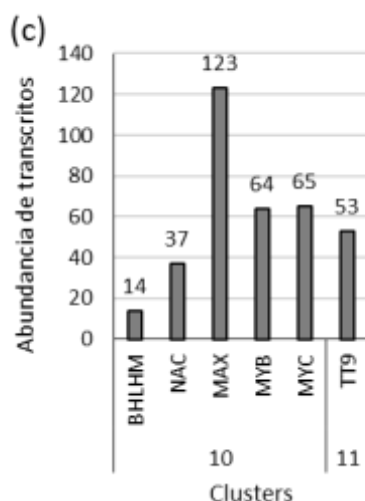


Figura 20. Número de genes codificando para enzimas de biosíntesis de los flavonoides identificados en el transcriptoma *de novo* de *A. lechuguilla*, clasificados en a) 8 *clusters* biosintéticos, b) subdivisiones del *cluster* 9, y c) *clusters* de factores de transcripción (10) y de transporte de los flavonoides (11).

7.1.1.5 Expresión diferencial

Primero se comprobó que las réplicas de las librerías de hoja y de *guishe* no presentan perfiles de abundancia de transcritos distintos, lo se confirmó con el análisis de componente principal (PCA) que mostró la ausencia de diferencia significativa entre las réplicas de *pools* de ARN secuenciados (Fig. 21).

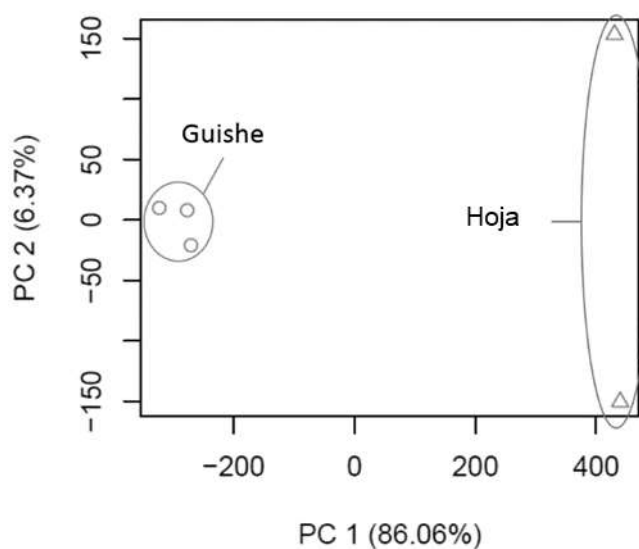


Figura 21. Análisis de componentes principales de los perfiles de expresión de los genes en las librerías de *guishe* y hojas completas.

De los 22,567 genes diferencialmente expresados entre la hoja y el *guishe*, 10,598 se encuentran sobre expresados en la hoja contra 11,969 en el *guishe* con un FDR < 0.02 y un p-value < 0.01.

7.1.1.6 Enriquecimiento de ontología de genes

De los 4,429 IDs obtenidos del enriquecimiento de ontologías de los genes sobre expresados (p-value < 0.05) entre hoja y *guishe*, resultó que la mayoría de las ontologías (2881) se clasificaron en procesos biológicos. Estas ontologías se reparten entre hoja completa y *guishe* tal como se representa en la Figura 22.

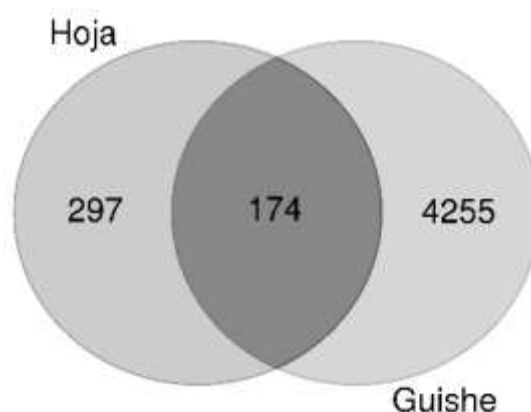


Figura 22. Diagrama de Venn de las ontologías de genes sobre regulados en la hoja y el *guishe*.

Adicionalmente, la visualización en REVIGO permitió identificar que la mitad de los GOs están involucrados en procesos biológicos tales como la síntesis de metabolitos secundarios incluyendo la síntesis de cianidinas, la defensa contra bacterias, la respuesta al estrés oxidativo, la detoxificación de químicos, la quimiotaxis y las interacciones interespecies (Fig. 23).

7.1.1.7 Perfiles de expresión de los genes de biosíntesis de los flavonoides

Los 82 genes sobre expresados en el *guishe* en comparación a la hoja, e identificados como parte de la biosíntesis de los flavonoides, se posicionaron principalmente en las etapas prematuras de la síntesis como las fenilalanina liasas (PAL, K13064 y PTAL, K13064), chalcona sintasa (CHS, K00660), la hidroxicinamoil-transferasa (HCT, K13065). Al contrario, las glicosiltransferasas (GT1, K12938 y 3GT, K12939), por ejemplo, se mapearon al final de la ruta metabólica sugiriendo la producción y acumulación de compuestos tales como derivados glicosilados de flavonoles como la isorhamnetina, quercetina y kaempferol, y de

antocianinas de la cianidinas y delfinidinas. Con base en estos resultados de expresión diferencial, se elaboró la ruta metabólica de síntesis de los flavonoides en el *guishe* (Fig. 24).



Figura 23. Ontologías de genes involucrados los procesos biológicos más relevantes identificados en los genes sobre expresados en *guishe* según el p-value obtenido por análisis de expresión diferencial.

7.1.2 Identificación de los flavonoides por bioquímica analítica

La identificación de los flavonoides en los extractos etanólicos y metanólicos se obtuvo con base en los espectros de masas obtenidos de las diferentes corridas, tomando en cuenta los tiempos de retención específicos para cada columna y gradiente procesados. Se identificaron 11 flavonoides en forma aglicona por orden de retención: 2 flavanoles (catequina y epigallocatequina) < 2 antocianinas (delfinidina y cianidina) < 2 flavanonas (naringenina y hesperidina) < 3 flavonoles (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) < 2 flavonas (apigenina y miricetina). De estos compuestos se identificaron 37 derivados glicosídicos. En las formas mono-, di- y tri- glicosiladas se observó una mayor ocurrencia de ramnosa, glucosa y xilosa en las secuencias. Algunos compuestos se reportaron con grupos metilos adicionales como las cianidinas glicosiladas I y II, y la hesperidina. Se encontraron dos compuestos en formas dihidroxiladas, la quercetina y la miricetina. Por último, se describieron tri- y tetra- meros de catequinas como proantocianidinas (Tabla 16).

Tabla 16. Flavonoides identificados tentativamente por HPLC-ESI-MS/MS en extractos etanólicos y metanólicos de *guishe* según la masa experimental (m/z) obtenida en polaridad negativa ($[M+H]^+$) y negativa ($[M-H]^-$), y los iones moleculares por orden de abundancia (ESI-MS/MS).

Flavonoides ¹	$[M-H]^-$ (m/z)	$[M+H]^+$ (m/z)	ESI-MS/MS Fragmentos (m/z)	Fórmula	PubChem CID
Apigenina ^f	268.9	-	203.9	C15H10O5	5280443
Apigenina-7-O-glucósido ^{e,f,i}	431.1	433.2	268.9 ; 203.9	C21H20O10	44257792
Apigenin-7-O-rutinósido ^f	578.5	-	268.9 ; 269.0	C27H30O14	44257811
Catequina/ epicatequina ^e	288.9	-	577.2; 407.2	C15H14O6	9064
Epicatequina galate ^{a,e}	441.1	443.1	169.1; 125.1	C22H18O10	107905
Cianidina	287.1	-	-	C15H11O6	128861
Cianidina-3-O-glucósido ^a	478.4	-	287.1	C12H21O11	197081
Cianidina-3-O-rutinósido ^a	-	595.5	449.3	C27H31O15	441674
Cianidina-3,5-O-diglucósido ^h	609.2	611.0	449.3; 287.1	C27H31O16	44256718
Cianidina metil di glicósido I ^j	-	633.5	449.3; 615.5	C29H27O15	-
Cianidina metil glicósido II ^j	-	909.7	595.5	C43H41O22	-
Delfinidina	319.1	-	-	C15H11O7	128853
Delfinidina-3-O-glucósido ^a	465.4	-	319.0	C21H21O12	443650
Delfinidina metilglicósido ^j	-	925.4	611.0	C43H41O23	-
Gentiodelfina ^a	1113.3	-	319.0	C54H53O28	11979365
Procianidina ^{e,h}	577.2	-	287.1; 407.2; 451.1; 601.2	C30H26O12	122738 130559
Tetramero de procianidina ^h	1152.7	-	577.1	C60H50O24	16130899
Hesperidina	610.2	-	723.5; 724.5 ; 301.0	C28H34O15	10621

Hesperidina metilchalcona ^a	-	625.3	301.0 ; 300.9	C29H36O15	6436550
Isorhamnetina ¹	316.1	317.0	272.1 ; 273.2	C16H12O7	5281654
Isorhamnetina glucósido ^{a,i}	478.4	-	316.1	C22H22O12	5318645
Isorhamnetina glicósido ^d	579.4	-	316.1 ; 272.1 ; 221.1	-	-
Isorhamnetina-glucosil- pentósido ^{d,h}	609.2	611.0	478.3; 317.0 ; 146.1 ; 449.1	-	-
Isorhamnetina-3- <i>O</i> - rutinósido ^{a,d}	622.3	625.2	317.0 ; 146.1 ; 82.1	C28H32O16	5481663
Isorhamnetina-hexosil- hexosil-pentósido ^d	756.5	757.5	317.0 ; 162.8 ; 167.1 ; 146.1	-	-
Isorhamnetina-3- gentiotriósido ^a	801.6	804.5	316.1 ; 317.0	C34H42O22	44259361
Isorhamnetina triglicósido ^d	-	813.8	641.2; 317.0	-	-
Kaempferol	285.1	287.1	153.0; 107.0	C15H10O6	5280863
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido (Astragalina) ^a	-	449.3	287.1	C21H20O11	5282102
Kaempferol-3- <i>O</i> -ramnósido (Afzelina) ^{c,e}	431.1	433.2	125.1; 153.0	C21H20O10	5316673
Kaempferol ramnósido-ácido málico ⁱ	547.2	-	132.9; 431.1	C25H24O14	-
Kaempferol-xilósido-ácido málico ⁱ	563.4	-	132.9; 285.1	C28H24O15	-
Afzelina <i>O</i> -galato ⁱ		585.3	287.0 287.0; 285.1	C28H24O14	44586971
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinósido ^d	593.4	595.5	190.9; 449.3 431.1	C27H30O15	5318767
Kaempferol-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> - cumaroil)-glucósido ^e	595.1	-	285.1; 119.1	-	-
Kaempferol-3-ramnósido-7- xilósido-ramnósido ^a	-	711.4	287.0	C32H38O18	44258994
Kaempferol-3,7,4'- triglicósido ^a	772.5	774.1	287.0	C33H40O21	44258904
Miricetina ^{a,c}	317.0	319.0	-	C15H10O8	5281672
Dihidromiricetina ^c	-	323.2	153.0; 139.0	C15H12O8	161557
Miricetina-3- <i>O</i> -ramnósido (Miricetrina) ^e	463.1	465.1	317.0; 179.1	C21H20O12	5281673
Miricetrina <i>O</i> -galato ⁱ	615.5	617.3	317.0	C28H24O16	-
Miricetina-hexósido- pentósido ^e	625.2	-	463.1; 317.0; 146.1	C27H30O17	-
Naringenina	270.9	272.3	271.1	C15H12O5	932
Naringenina-7- <i>O</i> -rutinósido	579.5	-	270.9; 271.1	C27H32O14	442431
Quercetina	301.0	303.0	300.9; 179.1	C15H10O7	52800343
Dihidroquercetina (Taxifolina) ^c	302.9	305.9	303.0; 153.0; 139.0	C15H12O7	439533
Quercetina-3- <i>O</i> -xilósido ^{b,c}	433.2	435.1	300.9; 301.0; 303.0; 179.1; 146.1	C20H18O11	44259228
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido ^{b,c,f}	447.1	449.3	300.9; 301.0; 303.0; 146.1	C21H20O11	5280459
Quercetina-3- <i>O</i> -glicósido	463.1	465.1	300.9; 301.0;	C21H20O12	5280804

(glucósido o galactósido) ^{b,f}			177.0; 303.0; 179.1; 153.0 300.9; 301.0;		5281643
Quercetina-3-O-rutinósido (Rutina) ^{b,e}	609.2	611.0	465.1; 153.0; 463.1	C27H30O16	5280805
Quercetina-3-O-diramnósido ^b	595.1	-	300.9; 301.0; 447.1	C27H30O15	44259244
Quercetina-3-O-diglicósido ^b	595.1	-	300.9; 301.0; 463.1	C27H30O17	44259101
Quercetina-O-di-p-cumaroil- ramnopiranosido ^e	-	741.1	449.2; 303.0	C39H32O15	-

Nota: ^averificado por: bases de datos en línea ^a; (Dorta *et al.*, 2014) ^b; (Gao *et al.*, 2017) ^c; (García-Cayuela *et al.*, 2019) ^d; (Zhuang *et al.*, 2018) ^e; (Ana Plazonić *et al.*, 2009) ^f; (Aguirre-Hernández *et al.*, 2010) ^g; (Kucharska *et al.*, 2017) ^h; (Abu-Reidah *et al.*, 2015) ⁱ; (Kirby *et al.*, 2013) ^j.

7.1.3 Cuantificación de flavonoides

No hubo diferencia significativa en los rendimientos entre los solventes de extracción. En extractos etanólicos se observó una concentración de polifenoles de 10.89 ± 0.61 mg GAE/g PF y de flavonoides 6.06 ± 0.88 mg QE/g PF. En extractos metanólicos se obtuvo un TPC de 10.72 ± 0.79 mg GAE/g PF y un TFC 3.74 ± 1.07 mg QE/g PF.

Con base en las ecuaciones de las curvas estándar (Anexo B) se cuantificaron los flavonoides en los extractos alcohólicos (Fig. 25). Los compuestos encontrados debajo de los límites de detección de HPLC-UV se reportaron con una concentración nula. Sin embargo, el análisis de los espectros de masas confirmó su presencia en ambas fracciones. La isorhamnetina se presentó como el compuesto mayoritario en ambos extractos con una concentración promedio de 750.74 ± 33.87 µg/g PS en la fracción etanólica y 1251.96 ± 63.09 µg/g PS en la fracción metanólica. Seguido de la flavanona con una concentración de respectiva de 291.51 ± 15.01 µg/g PS y 214.10 ± 9.84 µg/g PS. De los compuestos minoritarios, se observó una abundancia diferencial de los flavonoides cuantificados según el solvente de extracción. Las concentraciones se encontraron en un rango de 1.76 µg/g PS (naringenina) a 24.23 µg/g PS (delfinidina) en etanol 70% y de 1.76 µg/g PS (naringenina) a 34.23 µg/g PS (hesperidina) en metanol 60%.

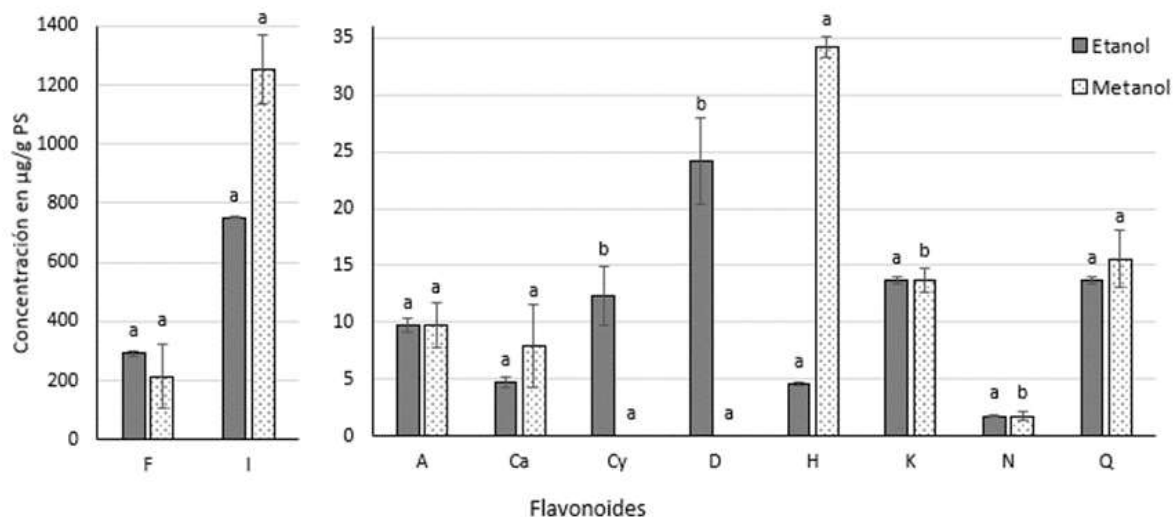


Figura 25. Concentración en los flavonoides cuantificados por HPLC en $\mu\text{g/g}$ PS en extractos etanólicos y metanólicos en orden. F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delfinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, N: naringenina, y Q: quercetina. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA; $n=3$, $p<0.05$).

7.1.4 Potencial bioactivo

7.1.4.1 Predicción *in silico*

El cribado de proteínas blanqueadas por los flavonoides encontrados en el *guishe* se presenta en el Anexo C.

Los flavonoides identificados en el *guishe* presentaron probabilidades de interacción con 232 proteínas de la base de datos de proteínas humanas. Se identificaron dos *writers*, tres *erasers*, tres factores de transcripción, ocho receptores nucleares, 21 receptores asociados a proteínas G (20 de la familia A, y uno de la familia del gusto), un antígeno, un receptor membranal (sin clasificación), cuatro transportadores activos primarios, 12 proteínas involucradas en el transporte electroquímico de las células (dos específicos al sistema nervioso, y tres de la apoptosis), siete proteínas secretadas, nueve proteínas citosólicas, cinco citocromos P450, cinco hidrolasas, dos fosfatasa, tres fosfodiesterasas, dos isomerasas, 13 liasas, 10 oxidoreductasas, 17 proteasas, 46 quinasas, tres transferasas, 47 enzimas (sin clasificación), y siete proteínas no clasificadas.

Los tres flavonoles agliconas, quercetina, kaempferol y miricetina presentan 91 proteínas blanco en común de los cuales 56 son exclusivos a flavonoles ya que se comparten 35 proteínas blanco entre flavonoles y flavanol. La catequina (flavanol), tiene probabilidad de

interacción con 49 proteínas distintas a las de proteínas blanco de los flavonoles con los cuales, el kaempferol y la quercetina comparten tres proteínas blanco, la topoisomerasa I del DNA (isomerasa) y la tanquirasa-1 (receptor asociado a proteína G de la familia del gusto). Seis proteínas presentaron potencial de interacción solo con la miricetina y la quercetina, la demetilasa específica a la lisina, la quinasa de cadena ligera de miosina (músculo liso), la topoisomerasa II del ADN, la subunidad γ -P110 de la α -P13-quinasa, el receptor a la insulina, la aldosa reductasa, y la ADN liasa. Otras cinco, solo por el kaempferol, la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3, la proteína G asociada al receptor quinasa 6, la ciclooxigenasa-2, el regulador de la conductividad transmembranal de fibrosis cística, y la α -amilasa A1. Asimismo, la miricetina presenta dos proteínas blanco exclusivas, la β -galactósido α -2,6-sialitransferasa, y la 1 butirilcolinesterasa. La catequina comparte el receptor A3 de adenosina con la miricetina y el receptor de estrógeno α con el kaempferol.

Por otro lado, la quercetina y la isorhamnetina (quercetina metilada) comparten 98 proteínas blanco y cada una tiene dos proteínas exclusivas, la quercetina, la topoisomerasa I del ADN y la tanquirasa-1, y la isorhamnetina el plasminógeno (proteasa) y la proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide inducida Mcl-1 (proteína citosólica).

Si varios flavonoides presentaron potencial de interacción con un tipo de proteína, su estructura determina la probabilidad de interacción, así como se representa en el caso de las fosfolipasas donde se distinguen los clusters de interacción según la subclase de flavonoide. Los flavonoles tuvieron mayor probabilidad de interactuar con la fosfolipasa A2 de grupo 1B, mientras que las flavanonas y flavanoles presentaron las probabilidades más altas de interacción con las fosfolipasas A2 del grupo IIA, V, y X. De las antocianinas, se observó una probabilidad intermedia, la cual no difiere según la familia de fosfolipasas (Fig. 26).

Por otro lado, se observó un potencial de interacción menor de los derivados glicosilados que las formas agliconas. Además, la posición del residuo glicosídico influyó más que el tipo de glicósido en el potencial de interacción con las proteínas de la base de datos PDB (human). De los mono-glicosilados, solo dos proteínas son comunes entre todos, 22 proteínas se comparten entre los flavonoles-3-O-glicósidos, 24 son exclusivos a las antocianinas, y 6 solo tienen probabilidad de interacción con la apigenina-7-O-glucósido. Las proteínas blanco de los di-glicosilados fueron las mismas que los monoglicosilados. Sin

embargo, tuvieron menor probabilidades de interacción. De igual manera, la probabilidad de interacción disminuye aún más con la agregación de un tercer grupo glicósido. En contraste, una metilación, un residuo p-cumaroil, un residuo galato, y una sulfatación, incrementaron las probabilidades de interacción y la diversidad de proteínas blanco de los flavonoides.

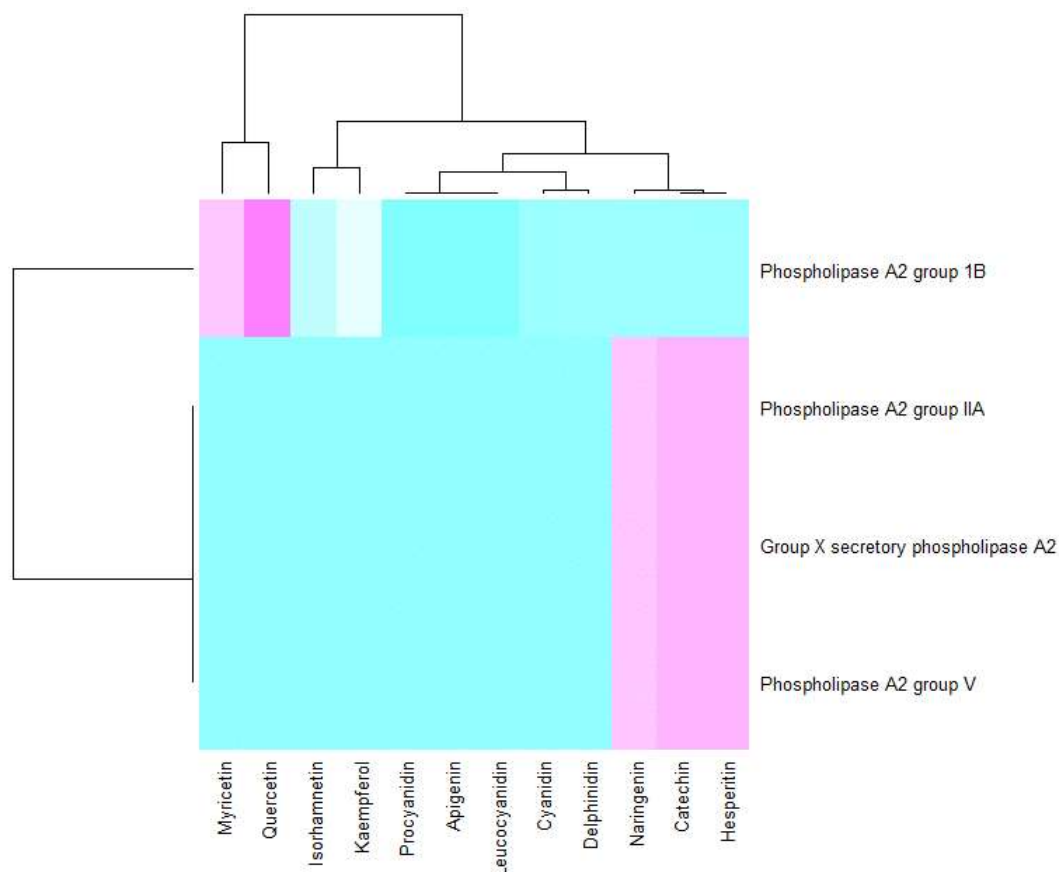


Figura 26. Mapa de color de las probabilidades de acoplamiento de los flavonoides agliconas del *guishe* de *A. lechuguilla* con las proteínas blanco de diferentes familias de fosfolipasas A2.

Por otra parte, se modeló el acoplamiento de los flavonoides con la proteína TNF-R1 (PDB: 2ZJC) (Fig. 27, 28, y 29) y la PLA2 (PDB:1OXR) (Fig. 30 y 31). De manera general, todos los flavonoides identificados en el *guishe* tuvieron interacciones polares y apolares con las dos proteínas. La estructura de los flavonoides influyó en particular en el potencial de formación de puentes de hidrógeno. Se observó que las formas agliconas de las diferentes subclases de flavonoides identificados en el *guishe* se acoplaron en los mismos sitios por complementariedad de superficie con el receptor (Fig. 27). Sin embargo, dependiendo de la posición de los grupos hidroxilos, de los doble enlaces, y de la presencia de grupo metilo, la formación de puente de hidrógeno con los amino ácidos del receptor TNF-R1 varió según la

subclase de flavonoide. Por otro lado, las interacciones de los flavonoides glicosilados se predijeron con amino acidos distintos a los identificados para las formas agliconas (Fig. 29)

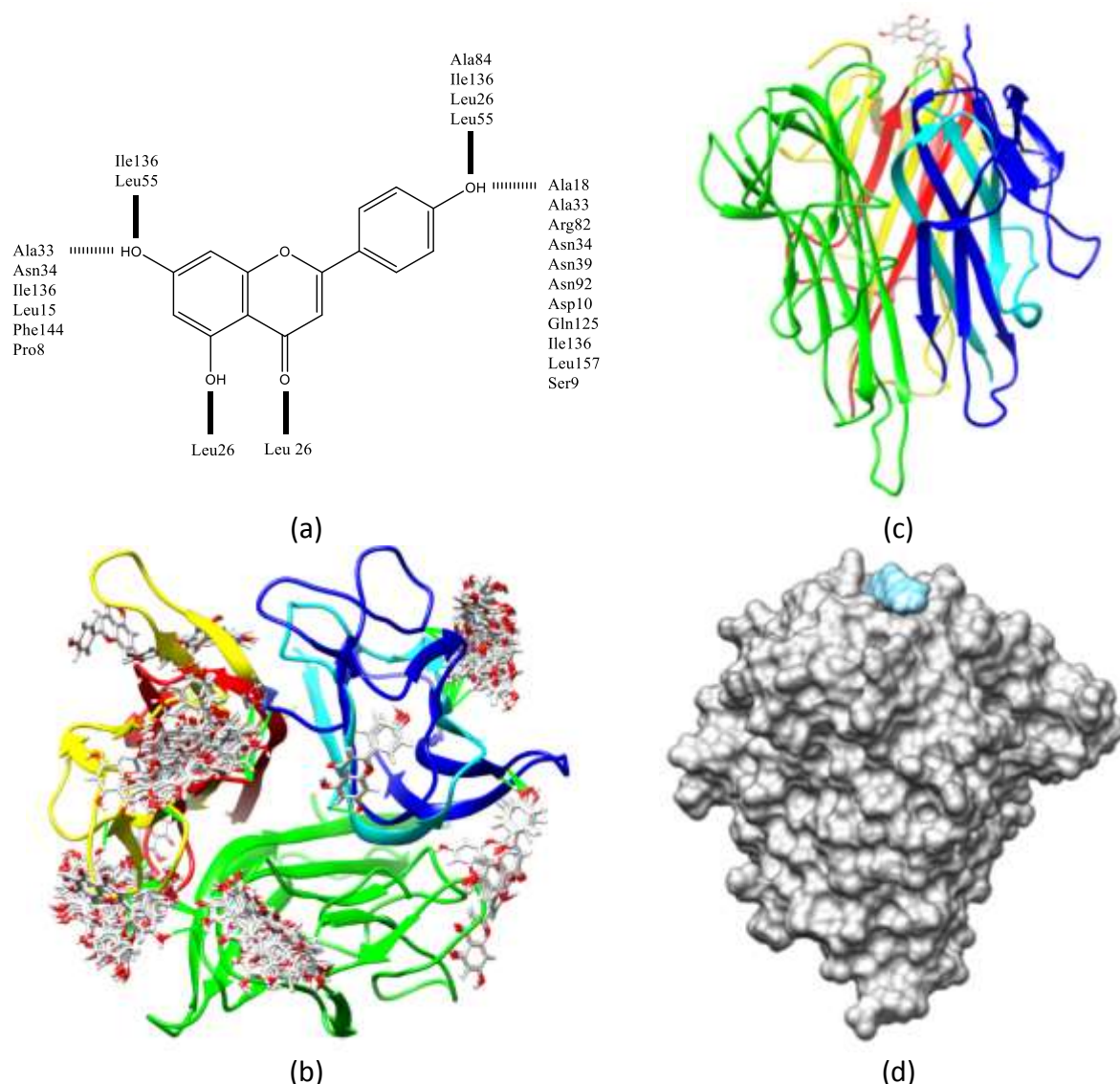
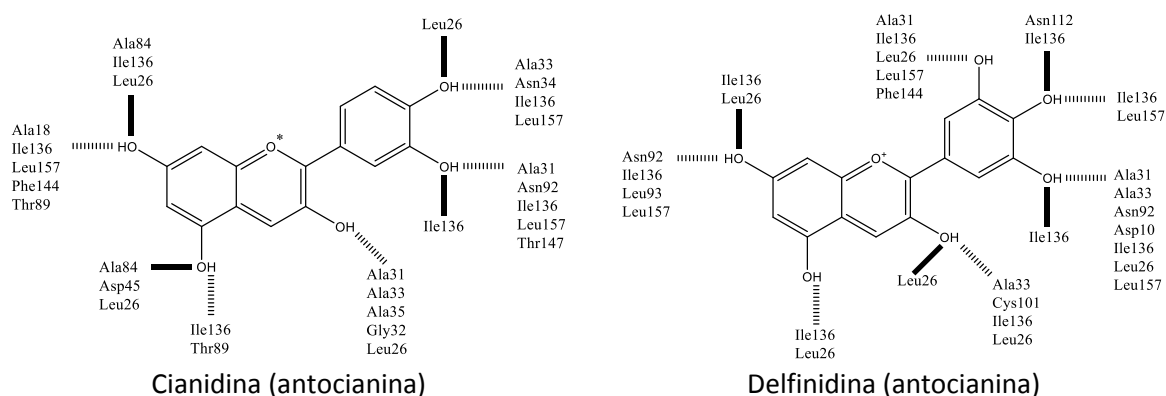


Figura 27. Modelización *in silico* de acoplamiento de la apigenina (flavona) con el receptor membranal TNF-R1, a) estructura de la apigenina y posiciones de los puentes de hidrógeno con los amino ácidos del receptor, b) todos los sitios viables de acoplamiento y modelización de la dinámica molecular (torsión 5Å), c) receptor TNF-R1 con un modelo de acoplamiento de la apigenina, d) vista de la complementariedad de superficie hidrofóbica de la apigenina con el receptor.



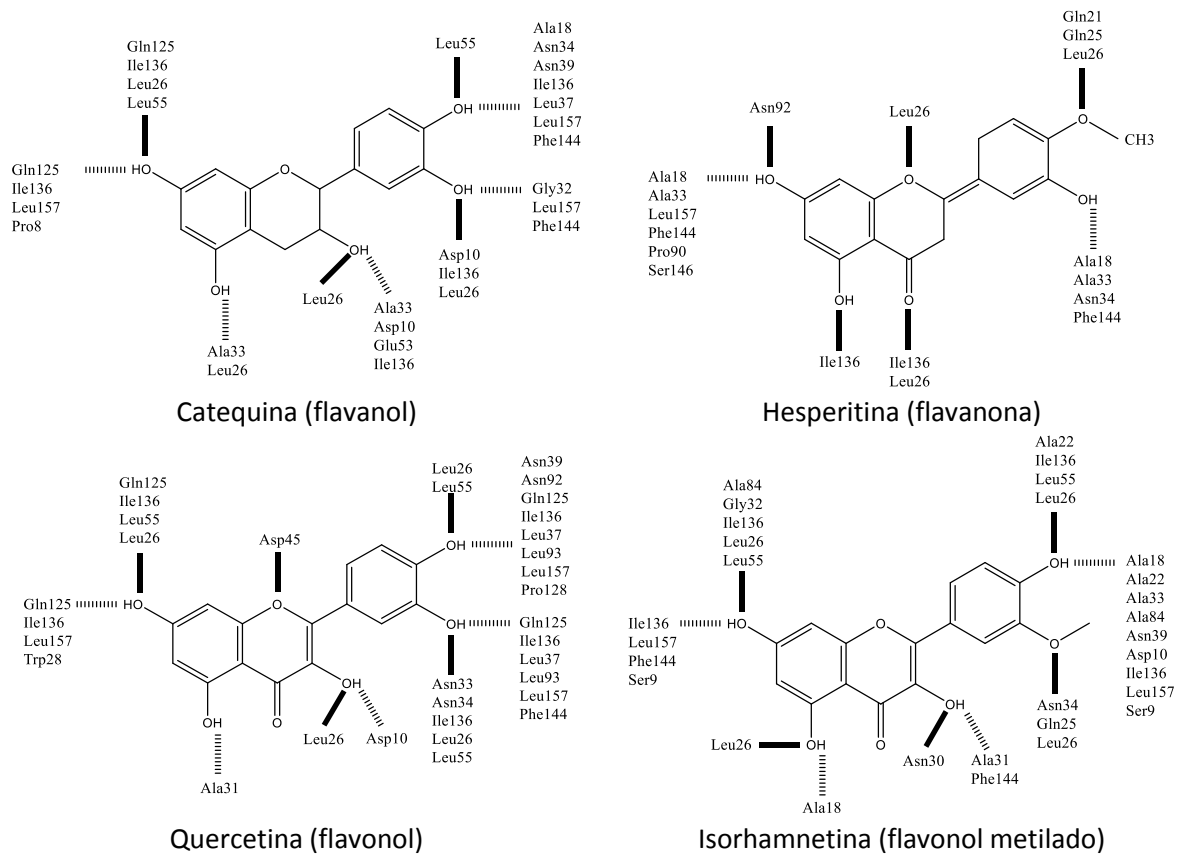


Figura 28. Modelización *in silico* de acoplamiento de los flavonoides agliconas del *guishe* con el receptor membranal TNF-R1.

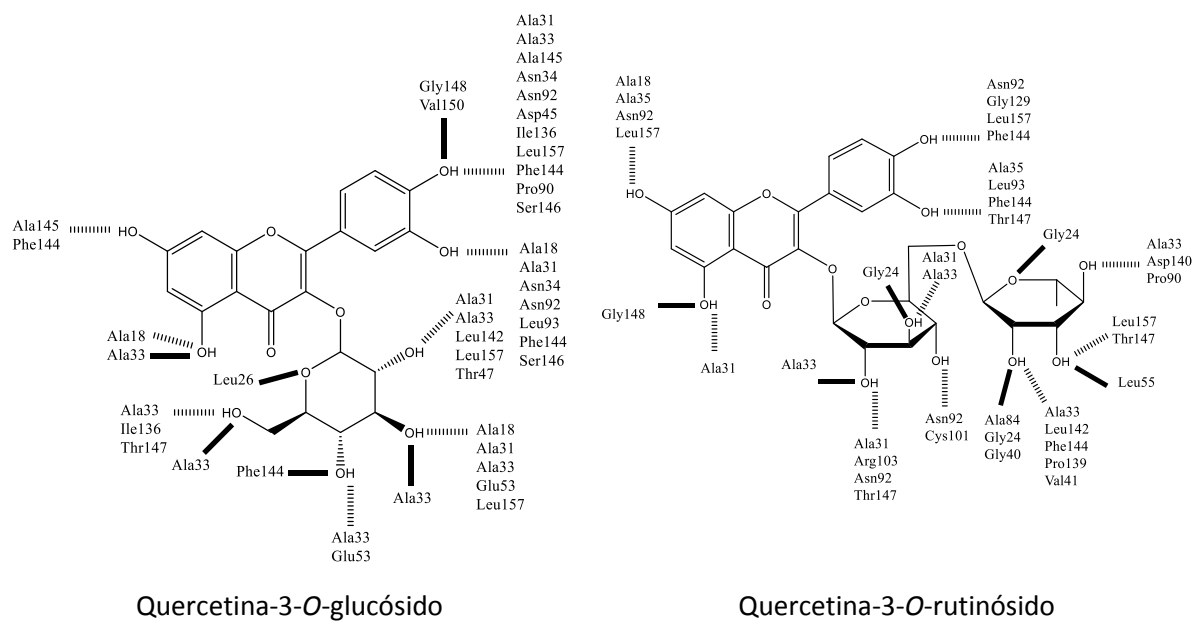
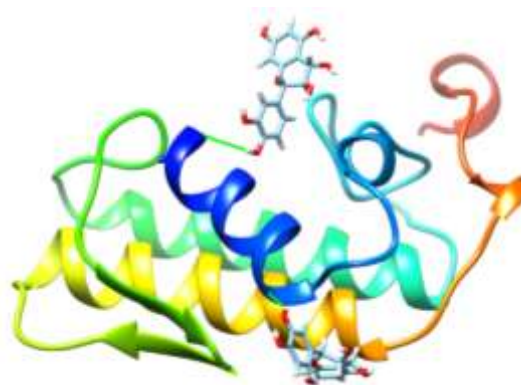
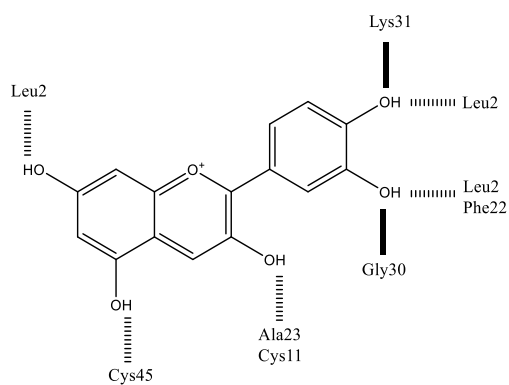
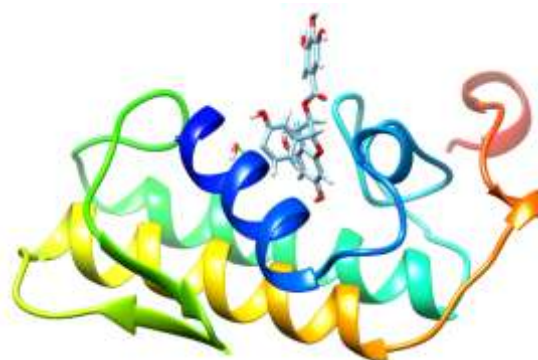
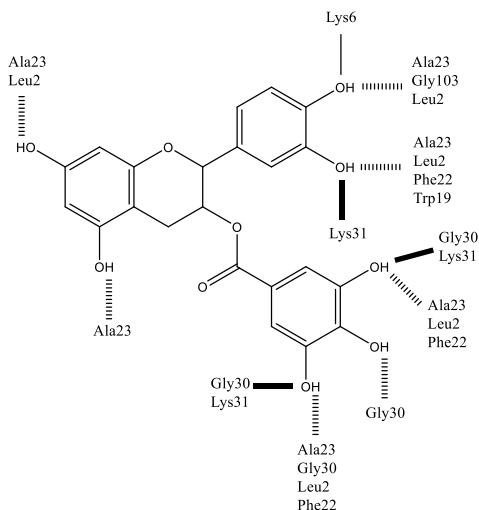


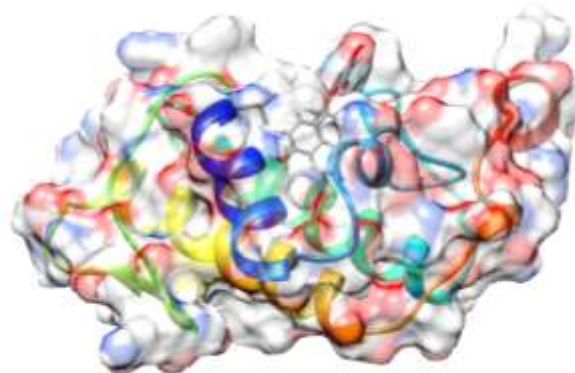
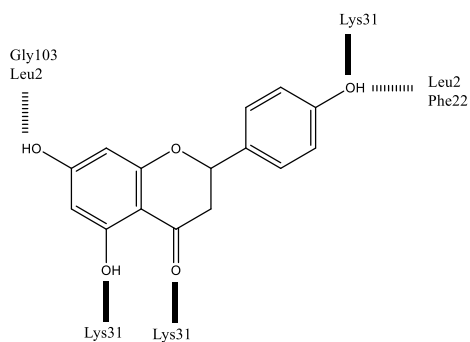
Figura 29. Modelización *in silico* de acoplamiento de un flavonol mono y di-glicosilado con el receptor TNF-R1.



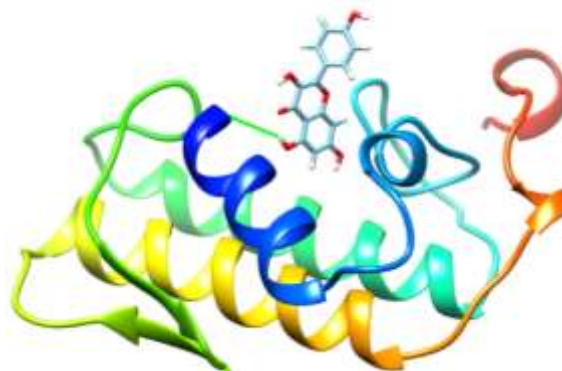
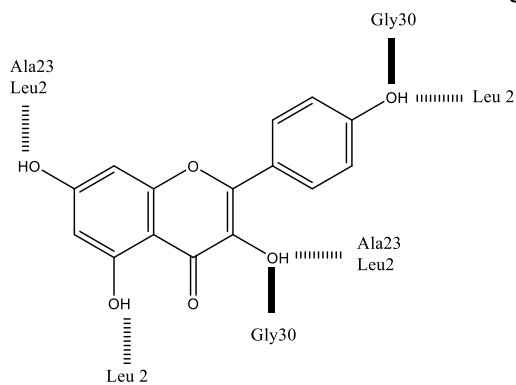
Cianidina (Antocianinas)



Epigallocatequina (Flavanol)



Naringenin (Flavanona)



Kaempferol (Flavonol)

Figura 30. Modelización *in silico* de acoplamiento de los flavonoides agliconas del *guishe* con la enzima PLA2.

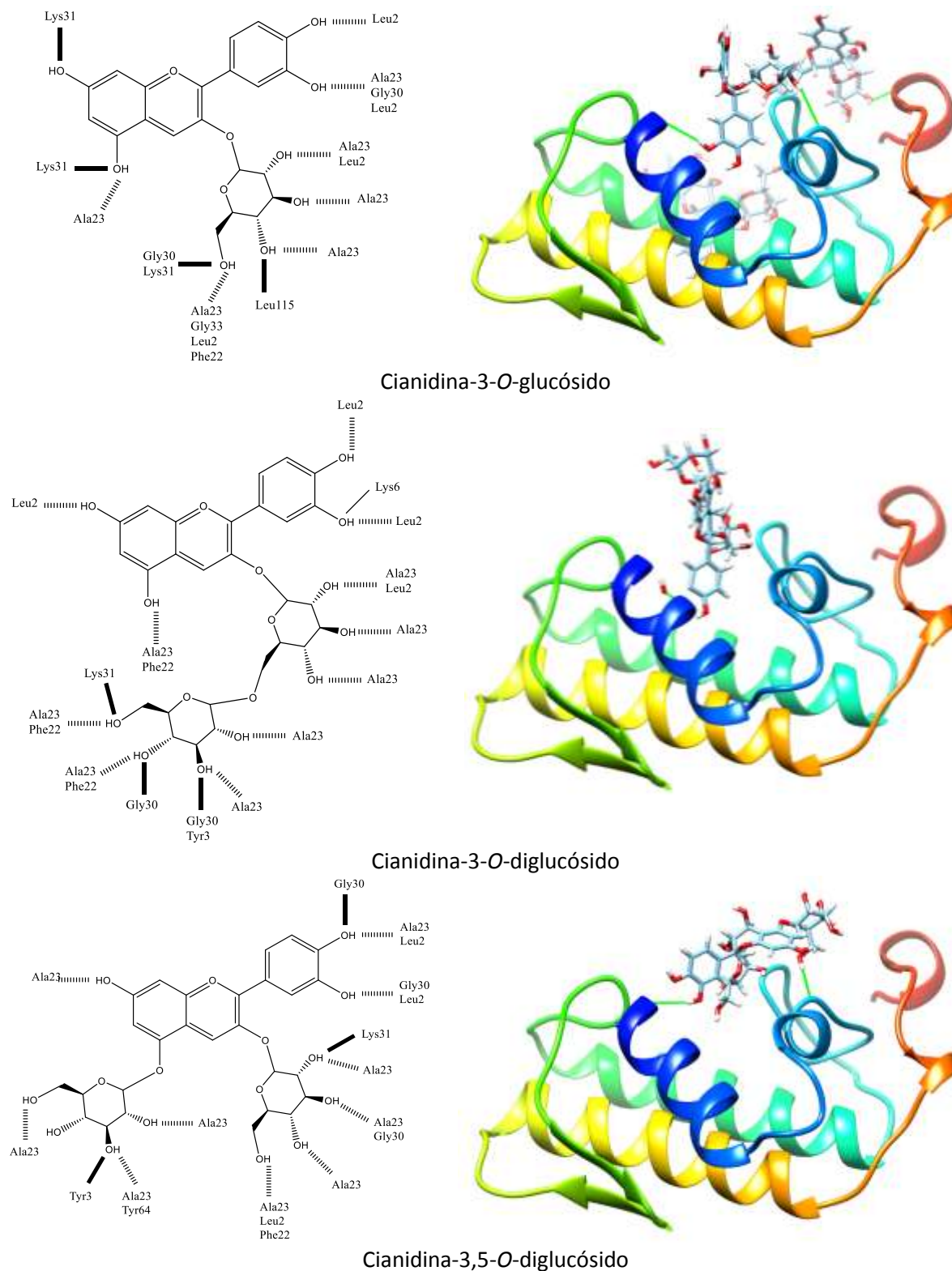


Figura 31. Modelización *in silico* de acoplamiento de los derivados glicosilados de cianidina con la enzima PLA2.

7.1.4.2 Prueba *in vitro*

La actividad antioxidante (AA) de los extractos etanolicos evaluados *in vitro* por la prueba resultó en un porcentaje de inhibición de los radicales DPPH de $38.37 \pm 5.45 \%$. Posteriormente, la curva cinética mostró un incrementó del potencial de captación de los radicales libres hasta el min 70 en el que se estabilizó la AA alrededor de $55.3 \pm 3.53 \%$ DPPH (Fig. 32).

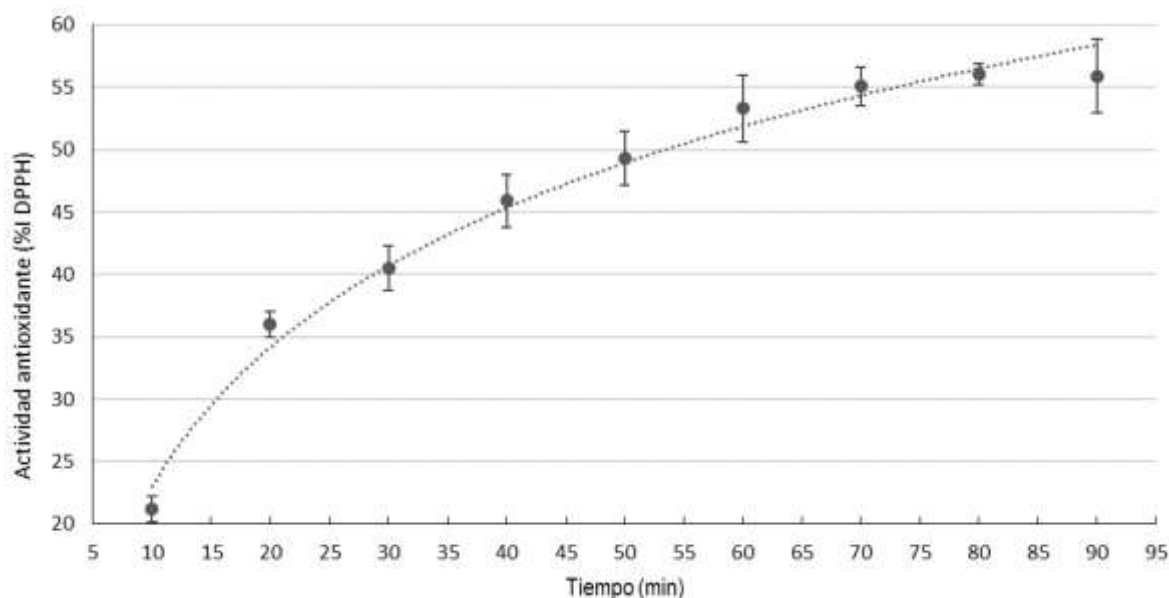


Figura 32. Curva cinética ($y = 11.497\ln(x) - 4.8927$; $R^2 = 0.9716$) de la actividad antioxidante de extracto etanólico del *guishe* de *A. lechuguilla* en porcentaje de inhibición del radical DPPH (%I DPPH).

7.2 Obtención de flavonoides

7.2.1 Variabilidad geográfica

7.2.1.1 Datos ambientales

La zona de recolección es de tipo matorral desértico rosetófilo, donde el suelo se constituye de grava compactado de granulometría variable y bloques de piedra. Es un suelo poco permeable pobre en nutrientes esenciales y enriquecido en algunos oligoelementos tipo hierro según el color rojo de algunas partes de la zona. La exposición a las radiaciones es total en el campo ya que la mayoría de la vegetación es de la misma altura que la lechuguilla. Los datos climáticos se representan en la Tabla 17.

Adicionalmente a las condiciones de estrés abiótico mencionadas, se observó que una parte de la población presentaba manchas circulares amarillas oscuras en las hojas más maduras

que constituyen la roseta, mientras que los cogollos aparecieron menos afectados. Además, se observó la presencia de especies de arácnida e insectos voladores directamente asociado con los individuos de *A. lechuguilla*. Las especies vegetales alrededor también se han inventariado (Anexo D). Se observó una mayor proximidad de cactáceas en comparación a las otras familias más susceptibles a la competencia inducida por químicos por parte de *A. lechuguilla*.

Tabla 17. Condiciones geoclimáticas promedio en agosto para los tres sitios muestreados según la base de datos climáticos de la CONAGUA.

Parámetros ambientales	Matehuala	Cosme	Tuxtepec
Coordenadas GPS	23°28'54.3" N; 100°37'22.1" W	25°52'03.6" N; 101°19'51.1" W	26°11'29.8" N; 101°11'0.96" W
Temperatura	16.0–29.0 °C; Max 35 °C	18.8–30.6 °C; Max 40 °C	19.7–32.9 °C; Max, 35.9 °C
Fotoperiodo	13h12min–12h36min	13h18min–12 h39 min	13h18min–12h39min
Cobertura nublosa	36–42%	47–49%	47–49%
Precipitación	55.6 mm	44.8 mm	29.0 mm
Días lluviosos	4.3	2.8	3.4

7.2.1.2 Perfiles de flavonoides

Los rendimientos de extracción de los fitoquímicos así como el contenido en fenoles totales mostró diferencias significativas según el sitio de muestreo del *guishe*. El mayor rendimiento se observó para la región de Cosme con $38.98 \pm 0.93\%$, en comparación de Matehuala y Tuxtepec, que tuvieron rendimientos de extracción respectivos de $32.88 \pm 1.829\%$ y $30.54 \pm 0.92\%$ (Fig. 33).

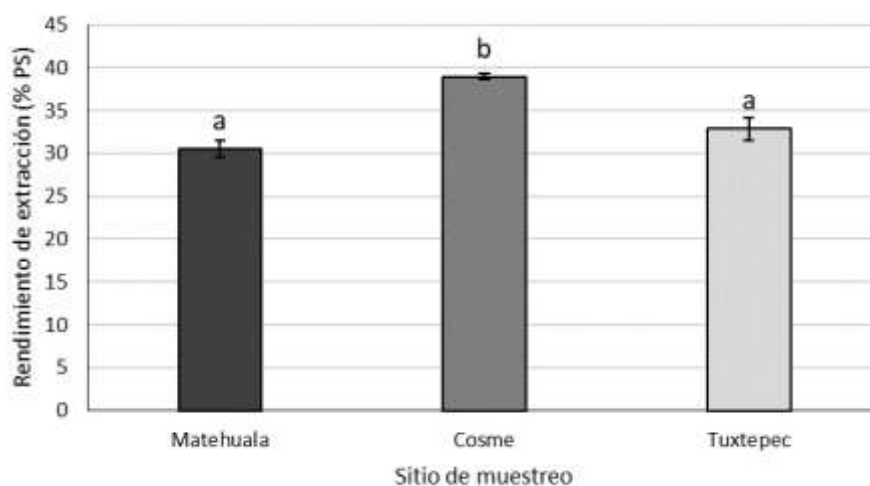


Figura 33. Rendimientos de extracción (UAE; EtOH 70%) en base seca (% PS) obtenidos para el *guishe* de *A. lechuguilla* de tres sitios geográficos diferentes. Las letras diferentes indican una diferencia significativa (ANOVA; $n=3$, $p<0.05$).

Sin embargo, a pesar de que se encontró un rendimiento más alto para Cosme, es el sitio de muestreo que presentó el menor contenido en fenoles totales con 9.40 ± 1.23 mg GAE/g, seguido por Tuxtepec con 10.89 ± 0.61 mg GAE/g, y Matehuala con 16.69 ± 0.43 mg GAE/g. A diferencia de los TPC, no hubo variabilidad en el contenido en flavonoides totales según la región de muestreo y se obtuvieron valores entre 5.62 ± 0.96 mg QE/g PF (Matehuala) a 6.58 ± 1.40 mg QE/g PF (Cosme) (Fig. 34).

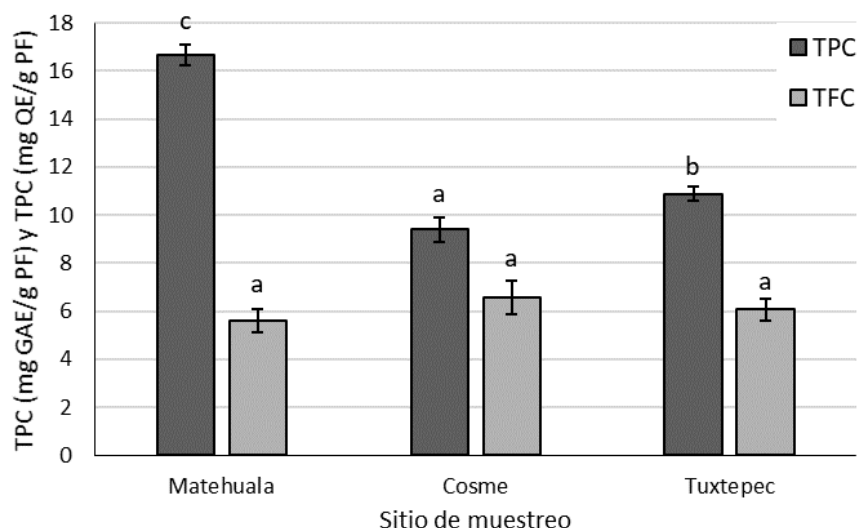


Figura 34. Contenido total en fenoles (TPC; mg GAE/g PF) y flavonoides (TFC; mg QE/g PF) de los extractos etanólicos de *guishe* de *A. lechuguilla* de tres sitios de muestreo. Las letras diferentes indican diferencia significativa respectivamente para TPC y TFC (ANOVA; $n = 12$, $p < 0.05$).

Aunque no se observó una diferencia en el contenido total en flavonoides (TFC), la abundancia de algunos de los flavonoides varió según el sitio de muestreo (Tabla 18). En particular, las antocianinas no se pudieron cuantificar en los espectros de HPLC-UV obtenidos para Matehuala. Con excepción de la cianidina *O*-glicosilada, su ausencia en la muestra de Matehuala se confirmó en los espectros de masas (Tabla 19). Además, se observó una concentración de cianidina y delphinidina diferentes entre los sitios de Coahuila, con abundancias aproximadamente dos veces más alta en Tuxtepec en comparación de Cosme. Adicionalmente, la isorhamnetina se encontró en concentración menor en Cosme comparado con Matehuala y Tuxtepec, los cuales no mostraron diferencia. La isorhamnetina y sus derivados glicosilados, fueron los compuesto mayoritarios de los extractos, su concentración significativamente menor en Cosme se vio reflejado en el total de los flavonoides cuantificados por HPLC-UV. Esto resultó en un menor contenido global en Cosme en comparación de Tuxtepec, y Matehuala. Esta diferencia se encontró en los espectros MS donde se reporta la ausencia de algunos derivados glicosilados en Matehuala y Cosme (Tabla 19). Asimismo, dos derivados de quercetina no se observaron en la muestra proveniente de Matehuala en comparación a las demás regiones muestreadas. Sin embargo, la cuantificación de la fracción de quercetina no mostró diferencias entre los sitios de muestreo (Tabla 18). Asimismo, para los demás compuestos; flavanona, catequina, hesperidina, apigenina, kaempferol y naringenina; no se observó diferencias significativas dependiendo del sitio de muestreo (Tabla 18 y 19).

Tabla 18. Concentración de flavonoides ($\mu\text{g/g}$ PS) obtenida por análisis cuantitativo por HPLC-UV (280 nm) de los extractos etanólicos de *guishe* de *A. lechuguilla* recolectados en tres sitios diferentes.

Pico N°	Flavonoides	Matehuala	Cosme	Tuxtepec
1	Flavanona	276.19 \pm 16.35 ^a	224.78 \pm 19.59 ^a	284.01 \pm 10.61 ^a
2	Isorhamnetina	753.97 \pm 48.25 ^a	614.32 \pm 24.94 ^b	752.80 \pm 2.91 ^a
4	Catequina	1.80 \pm 0.07 ^a	4.97 \pm 2.26 ^{ab}	4.38 \pm 0.50 ^b
5	Cianidina	0.00 ^a	3.53 \pm 0.22 ^b	10.48 \pm 2.61 ^c
6	Delphinidina	0.00 ^a	11.42 \pm 0.32 ^b	21.55 \pm 3.79 ^c
7	Hesperidina	4.00 \pm 0.13 ^a	4.05 \pm 0.29 ^a	4.69 \pm 0.19 ^a
8	Quercetina	11.65 \pm 0.66 ^a	13.73 \pm 0.25 ^a	13.48 \pm 0.32 ^a
9	Apigenina	7.88 \pm 0.33 ^a	7.85 \pm 0.84 ^a	9.25 \pm 0.61 ^a
10	Kaempferol	12.78 \pm 0.75 ^a	12.77 \pm 0.43 ^a	13.48 \pm 0.31 ^a
11	Naringenina	1.43 \pm 0.07 ^a	1.43 \pm 0.15 ^a	1.68 \pm 0.11 ^a
	Total	1069.70	898.85	1115.80

^a La misma letra dentro de una línea indica que no hay diferencia significativa (Kruskal-Wallis; = 3, $p < 0.05$).

Tabla 19. Perfil cualitativo de los flavonoides en los extractos etanólicos de *guishe de A. lechuguilla* muestreado en tres sitios diferentes. Los m/z experimentales y los fragmentos principales se obtuvieron mediante análisis de HPLC-MS en polaridad negativa ($[M-H]^-$).

Flavonoides	m/z ($[M-H]^-$ (Fragmentos))	Matehuala	Cosme	Tuxtepec
Apigenina	268.9 (203.9)	+	+	+
Apigenina-7-O-glicósido	431.1 (268.9; 203.9)	+	+	+
Apigenina-7-O-rutinósido	578.5 (268.9)	+	+	+
Catequina	288.9	+	+	+
Cianidina	287.1	-	+	+
Cianidina-3-O-glicósido	478.4 (287.1)	-	+	+
Cianidina O-diglicósido	609.2 (449.3; 287.1)	+	+	+
Delfinidina	319.1	-	+	+
Delfinidina-3-O-glicósido	465.4 (319.0)	-	+	+
Flavanona	223.1	+	+	+
Hesperidina	610.2	+	+	+
Isorhamnetina	316.1	+	+	+
Isorhamnetina-glucósido	478.4 (272.1)	+	+	+
Isorhamnetina-3-O-rutinósido	622.3 (146.1)	+	+	+
Isorhamnetina glicósido	579.4 (316.1; 272.1)	-	+	+
Isorhamnetina glucosil-pentósido	609.2 (449.1; 272.1; 146.1)	+	+	+
Isorhamnetina-hexosil-hexosil-pentosa	756.5 (162.8; 146.1)	-	+	+
Isorhamnetina-3-gentiotriósido	801.6 (316.1)	+	-	+
Kaempferol	285.1 (153.0; 107.0)	+	+	+
Kaempferol 3-O-glicósido	431.1	+	+	+
Kaempferol 3-O-rutinósido	593.4 (285.1; 431.1)	+	+	+
Kaempferol diglicósido	595.1 (285.1)	+	+	+
Kaempferol triglicósido	772.5 (285.0)	+	+	+
Miricetina	317.0	+	+	+
Miricetina-3-O-glicósido	463.1 (317.0; 179.1)	+	-	+
Miricetina diglicósido	625.2 (317.0)	+	+	+
Naringenina	270.9	+	+	+
Naringenina O-rutinósido	579.5 (270.9)	+	+	+
Quercetina	301.0 (300.9; 179.1)	+	+	+
Quercetina-3-O-xilosa	433.2 (300.9; 179.1)	+	+	+
Quercetina-3-O--ramnosa	447.1 (301.0; 146.1)	+	+	+
Quercetina-3-O-glicósido	463.1 (301.0; 177.0)	-	+	+
Quercetina-3-O-rutinósido	609.2 (300.9; 463.1; 146.1)	+	+	+
Quercetina-3-O-diramnósido	595.1 (300.9; 447.1)	+	+	+
Quercetina-3-O-diglicósido	595.1 (300.9; 463.1)	-	+	+

7.2.1.3 Actividad antioxidante

Los extractos etanólicos obtenidos del *guishe* recolectado en Matehuala mostraron un potencial antioxidante similar al de Tuxtepec, con valores respectivas de 43.38 ± 1.88 y 40.29 ± 2.31 % de inhibición de los radicales libres. En comparación, la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por la región de Cosme fue menor con 31.45 ± 1.40 % I (Fig. 35).

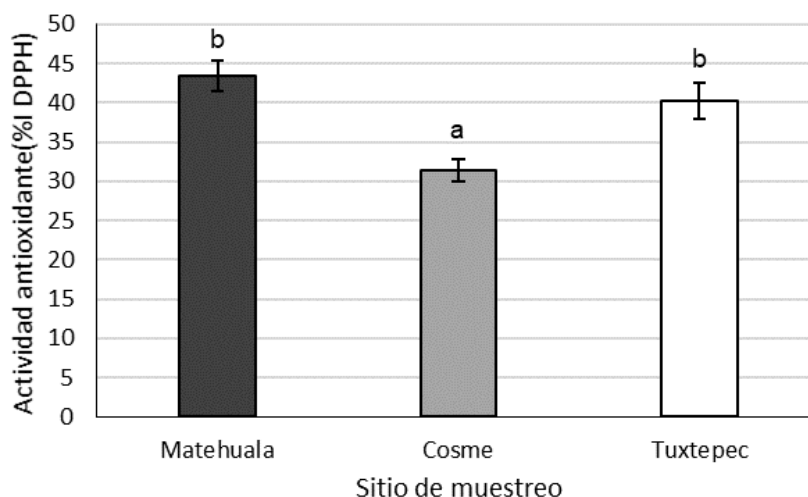


Figura 35. Actividad antioxidante en porcentaje de inhibición de los radicales DPPH (% I DPPH) de los extractos etanólicos obtenidos del *guishe* de *A. lechuguilla* recolectado en tres sitios diferentes. Las letras diferentes indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis, $n=12$, valor $p < 0.05$)

7.2.2 Procesamiento de la muestra

7.2.2.1 Método de secado

7.2.2.1.1 Perfiles en flavonoides

La diferencia entre el rendimiento de extracción entre los métodos de secado fue significativa (Fig. 36). Los mayores rendimientos se obtuvieron utilizando la liofilización independientemente de la exposición a la luz, con un $38.98 \pm 0.64\%$ en la oscuridad (LO) y un $38.03 \pm 2.18\%$ con luz (LL). Los procedimientos de deshidratación (D) y secado al sol (S) redujeron significativamente los rendimientos de extracción en comparación con las muestras liofilizadas, y dieron como resultado un $31.37 \pm 2.17\%$ y un $25.16 \pm 3.53\%$, respectivamente (Fig. 37).

El proceso de secado influyó significativamente en las concentraciones de fenoles y flavonoides de los extractos (Fig. 37). El TPC más alto se obtuvo del bagazo secado al horno con 16.47 ± 0.63 mg GAE/g PF, pero no es significativamente mayor que los 14.41 ± 1.81 mg GAE/g PF obtenidos del bagazo liofilizado en la oscuridad. Asimismo, los tratamientos LO

(14.41 ± 1.81 mg GAE/g PF), LL (11.75 ± 1.27 mg GAE/g PF) y S (12.38 ± 1.76 mg GAE/g PF) no muestran una diferencia significativa en el TPC. En cuanto al contenido de flavonoides, el TFC fue significativamente mayor en los extractos adquiridos a partir de biomasa tratada con LO (10.29 ± 1.80 mg QE/g PF) en comparación con el material secado al sol (5.96 ± 0.96 mg QE/g PF), mientras que el TFC obtenido a partir de biomasa acondicionada con LL y D, que no difieren de otros procesos de secado, dió respectivamente 7.57 ± 1.38 y 8.23 ± 1.22 mg QE/g PF.

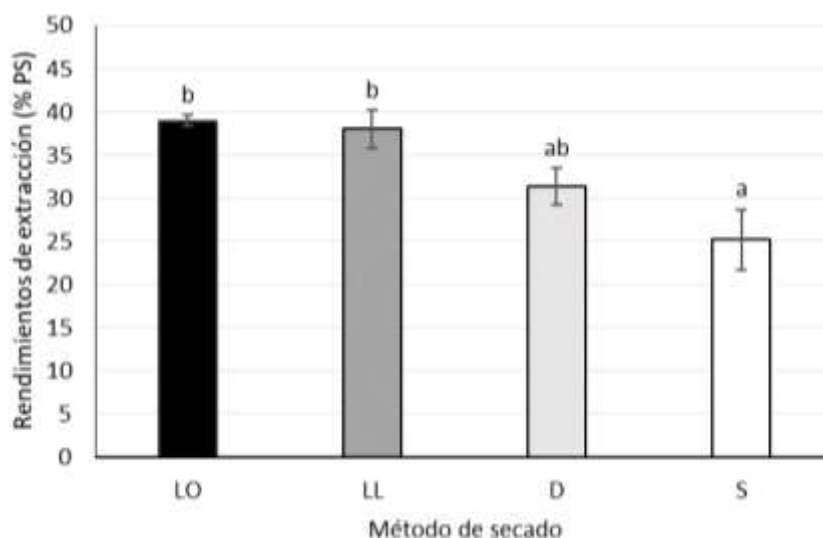


Figura 36. Rendimientos de extracción en porcentaje en base seca (% PS) obtenidos para la extracción convencional del *guishe* de *A. lechuguilla* liofilizado en la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D) y secado al sol (S). Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskall-Wallis; $n=3$, valor $p < 0.05$).

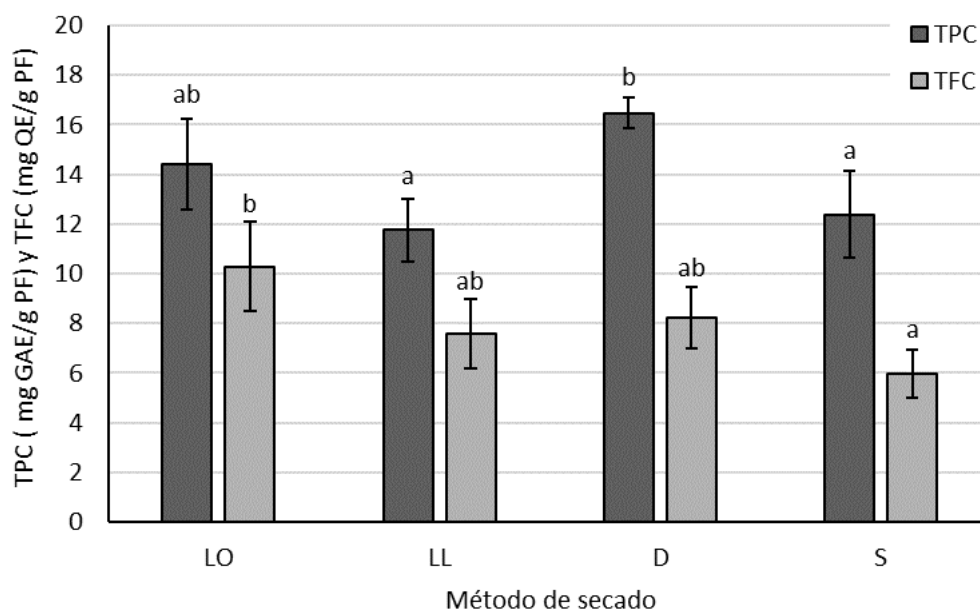


Figura 37. Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PF) y flavonoides totales (TFC; mg QE/g PF) en extractos etanólicos de *guishe* de *A. lechuguilla* liofilizado a la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D) y secado al sol (S). Letras diferentes indican diferencias significativas respectivamente para TPC y TFC (ANOVA; $n=12$, $p < 0,05$).

Los cromatogramas de HPLC-UV son distintos entre los tratamientos con luz (liofilización y al sol) y a la oscuridad (liofilización y deshidratador) (Fig. 38). Esta observación se confirmó con los perfiles de flavonoides detectados por MS/MS, donde no se encontraron las antocianinas en particular (cianidina y delphinidina) en las muestras LL y S, sugiriendo un efecto negativo de la luz.

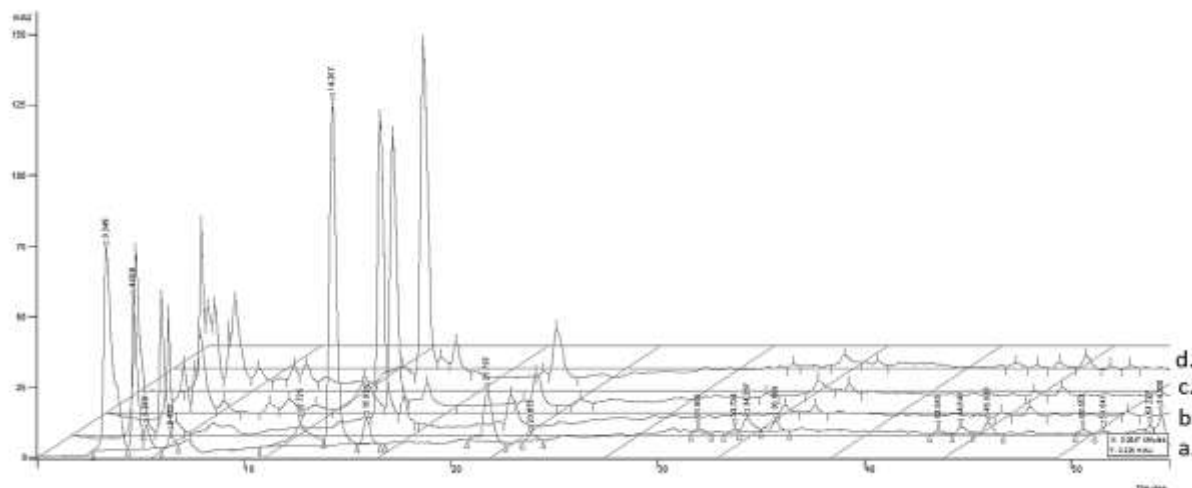


Figura 38. Espectros de HPLC-UV (280 nm) de los extractos etanolicos obtenidos del *guishe* secado por a) liofilización a la oscuridad, b) al horno a la oscuridad, c) liofilización con exposición a la luz, y d) secado al sol.

Estos resultados se corroboraron con la cuantificación de los diferentes flavonoides (Fig. 39). En la cuantificación se observó también una abundancia diferencial entre los tratamientos a la luz y a la oscuridad específicamente para la isorhamnetina, hesperidina y quercetina. De estos flavonoides, la isorhamnetina y cianidina presentaron mayores concentraciones en la muestra procesada en el horno a convección que en la muestra liofilizada. En los demás compuestos no se reportó efecto del tratamiento. El compuesto mayoritario en los extractos siguió siendo la isorhamnetina con una concentración de $864.35 \pm 105.40 \mu\text{g/g PS}$ obtenida en el extracto etanólico de la muestra secada al horno.

En el proceso de secado se observaron abundancias diferenciales entre las condiciones de luz, encontrándose las concentraciones más bajas de todos los flavonoides cuantificados para LL y S y las más altas para LO y D. Más específicamente, la isorhamnetina estaba casi dos veces más concentrada para el secado al horno ($864.35 \pm 7.70 \mu\text{g/g PS}$) que para el bagazo secado al sol ($458.96 \pm 2.04 \mu\text{g/g PS}$). La luz también influyó en la abundancia de antocianinas (cianidina y delphinidina), que cayeron por debajo de los límites de detección

para los extractos obtenidos del bagazo expuesto a la luz. Las flavanonas mostraron un comportamiento similar, aunque no se evidenció significancia entre las condiciones de oscuridad con $224.78 \pm 9.79 \mu\text{g/g PS}$ (LO) y $194.12 \pm 5.18 \mu\text{g/g PS}$ (D), y la biomasa secada a la luz ($179.29 \pm 1.37 \mu\text{g/g PS}$). Asimismo, la quercetina y el kaempferol presentaron concentraciones comparables en los tratamientos LD, LL y D, con medias respectivas de unos 13.21 y $12.97 \mu\text{g/g PS}$. En cambio, las concentraciones de catequina, naringenina y apigenina en los extractos no se vieron afectadas y se mantuvieron respectivamente en torno a 3.06, 1.43 y $8.14 \mu\text{g/g PS}$.

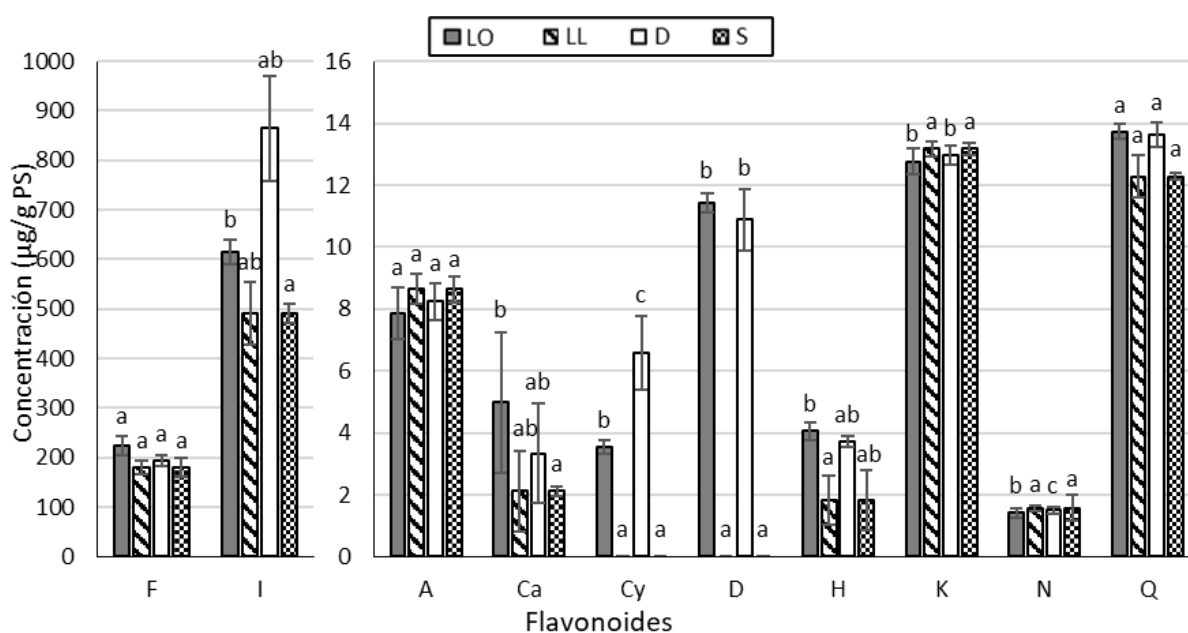


Figura 39. Concentración en los flavonoides cuantificados por HPLC-UV (280 nm) en $\mu\text{g/g PS}$ en extractos etanólicos obtenidos a partir de *guishe* liofilizada a la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D), y secado al sol (S). F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delfinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, N: naringenina, y Q: quercetina. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis; $n=3$, $p<0.05$).

7.2.2.1.2 Actividad antioxidante

El potencial antioxidante de los extractos de *guishe* según el método de secado siguieron las mismas tendencias que el contenido en fenoles totales. Por lo tanto, se observa una mayor capacidad de captación de radicales libres por parte de los extractos obtenidos después del secado al horno ($35.59 \pm 2.68 \% \text{ I DPPH}$) sin mostrar diferencia significativa comparado con la liofilización a la oscuridad ($31.45 \pm 1.40 \% \text{ I DPPH}$). Por otra parte, aunque el efecto de la luz está sugerido (LL; $28.53 \pm 1.02 \% \text{ I DPPH}$), solo el secado al sol impactó de manera significativa con una disminución de la actividad antioxidante resultando en un $22.87 \pm 2.25 \% \text{ I DPPH}$ (Fig. 40).

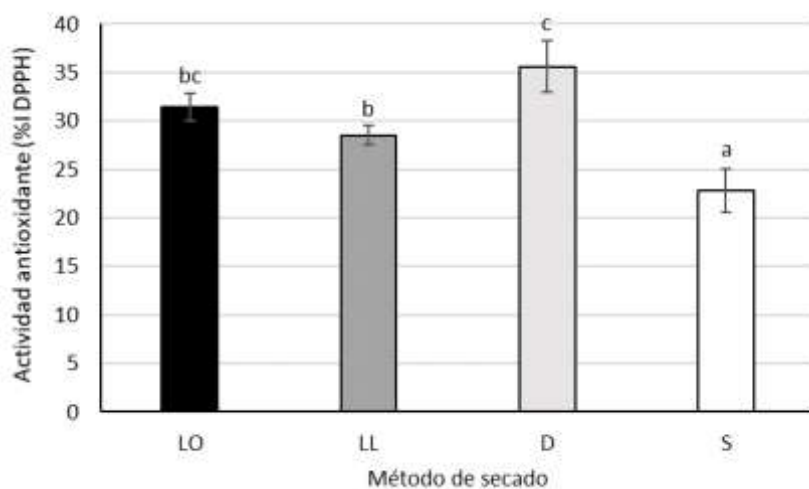


Figura 40. Capacidad de captación de los radicales libres en % de inhibición del reactivo DPPH de los extractos etanólicos de *guishe* de *A. lechuguilla* liofilizado en la oscuridad (LO), expuesto a la luz (LL), deshidratado en horno (D) y secado al sol (S). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA; n=4, p<0.05).

7.2.2.2 Almacenamiento

Los extractos etanólicos del *guishe* almacenado nueve meses a temperatura ambiente, en la oscuridad, en bolsas plásticas con cerrado hermético, dieron resultados de extracción de polifenoles similares a los anteriores con un rendimiento de 30.89 ± 1.86 %, un TPC 12.09 ± 0.61 mg GAE/g PF, y un TFC 6.06 ± 0.44 mg QE/g PF (Kruskall-Wallis; n=3, p<0.05). Además mostraron un perfil en flavonoides similar al de los extractos del *guishe* procesado sin tiempo de almacenamiento (Fig. 41). Asimismo, la actividad antioxidante resultó similar a t0 (38.37 ± 5.45 % I DPPH) y t9 (40.24 ± 1.79 % I DPPH) (Kruskal-Wallis test, n=6, p-value > 0.05).

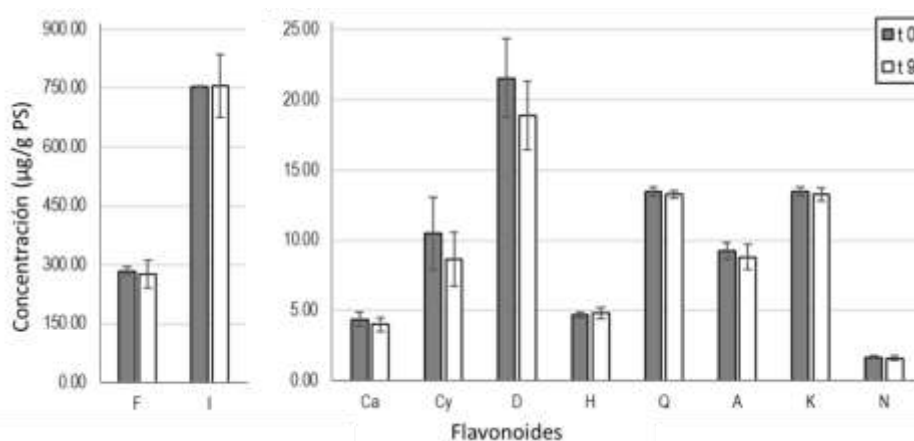


Figura 41. Concentración en los flavonoides cuantificados por HPLC-UV (280 nm) en $\mu\text{g/g}$ PS en extractos etanólicos obtenidos a partir de *guishe* liofilizado sin tiempo de almacenamiento (t0) y después de nueve meses almacenado (t9). F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delphinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, N: naringenina, y Q: quercetina. Letras diferentes indican diferencias significativas (Kruskall-Wallis; n=3, p<0.05).

7.2.2.3 Pretratamiento enzimático

7.2.2.3.1 Formulación de un mix enzimático

El primer diseño experimental (DOE I) se llevó a cabo para evaluar el efecto de la concentración de lacasa, celulasa y pectinasa (5-15 UI) en función del pH (4-6) sobre la obtención de compuestos fenólicos a partir del *guishe* hidrolizado.

En general, las tendencias de variabilidad de TPC y TFC en respuesta a las variables explicativas fueron similares. Por lo tanto, a continuación, se muestran los gráficos obtenidos para TPC. La variabilidad del TPC y TFC en los extractos etanólicos se explicó principalmente por efecto negativo de concentración de lacasa por lo que se observó diferencia significativa entre la cantidad de 5 UI en comparación a 10 y 15 UI. Los TPC no presentaron diferencia significativa en función de la cantidad de celulasa y pectinasa en el mix enzimático. Sin embargo, la modelación predijo que un valor intermedio de la pectinasa aumenta el TPC, mientras que la concentración de celulasa no presenta efecto significativo. A diferencia de los rendimientos de extracción, no se observó efecto del pH en el TPC y TFC con base en análisis de varianza, sin embargo, la modelación predijo un efecto negativo inducido por el aumento del pH (Fig. 42).

Para el siguiente DOE, se formularon tres mezclas enzimáticas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción respectiva: 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP) basadas en los resultados del DOE I. Se evaluó el efecto de los parámetros de hidrólisis: pH, temperatura y tiempo de incubación.

Las proporciones de las diferentes enzimas influyó de manera significativa en el contenido total en fenoles y flavonoides, presentando menores TPC y TFC en ausencia de lacasa. De manera individual, se confirmó que la cantidad de celulasa y pectinasa no impacta de manera significativa el contenido en fenoles y flavonoides de los extractos. Las tendencias en el TPC y TFC dependiendo del pH fueron confirmadas con mayor TPC y TFC obtenido con un pH 4, y un tiempo de incubación de 2.5 h. A diferencia de las otras variables, la temperatura no afectó en la obtención de compuestos fenólicos (Fig. 43).

Los mayores TPC y TFC se obtuvieron con la mezcla de enzimas LCP resultando en 20.56 ± 2.87 mg GAE/g y 5.83 ± 0.83 mg QE/g PF respectivamente.

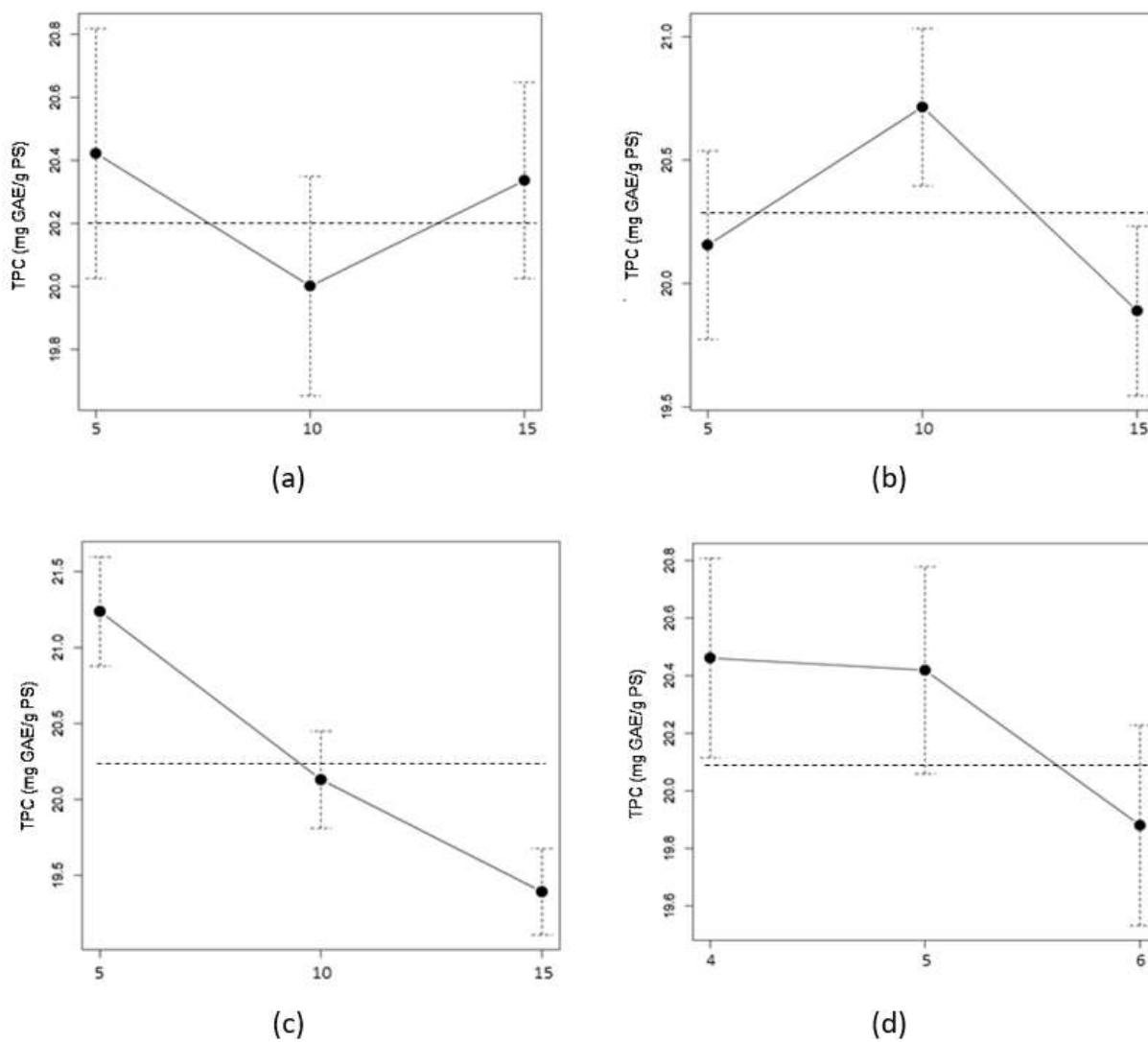


Figura 42. Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PF) en extractos etanólicos de *guishe* previamente hidrolizado con diferentes concentraciones de a) celulasa (5-15 IU), b) pectinasa (5-15 IU), c) lacasa (5-15 IU), y d) dependiendo del pH (4-6) de incubación. La línea discontinua representa el S/N ratio para ANOVA en modelo de Taguchi.

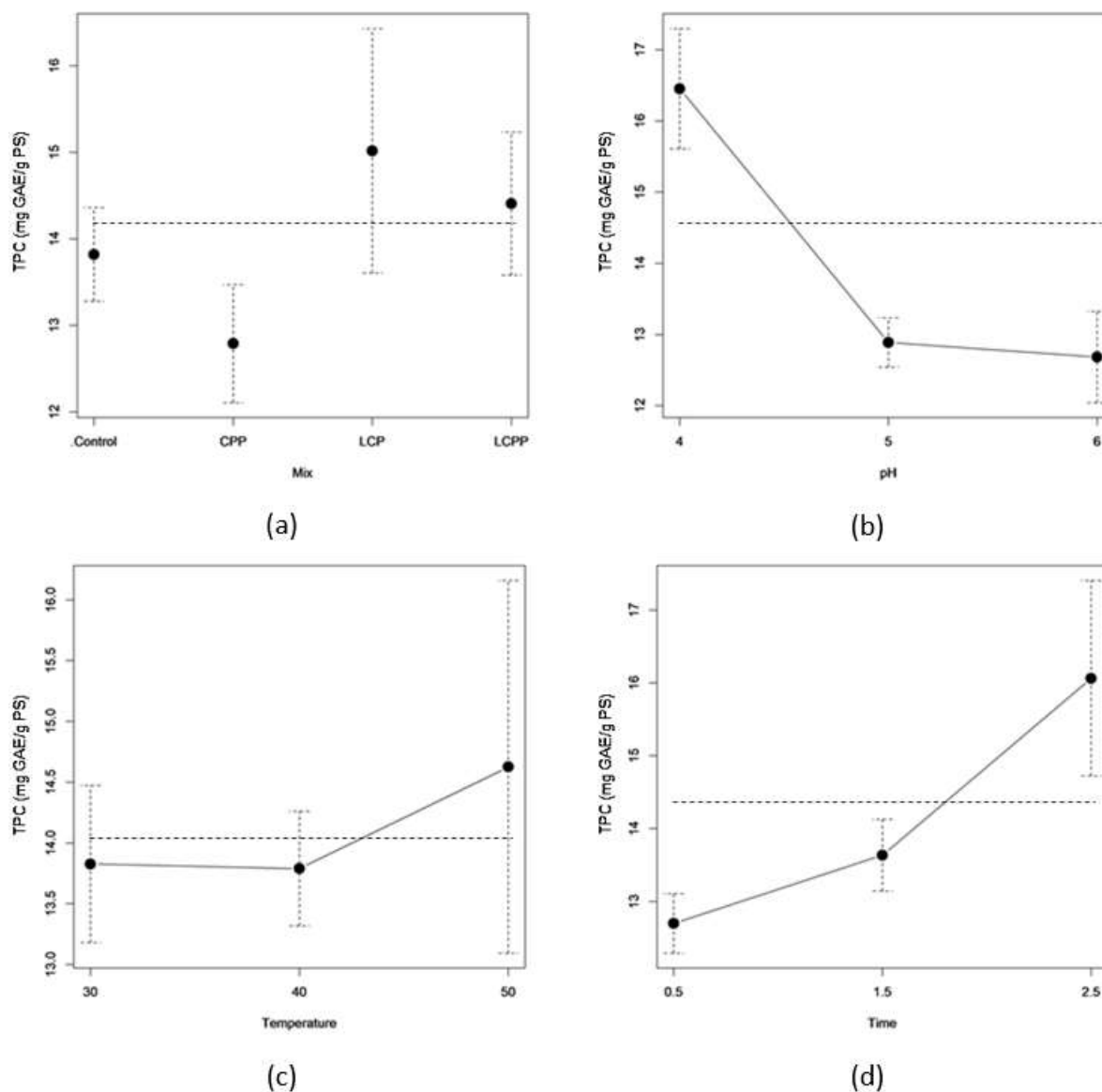


Figura 43. Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PS) en extractos etanólicos en función de a) la mezcla enzimática con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP), y 0:1:2 (CPP), b) pH (4-6), c) temperatura (30-50°C), y d) tiempo (0.5-2.5 h). La línea discontinua representa la relación S/N para ANOVA en modelo de Taguchi.

Los espectros de HPLC-UV, que se reflejaron en los espectros de MS, revelaron que la presencia de lacasa en el mix enzimático impactó la cantidad de la cianidina que disminuyó del 43.5%, la delphinidina del 21.2%, la flavanona y la quercetina del 1.5% en comparación con los tratamientos con lacasa (Fig. 44). Además, se observó una disminución drástica del contenido en kaempferol, apigenina, naringenina y hesperidina los cuales pasaron debajo de los límites de detección del PDA, aunque se observaron en los espectros de masas. La isorhamnetina, flavanona y quercetina no presentaron diferencia significativa en sus concentraciones medidas en ambos tratamientos de lacasa. Por otra parte, los espectros

exhibieron un aumento de la abundancia relativa de los compuestos que eluden de manera inmediata en el método usado, los cuales corresponden a los ácidos fenólicos tales como el ácido cumárico ($[M-H]^-$ $m/z=163.0$, ion MS/MS $m/z=119$) y ácido gálico ($[M-H]^-$ $m/z=169.0$) encontrados en espectros de masas.

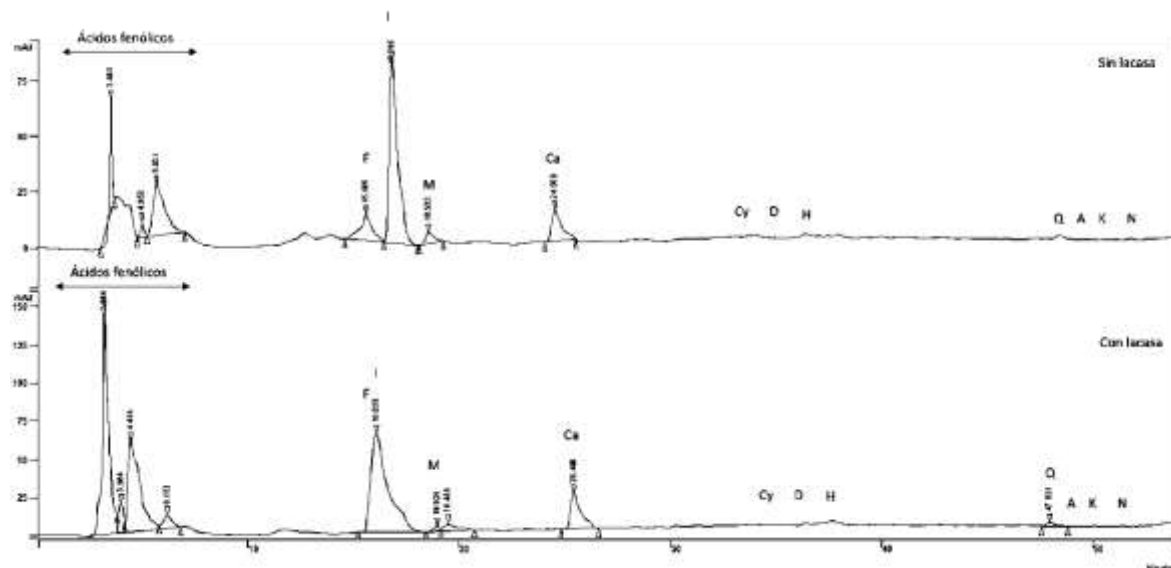


Figura 44. Espectros de HPLC-UV (280 nm) de los extractos etanolicos obtenidos después de pretratamiento sin lacasa (arriba) y con lacasa (abajo) a pH 4. F: flavanona, I: isorhamnetina, A: apigenina, Ca: catequina, Cy: cianidina, D: delfinidina, H: hesperidina, K: kaempferol, M: Miricetina, N: naringenina, y Q: quercetina.

7.2.2.3.2 Mezclas comerciales

El tercer diseño experimental se realizó para evaluar la eficiencia de dos mezclas enzimáticas comerciales de Novozyme® en los mismos rangos de pH, temperatura y tiempo de incubación usados para los mix formulados.

El contenido en fenoles totales se observó en un rango de 17.13 ± 3.83 mg GAE/g PF (Ultraflo) 18.63 ± 3.81 mg GAE/g FW (Viscozyme), y la cantidad de flavonoides entre 6.62 ± 1.48 mg QE/g PF (Ultraflo), y 7.38 ± 1.50 mg QE/g PF (Viscozyme). Este estudio comparativo mostró que el único parámetro que indujo una variabilidad en la obtención de compuestos fenólicos y flavonoides fue la el tiempo de incubación (Fig. 45).

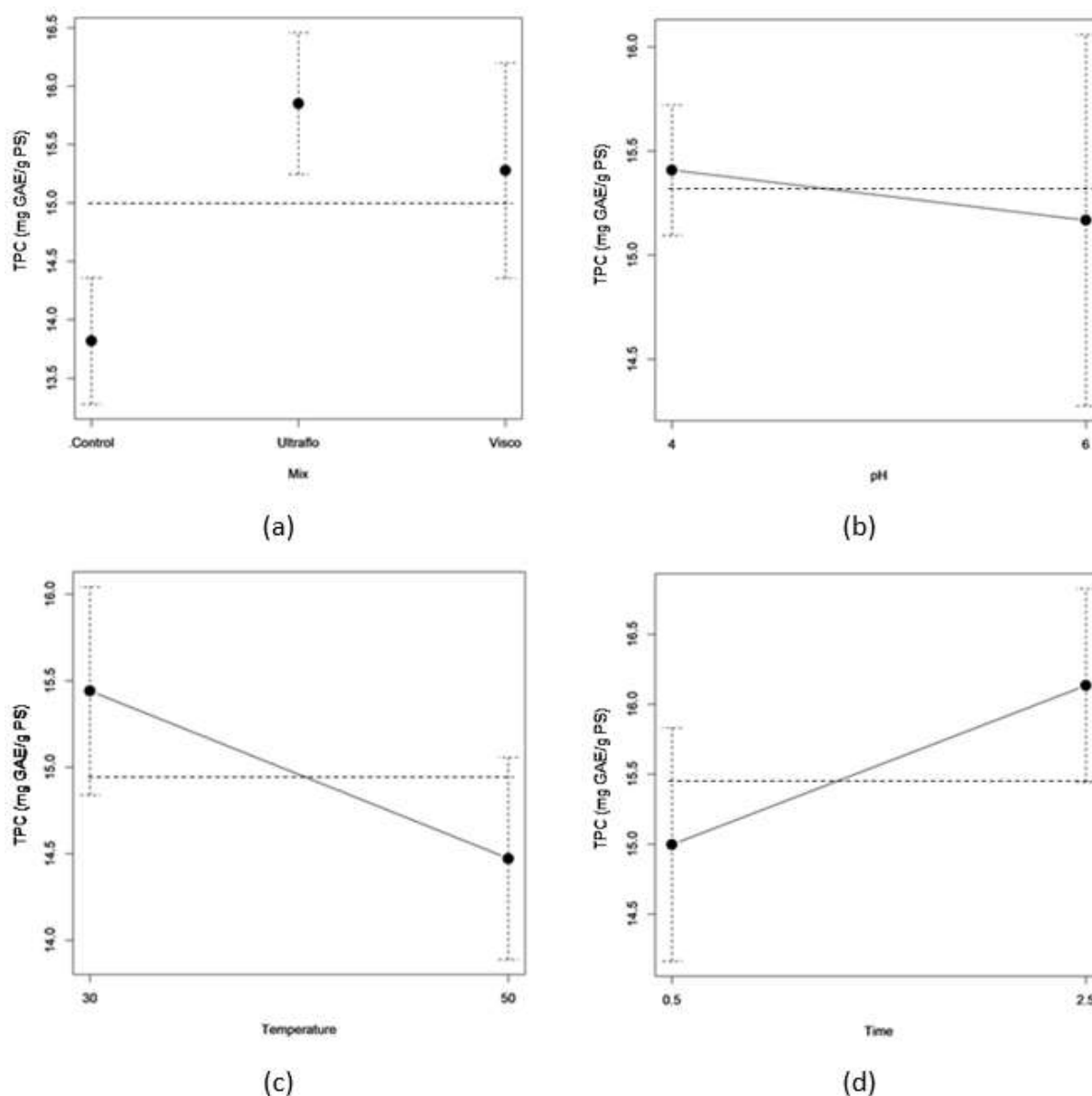


Figura 45. Contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PS) en extractos etanólicos en función de a) la mezcla enzimática (Ultraflo y Viscozyme), b) pH (4-6), c) temperatura (30-50°C), y d) tiempo (0.5-2.5h). La línea discontinua representa la relación S/N para ANOVA en modelo de Taguchi.

7.2.2.3.3 Análisis comparativo

En complementariedad con la modelización basada en el modelo de Taguchi, se juntaron los datos para evaluar el efecto combinado de las diferentes variables probadas en los tres DOE con un análisis multifactorial (Tabla 20) y análisis de superficie de respuesta (Fig. 46-48) con el fin de obtener las condiciones óptimas de pretratamiento enzimático.

De manera general, los mejores rendimientos, TPC, TFC y actividad antioxidante se observaron en el DOE III. Las diferencias entre los DOE, controles y biomasa no tratada se

encontró significativa solo en algunas condiciones de pH, tiempo y temperatura de hidrólisis por lo que fue importante evaluar el efecto de cada variable considerada en los diferentes diseños experimentales. A notar también, que el pH tuvo un efecto significativo en el TPC y TFC de los extractos ya que en los controles se observó una diferencia significativa entre el pH 4 y los pH 5 y 6 con un efecto positivo del pH 4 en las concentraciones medidas (Tabla 20).

Tabla 20. Rendimientos de extracción, contenido en fenoles (TPC) y flavonoides (TFC) totales, y actividad antioxidante (% I DPPH) en respuesta a los diferentes tratamientos de hidrólisis enzimática aplicada en los tres diseños experimentales.

Rendimientos PF (%) ¹			TPC (mg GAE/PF) ¹			TFC (mg QE/g PF) ¹			% I DPPH ¹		
Controles											
C1	18.753 ± 2.416	ab	15.518 ± 0.302	ad	4.811 ± 0.094	bcehij	31.031 ± 1.384	cd			
C2	18.662 ± 1.116	ab	13.099 ± 1.217	ab	3.668 ± 0.341	ae	30.082 ± 1.108	bcd			
C3	18.327 ± 1.015	ab	12.840 ± 1.570	ab	3.788 ± 0.463	ae	30.655 ± 1.458	bcd			
DOEI											
1	22.202 ± 2.028	ace	12.842 ± 0.394	ab	4.026 ± 0.123	acef	NA				
2	22.652 ± 2.701	ace	12.251 ± 1.032	ab	3.693 ± 0.311	ae	NA				
3	27.763 ± 2.985	e	11.675 ± 0.908	ab	3.339 ± 0.260	acef	NA				
4	26.271 ± 1.878	de	12.419 ± 1.540	ab	3.962 ± 0.491	ae	NA				
5	21.060 ± 0.824	acd	12.301 ± 0.606	ab	4.465 ± 0.220	bceh	NA				
6	23.290 ± 1.245	ace	12.345 ± 1.270	ab	3.259 ± 0.335	acef	NA				
7	24.509 ± 2.584	bce	12.885 ± 0.073	ab	3.519 ± 0.159	acd	NA				
8	25.451 ± 3.926	ce	11.908 ± 0.831	ab	3.078 ± 0.215	ab	NA				
9	22.721 ± 1.759	ace	10.939 ± 0.679	ab	2.623 ± 0.163	a	NA				
DOE II											
11	19.341 ± 2.734	ac	13.865 ± 1.465	abc	5.269 ± 0.557	dehij	34.061 ± 4.633	cde			
12	20.419 ± 3.881	acd	16.166 ± 1.809	ad	5.412 ± 0.181	ehij	44.372 ± 4.850	ghi			
13	21.792 ± 0.548	ace	20.256 ± 2.870	d	5.834 ± 0.827	fghk	45.530 ± 2.607	h			
14	21.782 ± 1.046	ace	13.215 ± 2.286	abc	4.625 ± 0.800	bcehi	29.619 ± 1.592	bcd			
15	21.516 ± 3.371	ace	12.335 ± 0.363	ab	4.687 ± 0.138	bcehi	23.176 ± 0.858	ab			
16	21.334 ± 1.596	ace	12.899 ± 0.631	ab	4.946 ± 0.277	cehij	27.327 ± 1.263	ac			
17	21.284 ± 1.272	ace	11.283 ± 2.014	a	3.986 ± 0.585	ae	33.602 ± 0.304	cde			
18	16.856 ± 1.398	a	14.716 ± 3.163	abc	4.934 ± 0.572	cehij	34.434 ± 1.150	cdef			
19	22.779 ± 0.908	ace	11.893 ± 0.743	ab	4.358 ± 0.218	aceh	20.527 ± 1.540	a			
DOE III											
21	20.027 ± 1.737	acd	15.696 ± 1.397	ad	5.933 ± 0.528	hk	36.931 ± 2.278	dg			
22	23.305 ± 3.603	ace	15.143 ± 1.341	ad	5.833 ± 0.517	fghk	41.797 ± 3.616	fgh			
23	22.911 ± 1.380	ace	11.640 ± 0.922	ab	4.093 ± 0.324	aceg	29.236 ± 3.471	bc			
24	22.991 ± 0.507	ace	18.635 ± 3.810	cd	7.380 ± 1.509	k	43.496 ± 1.789	gh			
25	18.892 ± 1.566	ac	15.517 ± 1.901	ad	6.129 ± 0.780	hk	32.305 ± 1.057	cd			

26	20.394 ± 0.906	acd	15.167 ± 1.586	ad	6.361 ± 0.057	jk	40.761 ± 3.224	gh
27	19.747 ± 0.632	acd	15.790 ± 0.141	bd	5.919 ± 0.570	ghk	39.846 ± 2.517	egh
28	21.568 ± 1.648	ace	17.132 ± 3.832	ad	6.624 ± 1.482	ik	44.374 ± 0.905	egh

Nota: ¹ Letras diferentes indican diferencias significativas (MANOVA, $p < 0.05$).

7.2.2.3.4 Rendimiento de extracción

De manera general, el uso de enzimas permitió incrementar los rendimientos de extracción de los fitoquímicos del *guishe* ($23.99 \pm 2.17\%$ PF) en comparación con los controles ($18.58 \pm 0.22\%$ PF). Los rendimientos de extracción obtenidos en los DOE II y III se mantuvieron en el mismo rango que en el DOE I con $20.79 \pm 1.76\%$ y $21.23 \pm 1.70\%$ respectivamente, y fueron superiores al control (Tabla 20, Fig. 46). Los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron utilizando la mezcla comercial Viscozyme®. Además, el aumento del pH, la temperatura y el tiempo mejoraron los rendimientos de extracción.

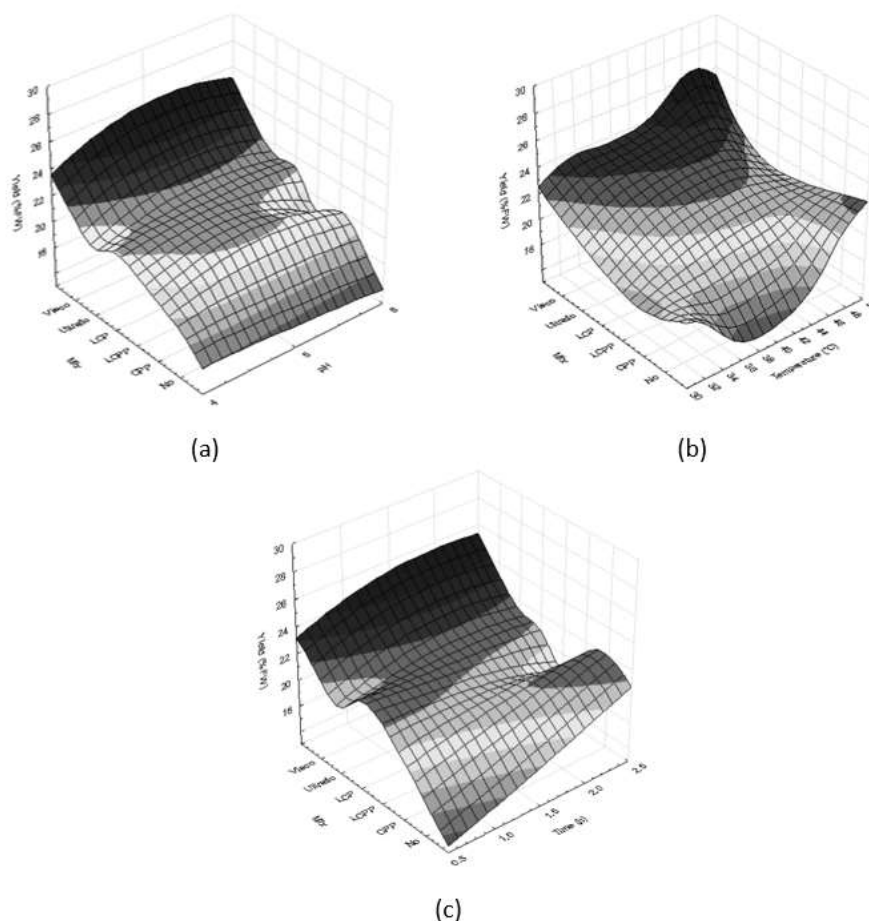


Figura 46. Superficie de respuesta del rendimiento de extracción (% PF) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Viscozyme® (Visco) y Ultraflo® (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi ($n=3$, $p > 0.05$).

7.2.2.3.5 Contenido total en fenoles y flavonoides

En el caso de los mix formulados, el TPC vario en 12.17 ± 0.60 mg GAE/g PF, y el TFC alcanzó 3.55 ± 0.56 mg QE/g PF. Sin embargo, estos fueron inferiores a lo que se obtuvo utilizando mezclas de enzimas comerciales que proporcionaron un TPC de unos 14.07 ± 0.76 mg GAE/g PF y un TFC de 4.89 ± 0.56 mg QE/g PF. El TPC fue aún más alto con el valor de pH más bajo (4), la temperatura intermedia (40 °C) y el tiempo más alto (2.5 h) (Fig. 47). En contraste, el pH, la temperatura y el tiempo no indujeron una variación de la TFC entre los tratamientos enzimáticos (Fig. 48).

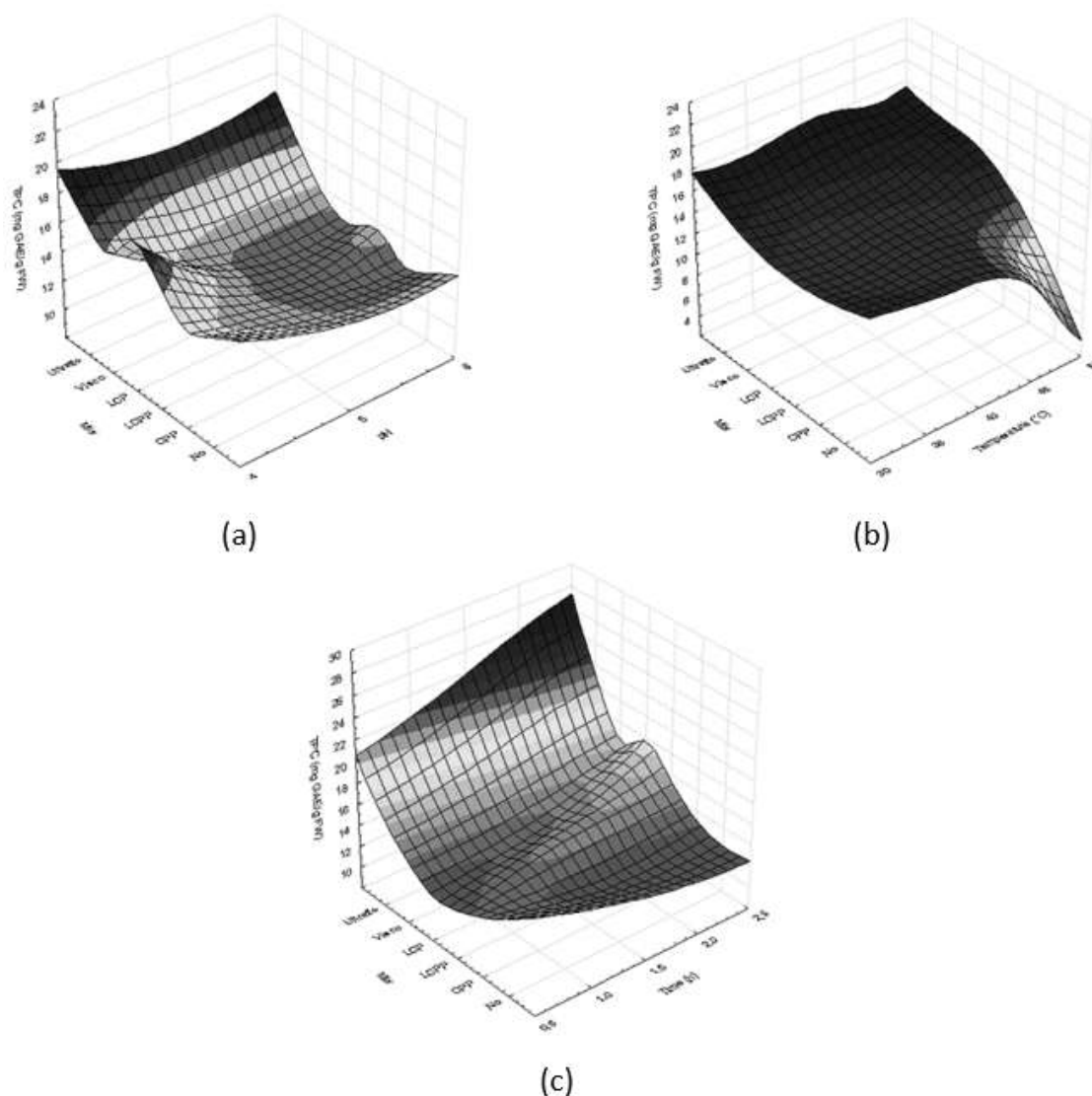


Figura 47. Superficie de respuesta del contenido en fenoles totales (mg/g PF) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Viscozyme® (Visco) y Ultraflo® (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi (n=3, p>0.05).

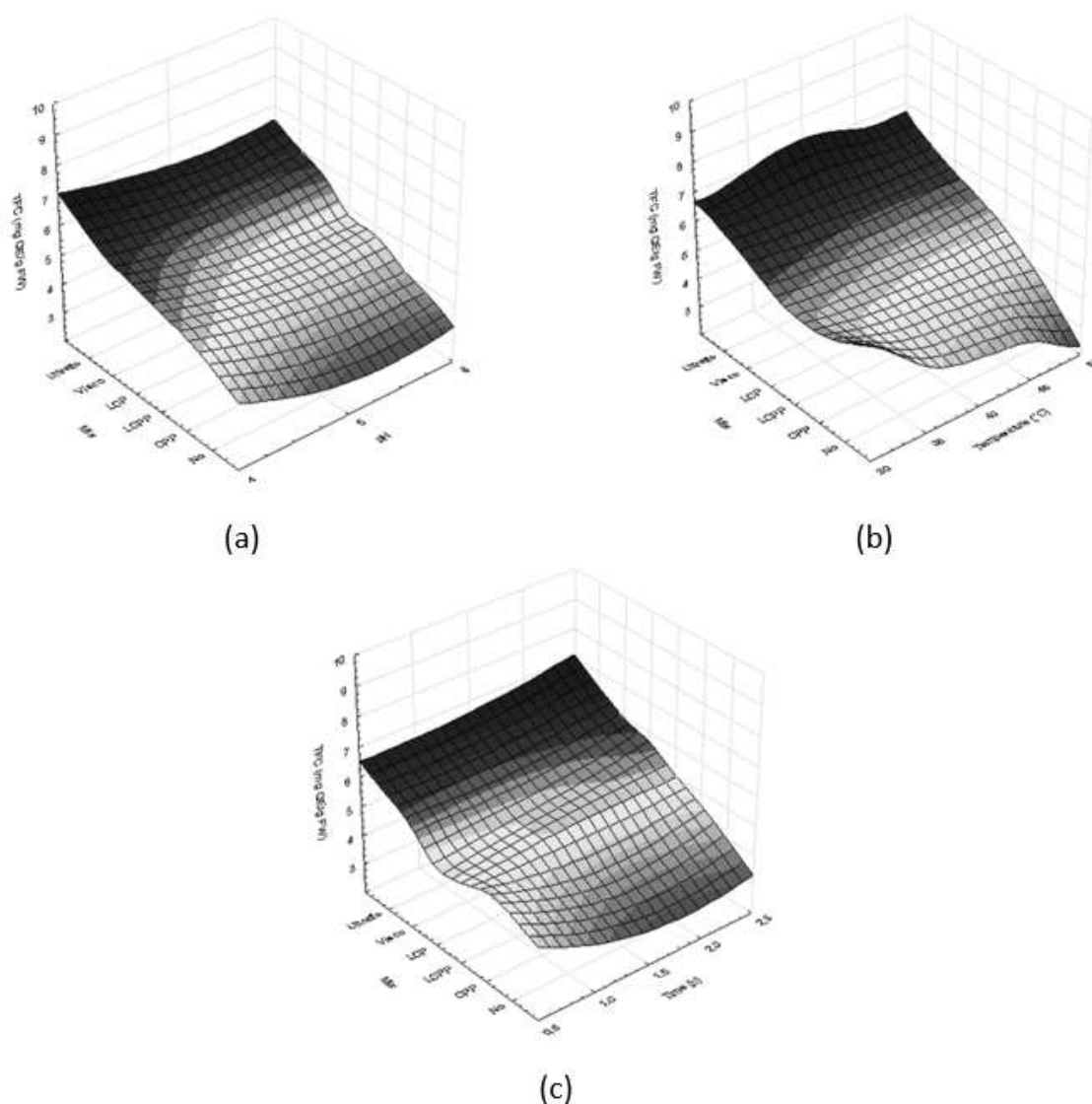


Figura 48. Superficie de respuesta del contenido en flavonoides totales (mg QE/g PF) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Visczyme® (Visco) y Ultraflo® (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi ($n=3$, $p>0.05$).

Basado en las predicciones de los tres DOE, el análisis estadístico del componentes principales permitió establecer que el pH afectó la variabilidad en el contenido en fenoles totales a 35.18%, los mix enzimáticos a 28.57%, la temperatura de incubación a 21.31% y el tiempo de incubación a 14.95%. Asimismo, el contenido en flavonoides se encontró impactado principalmente por el mix enzimático (78.31%) y de manera secundaria por los otros parámetros (21.69%). El análisis multifactorial aplicado confirmó que de las diferentes digestiones enzimáticas se obtuvieron mayores TPC y TFC con el mix enzimático lacasa,

celulasa y pectinasa (1:1:1, w/w/w) y los dos mix comerciales Viscozyme y Ultraflo. Considerando las cantidades individuales de cada enzima, el aumento de la cantidad tendió a minimizar tanto los rendimientos como los TPC y TFC. De los parámetros físicos-químicos de la hidrólisis, los rendimientos, TPC, TFC y %I más altos se obtuvieron con el pH 4, la temperatura de 40°C y un tiempo de incubación de 2.5 h (Tabla 20).

7.2.2.3.5.1 Perfiles específicos de flavonoides

El mix enzimático en el contenido específico y en sus abundancias respectivas, moduló de manera significativa la abundancia global de los flavonoides cuantificados por HPLC-UV en comparación con el control. Los resultados presentados en figura 49 mostraron que el uso de Ultraflo favoreció la extracción de cianidina ($14.56 \pm 0.64 \mu\text{g/g PS}$), delphinidina ($26.33 \pm 2.16 \mu\text{g/g PS}$), hesperidina ($10 \pm 29 \mu\text{g/g PS}$) en comparación con el control. En contraste, la quercetina se encontró en menor concentración en los extractos obtenidos del *guishe* hidrolizado con Ultraflo mientras la cantidad más alta se obtuvo usando el Viscozyme ($164 \pm 10 \mu\text{g/g PS}$). Asimismo, la flavanona y la isorhamnetina mostraron mayores concentraciones con el uso del Ultraflo, con 345.43 ± 20.13 y $952.82 \pm 39.48 \mu\text{g/g PS}$ respectivamente, aunque fue significativamente diferente de lo obtenido con uso de Viscozyme (301.55 ± 18.75 y $823.13 \pm 51.18 \mu\text{g/g PS}$). Además, para estos compuestos, no hubo diferencia significativa entre el Viscozyme, el mix CP y control, pero sí hubo diferencia con el mix LCP que presentó las concentraciones más bajas de flavanona e isorhamnetina. De manera similar, se observó una disminución drástica de la cantidad de hesperidina, naringenina, apigenina y kaempferol con el uso de la mezcla formulada LCP. Por último, el tratamiento de control proporcionó una mayor concentración de catequina ($4.22 \pm 0.45 \mu\text{g/g PS}$), mientras que la concentración de naringenina no se encontró afectada por el tratamiento enzimático, a la excepción del uso del LCP.

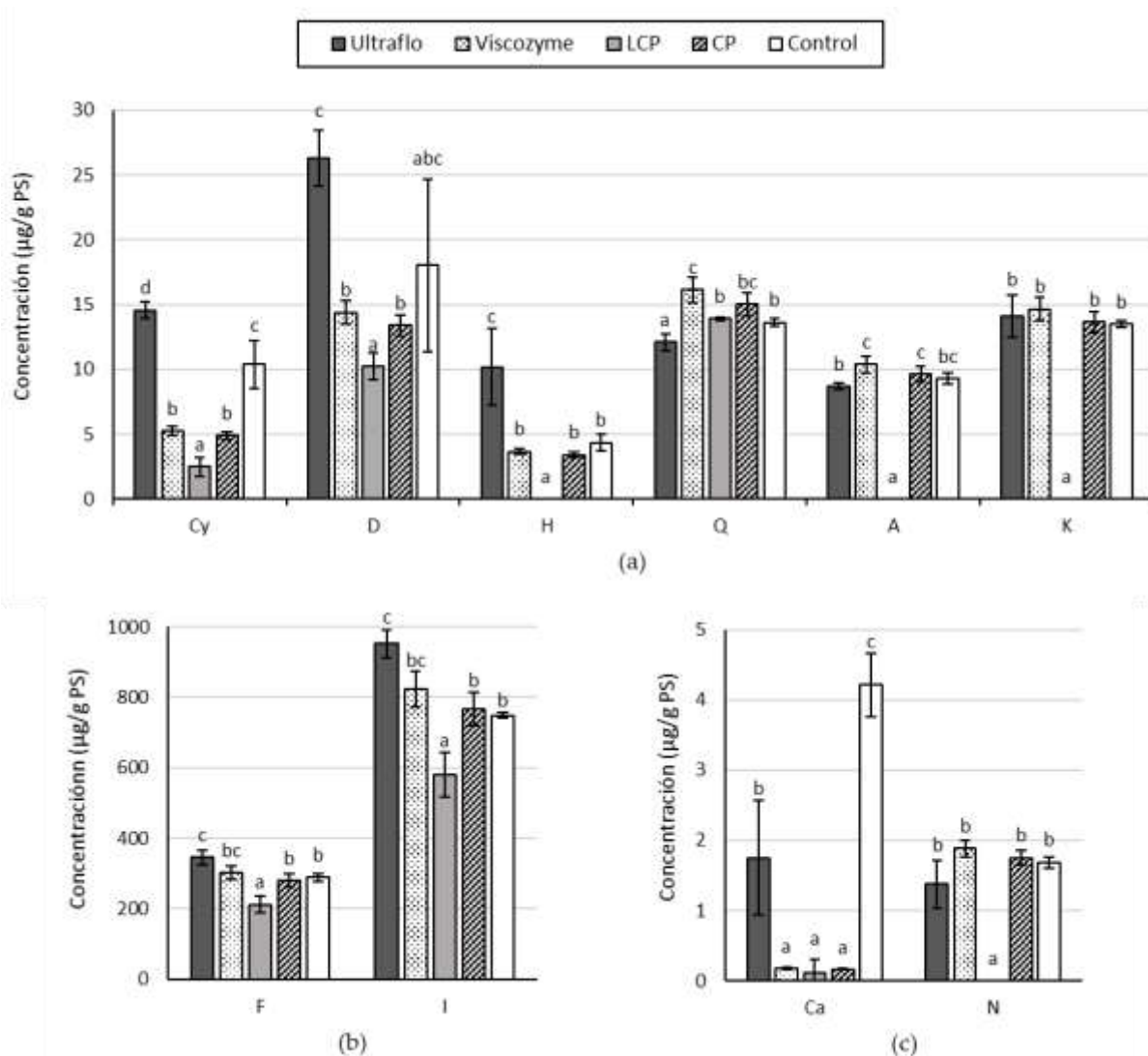


Figura 49. Concentración de flavonoides obtenidos por HPLC-UV (280 nm) en (µg/g PS) en extractos etanólicos del *guishe* hidrolizado utilizando dos mezclas enzimáticas comerciales (Ultraflo y Viscozyme), dos mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), y 0:1:2 (CP), y el tratamiento de control sin enzimas. a) cianidina (Cy), delphinidina (D), hesperidina (H), quercetina (Q), apigenina (A), y kaempferol (K), b) flavanona (F), isorhamnetina (I), y c) catequina (Ca), y naringenina (N). Letras diferentes indican una diferencia significativa (Kruskal-Wallis; n=3, p < 0.05).

7.2.2.3.5.2 Actividad antioxidante

Todos los factores probados para la hidrólisis enzimática tuvieron efecto significativo en la capacidad antioxidante (AA) de los extractos subsecuentemente obtenidos. La disminución de los niveles de pH influyó positivamente en la AA entre todos los tratamientos enzimáticos (Fig. 50.a). La temperatura no impactó la AA con el uso de mezclas formuladas, pero sí influyó cuando se usaron mix comerciales (Fig. 50.b). Por último, la AA se incrementó junto con el tiempo de incubación con excepción del tratamiento control (Fig. 50.c). En general, la

mayor AA se alcanzó con 2.5 h de hidrólisis enzimática a pH 4 y una temperatura de hasta 40°C utilizando Ultraflo (39.32 ± 5.07 %), seguido por Viscozyme (37.86 ± 6.39 %). Usando mix formulados, no se observó diferencia significativa y resultó en una AA de 31.13 ± 12.93 %I (LCP) y 32.43 ± 2.44 %I (CP). Además, el tratamiento con LCP y CP afectó significativamente la AA según las condiciones de control (30.59 ± 0.48 %) (Fig. 51).

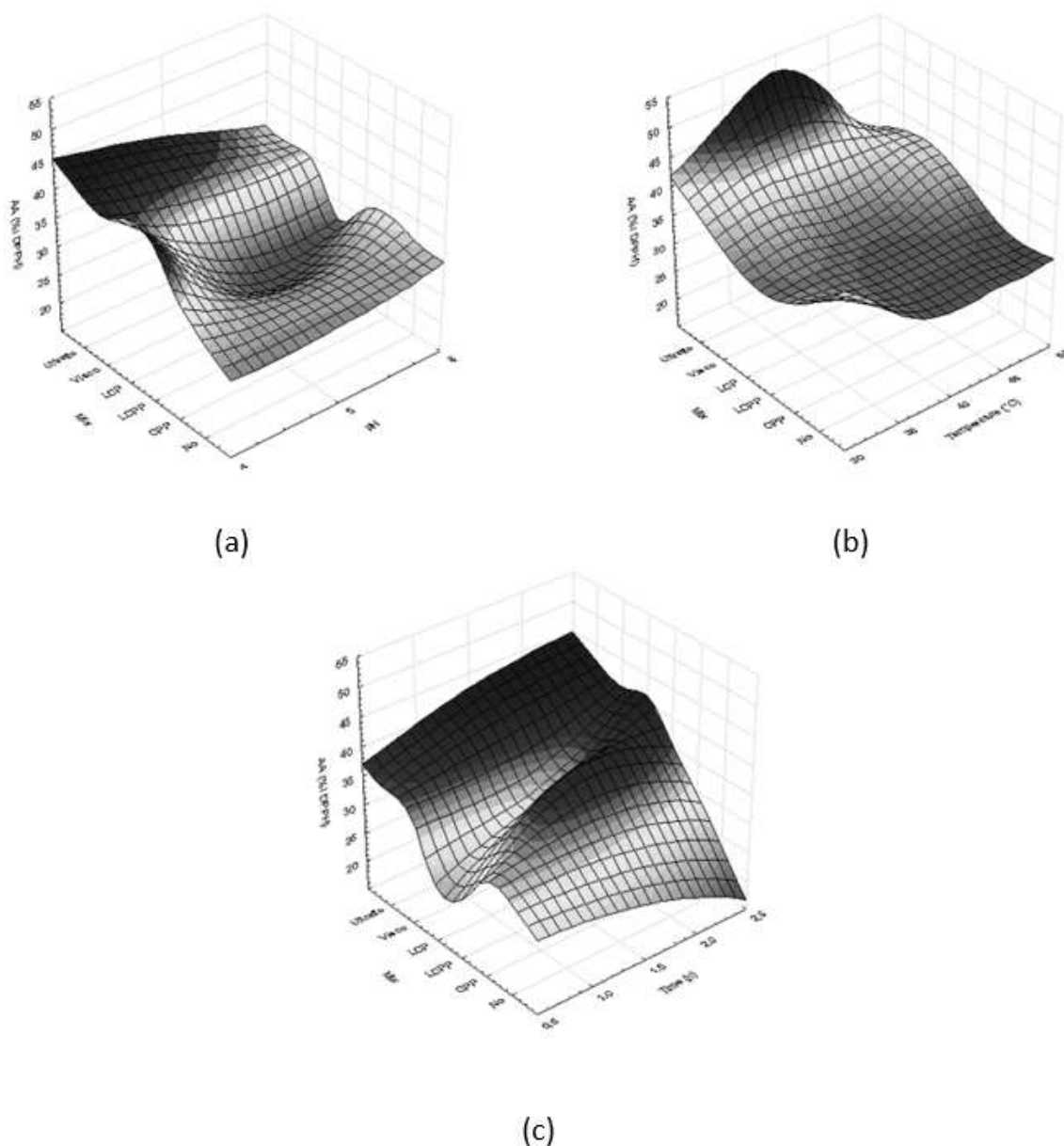


Figura 50. Superficie de respuesta de la capacidad de captación de radicales DPPH (AA, %I DPPH) en función de las diferentes mezclas enzimáticas y a) el pH (4-6), b) la temperatura (30-50°C), y c) el tiempo (0.5-2.5 h). En orden; dos mezclas comerciales: Viscozyme© (Visco) y Ultraflo© (Ultraflo); tres mezclas formuladas con lacasa, celulasa y pectinasa en proporción 1:1:1 (LCP), 1:1:2 (LCPP) y 0:1:2 (CPP); y el control sin enzimas (No). La escala de colores indica la significación del análisis de varianza (relación S/N) para el método Taguchi (n=3, p>0.05).

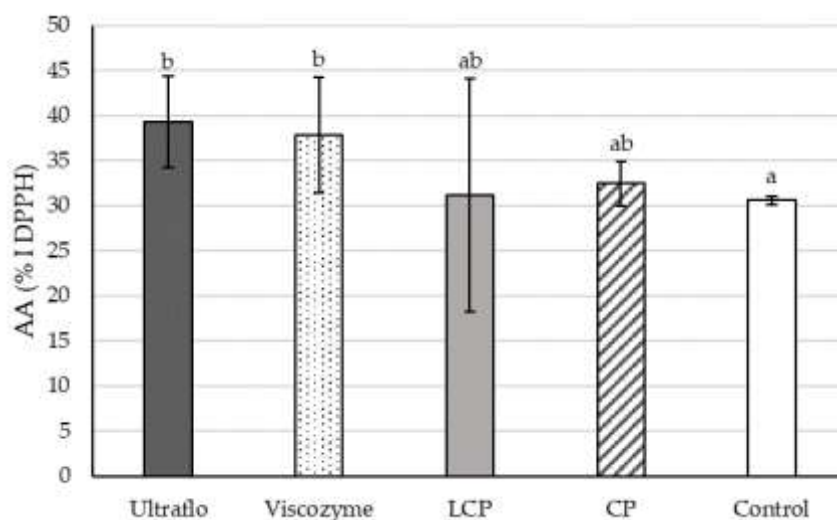


Figura 51. Actividad antioxidante en % de inhibición del reactivo DPPH de los extractos etanólicos según el mix enzimático. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA; n=12, p<0.05).

7.2.2.3.6 Validación experimental

Las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática hacia la recuperación fenólica fueron 2.5 h de incubación a 40°C en la oscuridad y 180 rpm utilizando la mezcla comercial Ultraflo a 2 µl/g de biomasa en un tampón fosfato (0.1 M) ajustado a pH 4.0. Estas condiciones se reprodujeron a mayor escala y se evaluaron las mismas variables de respuesta que las anteriores. Los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 21 presentaron rangos similares a lo obtenidos previamente durante la optimización. El rendimiento de extracción alcanzó el 35.53 ± 1.72 %, el TPC y el TFC resultaron en 16.81 ± 1.21 mg GAE/g PS y 7.06 ± 0.98 mg QE/g PS, y la AA aumentó hasta el 41.31% I DPPH. De los TFC, 12.24 % para el control y 11.17% para el hidrolizado está representado por los 10 flavonoides cuantificados. Las concentraciones de cianidina, delphinidina y hesperidina incrementaron significativamente. En contraste las concentraciones de flavanona, isorhamnetina y apigenina disminuyeron con el tratamiento enzimático.

Tabla 21. Rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC), actividad antioxidante (AA), y concentraciones específicas de flavonoides en extractos etanólicos obtenidos de *guishe* no hidrolizado e hidrolizado.

	No hidrolizado		Hidrolizado		
Rendimiento (% PS)	31.65	± 1.65	35.53	± 1.72	*
TPC (mg GAE/g PS)	12.81	± 0.73	15.06	± 1.21	*
TFC (mg QE/g PS)	6.41	± 1.22	7.06	± 0.98	
AA (%I DPPH)	35.59	± 2.68	41.31	± 2.14	*

Flavonoids (µg/g PS)					
Flavanona	194.120	± 5.180	147.238	± 5.390	*
Isorhamnetina	864.350	± 7.700	752.796	± 2.908	*
Catequina	3.340	± 1.600	4.377	± 0.500	
Cianidina	6.590	± 1.190	10.481	± 2.605	*
Delfinidina	10.880	± 0.990	21.549	± 3.794	*
Hesperidina	3.720	± 0.200	4.690	± 0.187	*
Quercetina	13.620	± 0.380	13.481	± 0.318	
Apigenina	8.240	± 0.600	3.252	± 0.608	*
Kaempferol	12.960	± 0.310	13.482	± 0.311	
Naringenina	1.500	± 0.110	1.682	± 0.111	

Nota: * Indica una diferencia significativa entre tratamientos (ANOVA; n=3, p<0.05).

7.2.2.4 Extracción de los flavonoides

7.2.2.4.1 Solvente de extracción

Los rendimientos de extracción, y los contenidos en fenoles y flavonoides totales no fueron diferentes entre los extractos metanólicos y etanólicos (Tabla 22). En contraste, la actividad antioxidante fue mayor con etanol que con metanol. Por otro lado, el perfil específico en flavonoides varió dependiendo del solvente de extracción. Las concentraciones de flavanona, isorhamnetina, catequina y hesperidina fueron más altas en la fracción metanólica, y concentraciones de naringenina mayor en la fracción etanólica. asimismo, las antocianinas (cianidina y delfinidina) solo se encontraron en los extractos etanólicos (Tabla 22).

Tabla 22. Rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC), actividad antioxidante (AA), y concentraciones específicas de flavonoides en los extractos metanólicos (MetOH) y etanólicos (EtOH) del *guishe* de *A. lechuguilla*.

Solvente	MetOH	EtOH	ANOVA
Rendimiento (%PS)	32.51 ± 4.07	30.33 ± 3.62	
TPC (mg GAE/g PS)	10.96 ± 0.98	12.01 ± 0.70	
TFC (mg QE/g PS)	4.80 ± 0.48	5.17 ± 0.59	
AA (% I DPPH)	32.25 ± 10.99	38.37 ± 5.45	*
Flavonoides (µg/g PS)			
Flavanona	254.20 ± 15.70	194.12 ± 10.36	*
Isorhamnetina	1027.57 ± 11.01	864.35 ± 5.40	*
Catequina	6.53 ± 1.90	3.34 ± 1.60	*
Cianidina	0	6.59 ± 1.19	
Delfinidina	0	10.88 ± 0.99	
Hesperidina	35.20 ± 5.49	3.72 ± 0.20	*
Quercetina	13.01 ± 0.75	13.62 ± 0.38	
Apigenina	7.15 ± 0.45	8.24 ± 0.60	
Kaempferol	12.41 ± 0.23	12.96 ± 0.31	
Naringenina	1.30 ± 0.08	1.50 ± 0.11	*

Nota: * Indica diferencia significativa (ANOVA; n=3, p<0.05)

7.2.2.4.2 Optimización de la extracción por fluidos supercríticos

7.2.2.4.2.1 Rendimientos de extracción

Para dirigir de manera específica la extracción por fluidos supercríticos, se considera las características físico-químicas de los flavonoides caracterizados en el *guishe* representado en la tabla 23. El diseño de experimento basado en el modelo de Box-Behnken se realizó para evaluar el efecto de la proporción de co-solvente (etanol/agua, 70/30, v/v, 5-15%), la temperatura (40-70°C) y la presión (150-350 bar), en la obtención de estos compuestos.

Tabla 23. Propiedades fisicoquímicas de los flavonoides del *guishe* de *A. lechuguilla*.

Propiedades fisicoquímicas (T= 298.15 K y p= 1 atm)	Temperatura de fusión (K)	Temperatura crítica (K)	Presión crítica (bar)	Volumen crítico (cm ³ /mol)	Capacidad calórica molar (J/(mol.K))	Entalpía (kJ/mol)
Flavanona	629.13	869.52	29.861	636.5	227.29	130.55
Isorhamnetina	812.17	1006.06	52.51	764.5	327.8	-557.93
Catequina	772.08	964.32	68.301	711.5	309.32	-509.37
Cianidina	808.42	992.87	75.483	729.5	324.52	-654.4
Delfinidina	843.26	1032.92	99.601	745.5	342.47	-809.02
Hesperidina	1136.92	1852.64	21.023	1464.5	668	-1409.43
Quercetina	823.35	1021.68	82.196	706.5	305.88	-606.34
Apigenina	737.53	957	56.617	671.5	273.06	-305.27
Kaempferol	788.52	987.27	63.796	690.5	287.93	-451.72
Naringenina	733.64	952.11	52.282	684.5	281.12	-333.31
Ramnósido	943.77	1174.55	39.209	1032.5	456.47	-872.35
Arabinósido	964.73	1222.28	36.589	998.5	443.36	-969.89

Xilósido	938.21	1165.25	44.862	985.5	436.04	-860.96
Glucósido	987.22	1267.14	44.15	1051.5	469.49	-1009.17
Diramnósido	1116.16	1732.28	24.654	1377.5	621.94	-1284.81
Diglucósido	1151	1857.71	29.218	1393.5	638.02	-1429.8
Ramnosil- glucósido	1159.62	2025.27	27.07	1396.5	634.95	-1421.63
Triósido	1409.19	15444.4	24.727	1773.5	832.59	-2124.07

Considerando las tres variables de manera independiente, el rendimiento de extracción es particularmente afectado por la proporción de co-solvente y la presión, mientras que la temperatura no influyó significativamente (Fig. 52).

Sin embargo, los resultados de análisis de superficie de respuesta revelaron un efecto combinado de la temperatura y el co-solvente (Fig. 53.a), la temperatura y la presión (Fig. 53.c), y de la presión y el co-solvente (Fig. 53.b) en los rendimientos de extracción. Finalmente, los rendimientos de extracción más altos se observaron con los niveles máximos de cada variable; 70°C, 350 bar y 15% de co-solvente.

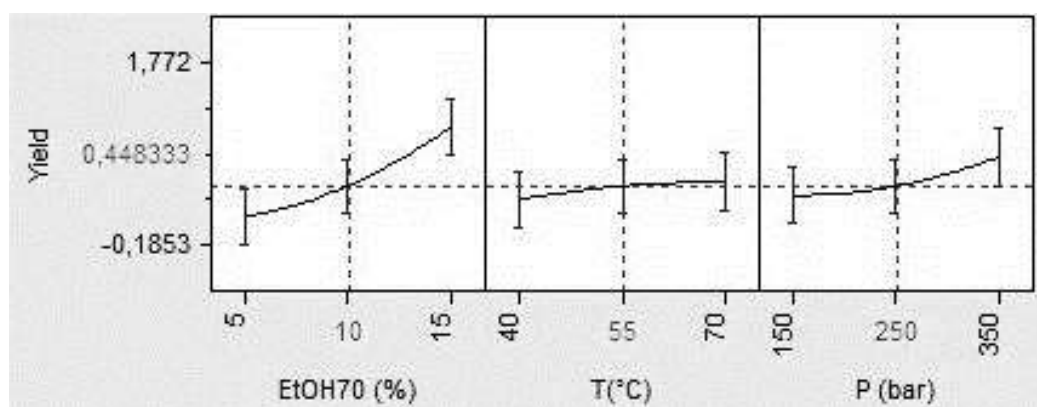


Figura 52. Predicción basada en el modelo de Box-Behnken de la influencia de cada variable en el rendimiento de extracción (% PS).

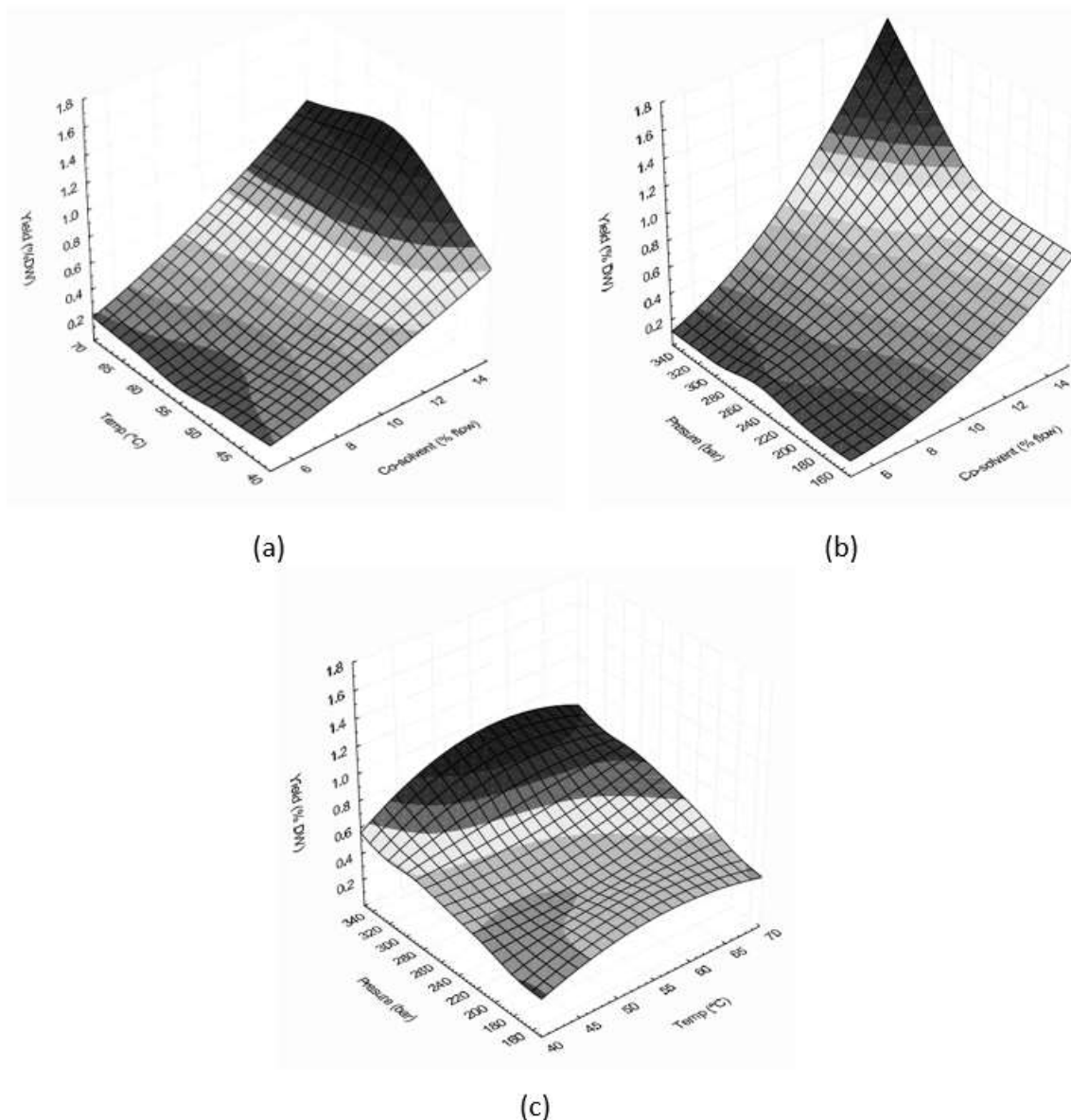


Figura 53. Superficie de respuesta del rendimiento de extracción (% PS) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken ($n=3$, $p<0.05$).

7.2.2.4.2.2 Contenidos en fenoles y flavonoides totales

Los resultados de TPC y TFC siguieron las mismas tendencias considerando el efecto individual de cada variable. El aumento de la proporción de co-solvente tiene un efecto positivo en la recuperación de los polifenoles del *guishe* hidrolizado. En contraste, la temperatura y presión presentaron mayor eficiencia para la extracción de estos compuestos con los niveles intermedios. Por otra parte, se observó un efecto combinado de la presión y temperatura con la proporción de co-solvente, mientras no se observó efecto combinado de la presión con la temperatura (Fig. 54 y 55).

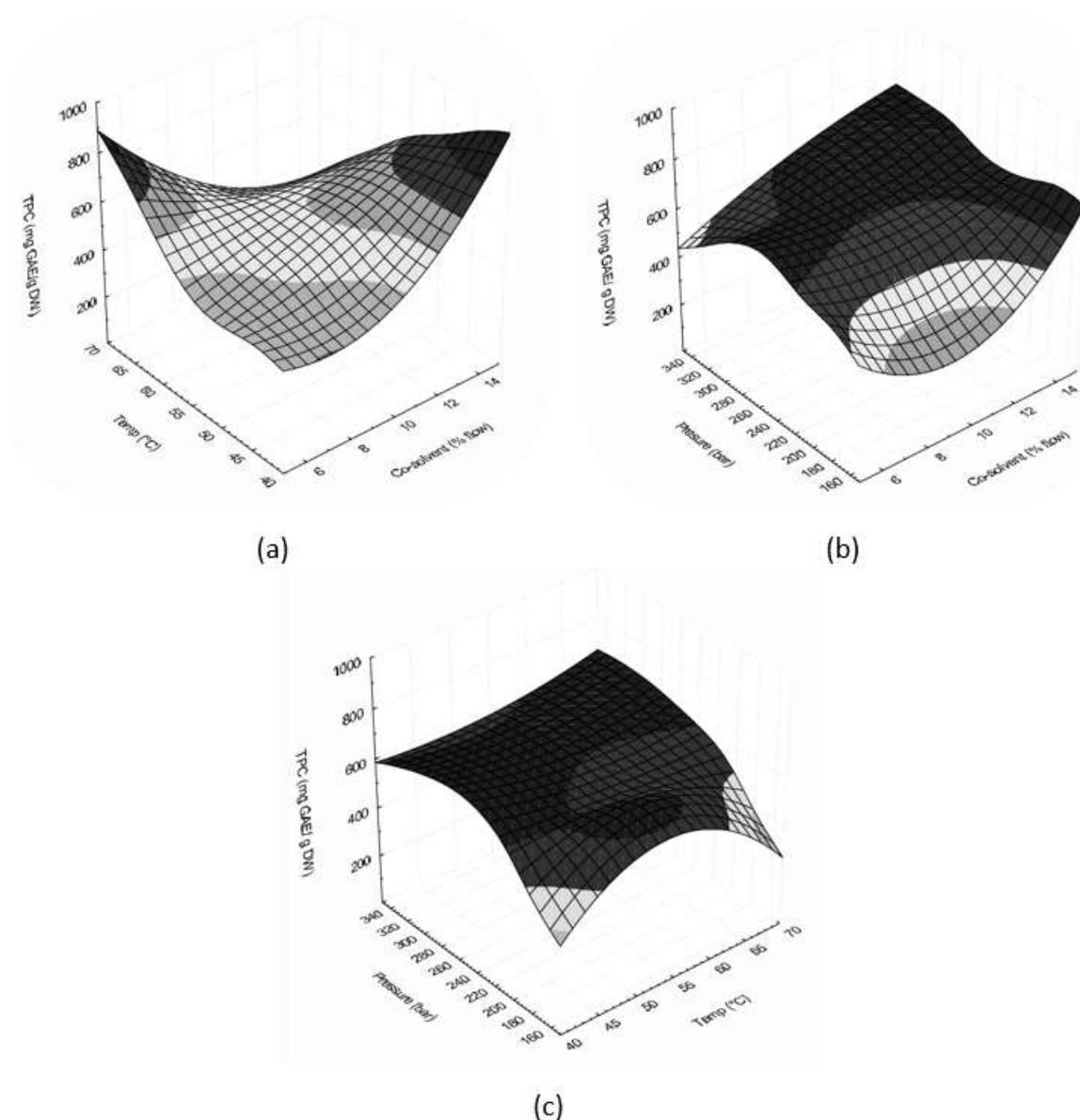


Figura 54. Superficie de respuesta del contenido en fenoles totales (TPC; mg GAE/g PS) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken ($n=3$, $p<0.05$).

Las concentraciones de TPC más altas se predijeron por un rango de presión de 200 a 300 bar, una temperatura de 40 a 70°C. En cuanto al co-solvente, su efecto está impactado por las dos otras variables, con una mayor recuperación de TPC para 5% de co-solvente con una temperatura de 70°C y una presión de 250 bar, para 10 % con 55°C y 250 bar, y para 15%, 40°C y 350 bar (Fig. 54). Asimismo, las mejores condiciones de extracción para la obtención de flavonoides se predijeron por 15% de co-solvente, 350 bar, 40°C, y 5%, 250 bar, 65°C (Fig. 55).

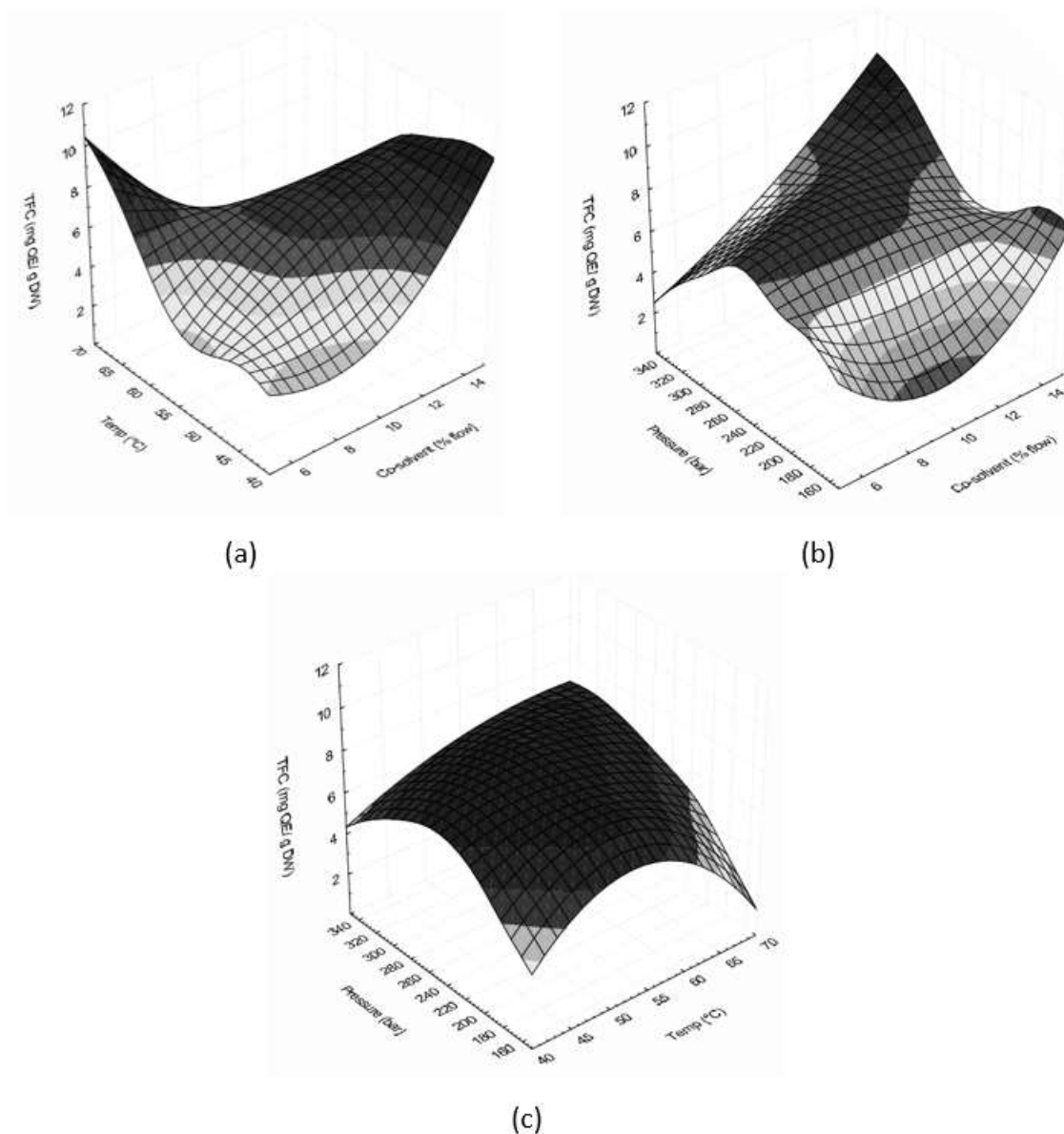


Figura 55. Superficie de respuesta del contenido en flavonoides totales (TFC; mg QE/g PS) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken ($n=3$, $p<0.05$).

7.2.2.4.2.3 Perfil específico en flavonoides

Con la reproducción de las condiciones de corridas de HPLC-UV en un equipo diferente, se observó un desfase en el perfil de flavonoides comparando los extractos obtenidos con extracción convencional y usando estándares analíticos (Tabla 24).

Los espectros de los tres puntos centrales aparecieron similares (Fig. 56). Para esta condición de extracción (55°C, 250 bar, 10% EtOH 70%), los compuestos mayoritarios son los

flavonoles como la quercetina, kaempferol, y miricetina. Con base en la identificación de los compuestos en los espectros, se usaron los datos de intensidad de la señal de los picos en los espectros (mUA) como índice de la abundancia relativa para poder evaluar el efecto de las variables explicativas en su extracción con fluidos supercríticos.

Tabla 24. Tiempo de retención (min) de los flavonoides en dos sistemas HPLC-UV diferentes.

Analytical standards	Varian	Agilent
Flavanone	14.7	
Isorhamnetin	16.2	
Catechin	23.1	10.1
Cyanidin	30.3	12.5
Delphinidin	34.1	12.6
Hesperidin	37.1	
Quercetin	44.2	30.64
Apigenin	46.8	
Kaempferol	48.3	35.1
Naringenin	51.5	

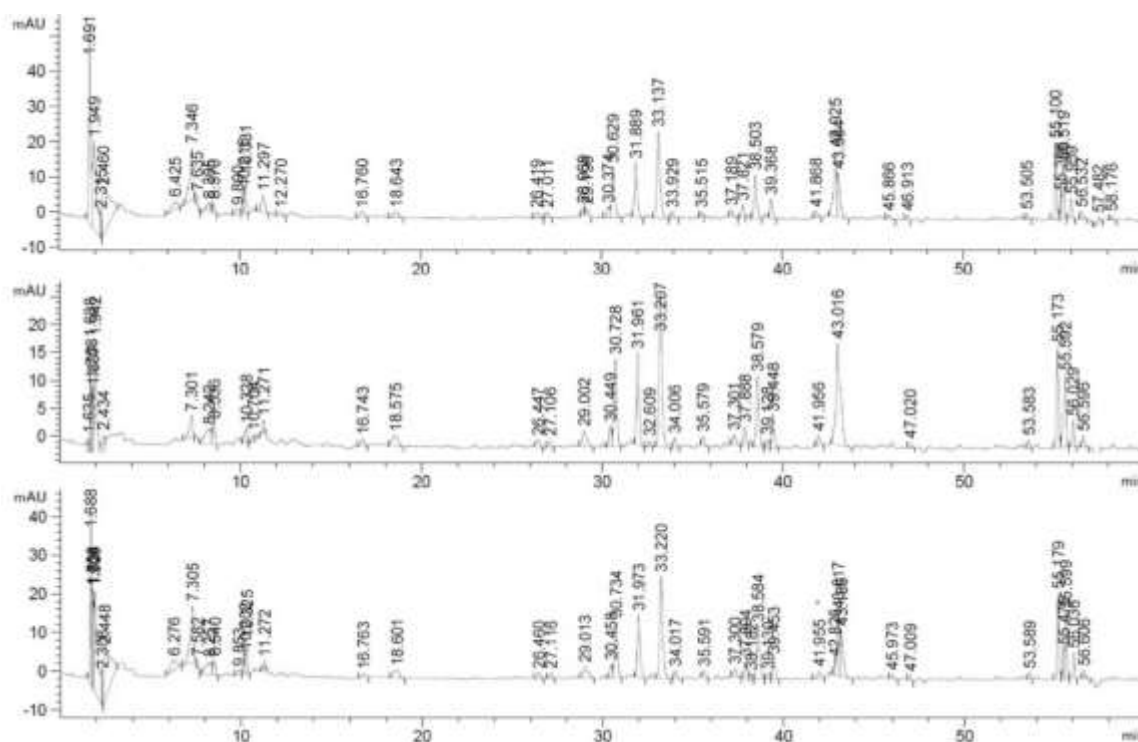


Figura 56. Espectros de HPLC-UV (280 nm) de los tres puntos centrales.

El análisis de superficie de respuesta reveló que un aumento de la proporción de co-solvente favorece la obtención de flavonoles, mientras que los puntos centrales de presión y temperatura son las condiciones más adecuadas (Fig. 57.a). Para la obtención de derivados glicosilados, una disminución de la proporción de co-solvente tiene un efecto positivo, y un incremento de la presión favorece su extracción (Fig. 57.b). En comparación, para las antocianinas, un incremento de la temperatura y de la proporción de co-solvente tiene un

efecto positivo mientras que una presión de 250 bar favorece su recuperación por SFE (Fig. 57.c).

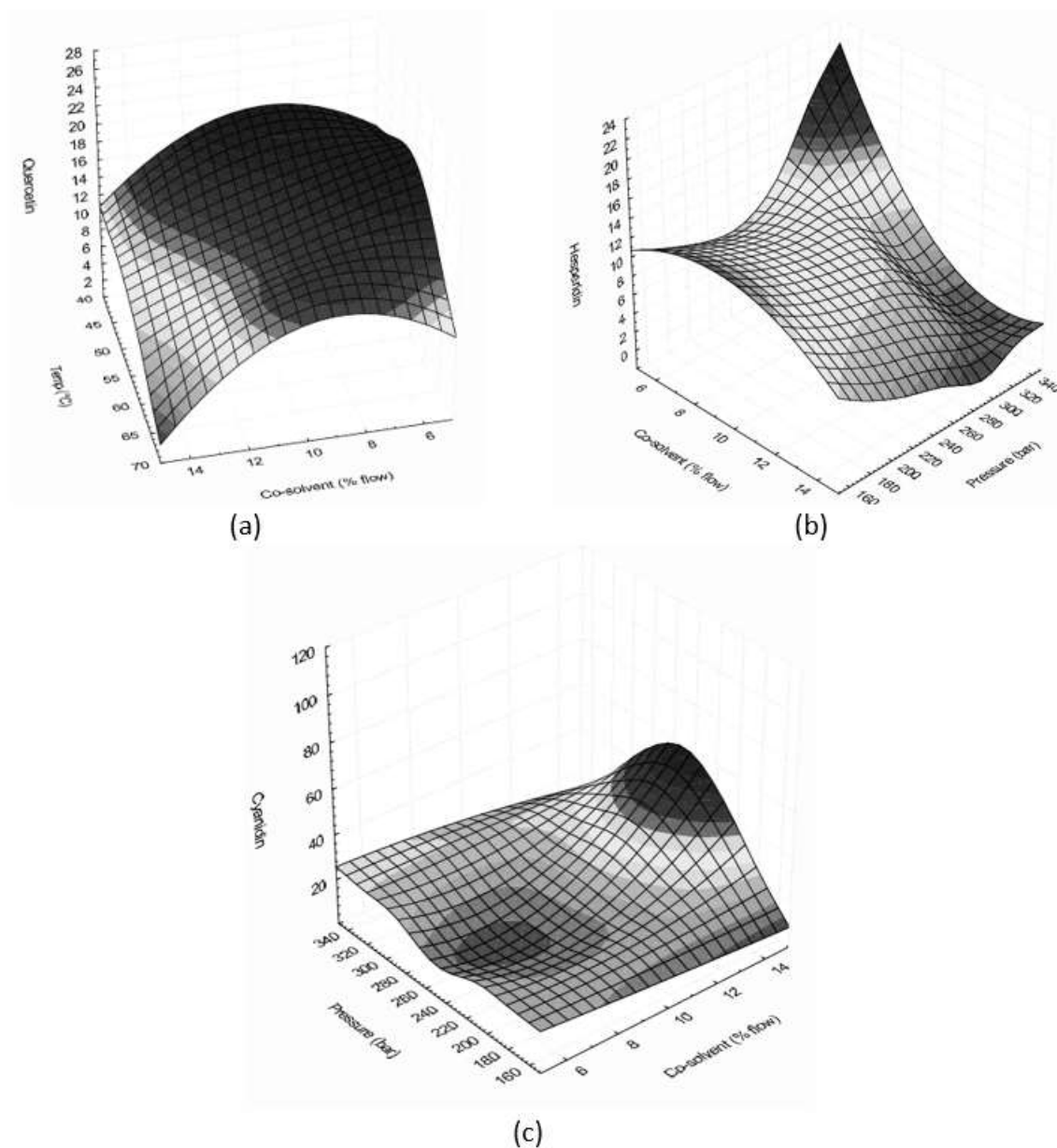


Figura 57. Superficie de respuesta de la abundancia relativa de a) quercetina, b) hesperidina y c) cianidina en función de la proporción de co-solvente y presión (a) o temperatura (b, y c). La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken ($n=3$, $p<0.05$).

7.2.2.4.3 Actividad antioxidante

La evaluación del potencial antioxidante de los extractos mostró que la proporción de co-solvente no tuvo efecto mientras que la temperatura tiene efecto negativo y la presión un efecto positivo en la actividad de los extractos (Fig. 58).

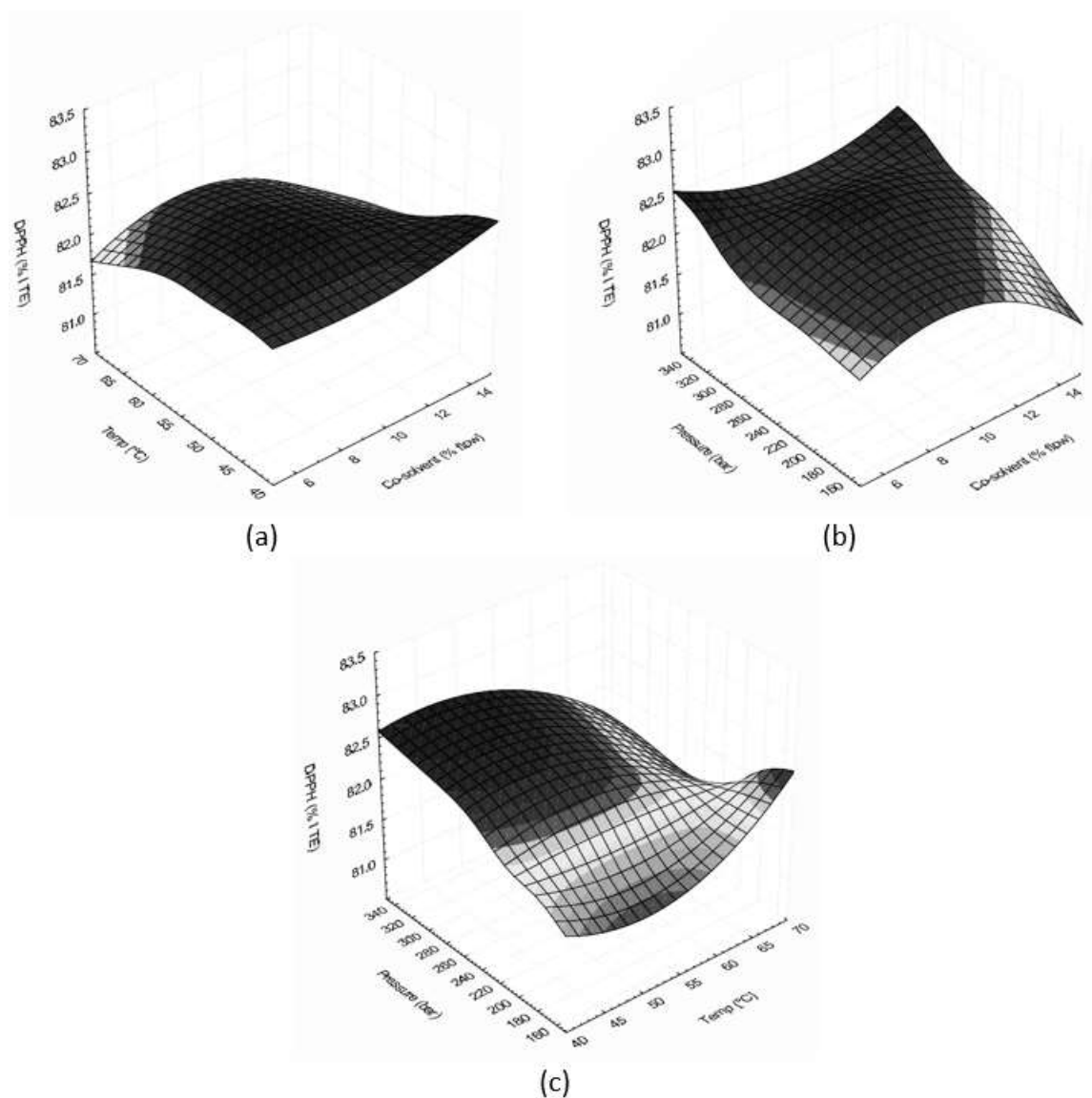


Figura 58. Superficie de respuesta de la capacidad antioxidante (% I DPPH) en función de a) temperatura y co-solvente, b) presión y co-solvente, y c) presión y temperatura. La escala de color indica significatividad del análisis de varianza para el modelo de Box-Behnken ($n=3$, $p<0.05$).

7.2.2.4.4 Validación experimental

Con base en los resultados de optimización, se propuso que las condiciones óptimas para la obtención de un extracto enriquecido en antocianinas con potencial bioactivo son 15% de co-solvente, 60°C y 250 bar.

Es análisis de HPLC-UV mostró un perfil con una mayor proporción relativa de las antocianinas (Fig. 59) y los flavonoles se encontraron en abundancias similares en comparación a los espectros de los puntos centrales previamente obtenidos (Fig. 56).

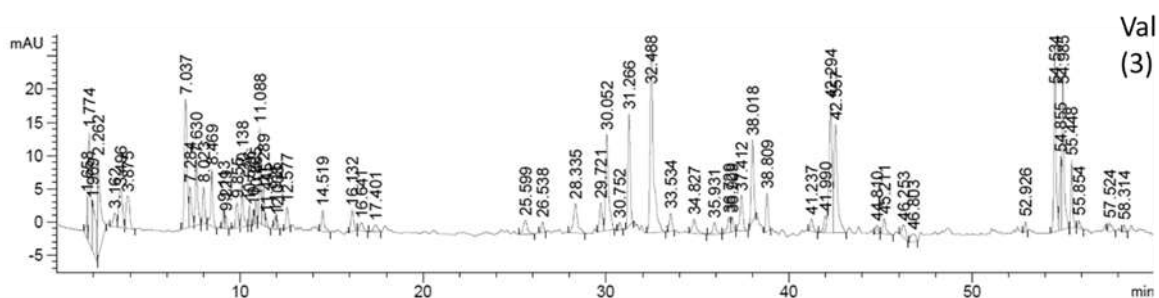


Figura 59. Espectro de HPLC-UV (280 nm) de los extractos obtenidos en la validación experimental de la extracción por fluidos supercríticos.

Comparando los resultados de extracción por fluidos supercríticos con la maceración y la extracción asistida por ultrasonido, se observó rendimientos inferiores con SFE. Sin embargo, el contenido en TPC y TFC, y el potencial antioxidante fue similar en los extractos purificados obtenidos por SFE que en los extractos obtenidos por maceración y UAE (Tabla 25).

Tabla 25. Rendimiento de extracción, contenido en fenoles totales (TPC) y flavonoides totales (TFC), actividad antioxidante (AA), obtenido por extracción por fluidos supercríticos (SFE), extracción asistida por ultrasonido (UAE) y extracción convencional (Conv) a partir de *guishe* hidrolizado.

	SFE	UAE		Conv
Rendimiento (% PS)	0.855 ± 0.047*	35.18 ± 2.69*	28.33 ± 4.26*	
TPC (mg GAE/g PS)	14.13 ± 2.01	15.05 ± 1.65		12.02 ± 3.24
TFC (mg QE/g PS)	6.11 ± 3.12	7.53 ± 1.81		6.14 ± 1.89
AA (% I DPPH)	39.32 ± 4.94	41.31 ± 2.14		40.12 ± 2.38
Flavonoides (µg/g PS)		Hidrolizado	No hidrolizado	
Antocianinas	44.31	32.03	17.47	
Flavonoles	38.99	34.59	38.16	
Glicósidos	712.78	757.49	868.07	
Total	796.08	824.11	923.7	

Nota:* Indica una diferencia significativa entre tratamientos (ANOVA; n=3, p<0.05).

Debido al desfase en los espectros de HPLC-UV (Tabla 24), a la hora no se pudo aplicar la regresión lineal con las curvas estándares para obtener una cuantificación precisa de los flavonoides. Sin embargo, se estimaron las concentraciones relativas de antocianinas, flavonoles, y flavonoides glicosilados en los extractos obtenidos por extracción por fluidos supercrítico (Tabla 25). Con base en esto, se pudo estimar la selectividad de la SFE hacia los flavonoides de interés. Considerando la fracción total de los flavonoides cuantificados en el *guishe* hidrolizado usando la extracción asistida por ultrasonido (0.97 mg), y la fracción de

los flavonoides estimada en los extractos SFE (0.70 mg), se obtuvo un rendimiento específico de 66.4 % (ecuación 4), un factor de enriquecimiento de 72.2% (ecuación 5). Asimismo, tomando en cuenta la cantidad de los flavonoides de interés, la extracción por fluidos supercríticos con las condiciones que favorecen la obtención de antocianinas dio una selectividad (ecuación 6) de 143% para antocianinas, 117% para flavonoles, y de 95% para flavonoides glicosilados. Aplicando las ecuaciones (ecuación 4-6) a las antocianinas, se obtuvo un rendimiento específico de 127.3% y un factor de enriquecimiento de 138.4% con la SFE en comparación a la UAE. La selectividad de la SFE hacía las antocianinas respecto a los flavonoles fue de 122.7% y respecto a los glicosilados, de 147.0%.

En comparación, tomando como referencia la cantidad de los flavonoides en el *guishe* no hidrolizado, el rendimiento específico de la SFE se estimó a un 58.5% (ecuación 4), el factor de enriquecimiento, a 63.6% (ecuación 5) y la selectividad a 294% para antocianinas, 119% para flavonoles, y a 97% para flavonoides glicosilados. Enfocado en las antocianinas, se estimó un enriquecimiento de 253.6% con un rendimiento específico de 233.34% de la SFE a partir de *guishe* hidrolizado en comparación a la UAE a partir de *guishe* no hidrolizado. Se espera confirmar la selectividad de la SFE con base en la cuantificación precisa de las antocianinas y de las demás subclases de los flavonoides identificados en del *guishe*.

7.3 Ficha técnica

Con base en la predicción *in silico* de las propiedades ADMET de cada molécula (ANEXO E), se estableció la siguiente ficha de características del extracto (Tabla 26).

Tabla 26. Ficha técnica del extracto para recomendación

Extracto enriquecido en flavonoides de <i>guishe</i> de <i>A. lechuguilla</i>
Presentación: polvo o líquido (etanol/agua, 70/30, v/v)
Composición: 89.5% flavonoides glicosilados (hesperidina (H), CAS: 520-26-3), 5.6% antocianinas (cianidina (Cy), CAS: 528-58-5; delphinidina (D), CAS: 528-53-0), 4.9% flavonoles agliconas (quercetina (Q), CAS: 117-39-5; kaempferol (K), CAS: 520-18-3; isorhamnetina (I), CAS: 480-19-3), flavonas (apigenina (A), CAS: 520-36-5), flavanoles (catequina (Ca), CAS: 7295-85-4), flavanonas (naringenina (N), CAS: 480-41-1).
Propiedades: inmunomoduladora, antiinflamatoria, antioxidante

Dosis eficaz:	IC50: 6.64 mg TE/g (DPPH)
Solubilidad en agua:	Soluble
Biodisponibilidad ¹ :	0.55 (agliconas), < 0.17 (glicosilados)
Adsorción gastrointestinal:	Alta (agliconas), baja (glicosilados)
Permeación cutánea (cm/s):	-5.8 (A), -7.82 (Ca), -7.51 (Cy), -7.86 (D), -10.12 (H), -6.9(I), -6.7 (K), -6.17 (N), -6.17 (Q)
Riesgo	Posible presencia de catecol ¹ si se degrada el extracto

Nota: ¹ Acido fenólico producto de la degradación de ciertos flavonoides que puede presentar toxicidad.

8 DISCUSION

8.1 Contenido en flavonoides del *guishe* de *A. lechuguilla*

8.1.1 Transcriptoma *de novo* de *A. lechuguilla*

La cantidad y calidad del ARN es primordial en el proceso de secuenciación. A partir del *guishe*, el ANR fue extraído en menor concentración e integridad, en comparación con la hoja, lo que se atribuyó al daño mecánico ocasionado por el proceso de tallado. Además, el ARN total extraído a partir de *guishe* presentó una $A_{260/280} < 1.8$ reflejando una contaminación por polifenoles, que interfieren en el proceso de extracción y favorecen la degradación del ARN (Han *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Con base en estas observaciones, se recomendó la extracción por método libre de fenoles (Valenzuela-Avenidaño *et al.*, 2005) para la preparación de las nuevas librerías de RNA-Seq de *guishe* proveniente de regiones diferentes, las cuales complementarán la información transcriptómica del *A. lechuguilla* para estudios futuros y permitirán obtener una nueva versión del transcriptoma *de novo* con mejores estadísticos.

El bajo número de loci codificantes obtenidos para *A. lechuguilla* en comparación con los transcriptomas reportados para *A. tequilana*, *A. deserti* (Gross *et al.*, 2013) y *A. salmiana* (Cervantes-Pérez *et al.*, 2018) se pueden explicar por los adaptadores que se encontraron en medio de las secuencias inducido por el proceso de secuenciación. La eliminación de estos adaptadores redujo de manera drástica el tamaño de una gran parte de las lecturas lo que influyó en el proceso de ensamblaje subsecuente. El tamaño reducido de las lecturas originó un alto número de *contigs* pequeños (N50 = 658), ya que los parámetros de ensamble consideran el porcentaje de cobertura entre las diferentes lecturas (Haas *et al.*, 2013). Este fenómeno sigue siendo un reto en los análisis de transcriptómica y genómica de especies con genomas largos especialmente con la secuenciación que generan lecturas cortas (Zhao *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2013). Otro parámetro que influyó en el tamaño de los *contigs* son los *k-mers* que tal como reportan Hoopes *et al.* (Hoopes *et al.*, 2018), el aumento de la longitud mejoró los estadísticos del ensamble. Con esto se obtuvo el transcriptoma con mayor N50, usando la longitud máxima autorizada por Trinity ($k = 31$ bp). Esto ocurre comúnmente en las plantas de genoma largo como los agaves (~4Gbp) (Rubluo *et al.*, 2003) debido al alto contenido en secuencias repetidas (Bousios *et al.*, 2007), y genes duplicados (McKain *et al.*, 2012). Por otro lado, el bajo número de loci codificantes y la distribución del tamaño de los transcritos influyó en la anotación con Uniprot, que presentó un *scaffold* debajo de los

tamaños de las secuencias disponibles en la base de datos, y resultó en porcentajes de anotación especialmente altos en comparación con lo obtenido por *A. tequilana* y *A. deserti* por ejemplo (Gross *et al.*, 2013). Aunque los genes de síntesis de los flavonoides están conservados en las plantas (Pollastri y Tattini, 2011; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019), el alto nivel de variación genética del *A. lechuguilla* (rango *He* 0.33–0.46) (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003), puede también explicar los bajos porcentajes de similitud obtenidos por algunas las secuencias anotadas. Esto sugiere una especificidad de los agaves en las rutas metabólicas de los compuestos.

Trabajos previos han reportado anotaciones de transcriptoma *de novo* con una distribución de tamaño de transcritos similares a lo obtenido para *A. lechuguilla*. Entre ellos, Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2016) obtuvieron un transcriptoma de 91,288 *contigs* con un N50 de 358 para la especie tropical *Phyllanthus emblica*. Además de identificar varios factores de regulación del metabolismo de los flavonoides, este estudio describió los mismos genes involucrado en la síntesis de los flavonoides e isoflavonoides que lo encontrado en la lechuguilla. Otro trabajo realizado por Xu *et al.* (2016) en transcriptómica, reportó que de los genes asociados a la producción de flavonoides en *Cyclocarya paliurus* Iljinska que se mapearon en KEGG fueron 42 en la biosíntesis de los flavonoides, 3, de las antocianinas, 3 de los flavonas y flavonoles, y 1 de los isoflavonoides. Lo que corrobora el patrón de mapeo que se obtuvo de los genes de flavonoides sobre expresados en el *guishe* en esa misma base de datos.

8.1.2 Expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial entre las librerías de *guishe* y hoja completa, generó más información cualitativa que cuantitativa ya que interfirieron varios sesgos de detección. El primero fue la adición de una librería de *guishe* en el ensamble lo que incrementó la abundancia de genes en el *guishe* en comparación con la hoja. Por otra parte, el uso de *pools* de ARN aumenta significativamente la abundancia de los transcritos en comparación a extractos individuales (Rajkumar *et al.*, 2015). Esto se vió reflejado en el importante número de genes sobre regulados en el *guishe* en comparación con los *pools* de hoja que incluyeron un menor número de individuos.

Sin embargo, por la relación con los factores de transcripción (TF) que juegan un papel primordial en la síntesis de bioactivos, se pudieron confirmar las observaciones en cuanto a

la regulación de los genes. Se encontraron varios TFs asociados a la biosíntesis de los flavonoides en el transcriptoma de *A. lechuguilla*, tales como: NAC, MYB, BHLH, MYC y *zinc fingers* dependientes. Estos factores favorecen la transcripción (GO:0045893) de genes específicos (GO:0043565; GO:0000981) actuando en la relajación del ADN (GO:0006351; GO:0045893; GO:0051090) y reclutando la RNA polimerasa II (GO:0006357; GO:0001135). La expresión de estos factores de regulación de la biosíntesis de los flavonoides está modulada por estrés ambiental (Jiang *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). Por otro lado, del enriquecimiento de ontologías de genes, se identificaron procesos de respuesta a la falta de agua (GO:0009269; GO:0009819), intensidad de la luz (GO:0009644; GO:009416), las radiaciones UV-B (GO:0010224), estrés osmótico (GO:0006970; GO:0009651) y estrés oxidativo (GO:0006979). Estas ontologías se compartieron entre el *guishe* y la hoja de *A. lechuguilla* y habían sido reportadas previamente en los agaves mencionados anteriormente (Gross *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2016; Cervantes-Pérez *et al.*, 2018). En el *guishe*, se encontraron ontologías específicas, como la respuesta a daños mecánicos (GO:0009611) o la respuesta de defensa contra bacterias (GO:0042742; GO:0009617) y hongos (GO:0002229; GO:0002239; GO:0009620). Por lo tanto, la observación de estas ontologías en los genes altamente expresados en el *guishe* en comparación con la hoja, indica que el proceso de tallado induce la síntesis de flavonoides de manera significativa. Esto se puede explicar por el daño mecánico aplicado a las células vegetales por lo que son más susceptibles al ataque por microorganismos presentes (Mithöfer y Maffei, 2017).

Adicionalmente, la síntesis de los flavonoides está regulada por las diferentes hormonas vegetales ya que varias de las enzimas encontradas son hormona-dependiente para las reacciones catalizadas. La hormona jasmonato, en condiciones de estrés biótico (GO:0009625) induce una cascada de señalización que incrementa la producción de antocianidinas (GO:200022) (Zhou *et al.*, 2017). De igual manera el ácido abscísico induce la síntesis de los flavonoides (GO:0009738) y la glicosilación (GO:0009737). Por otro lado, la producción de flavonoides también puede influir en las fitohormonas como en el caso de la auxina que es afectada de manera negativa (GO:0009733; GO:0010252) (Besseau *et al.*, 2007).

8.1.3 Los flavonoides en el *guishe*

Con base en los resultados de anotación funcional del transcriptoma *de novo* se propone un modelo del metabolismo de los flavonoides en *A. lechuguilla* (Fig. 24). Los datos de identificación y cuantificación por HPLC-UV-MS se relacionaron con los datos de transcriptómica y de expresión diferencial para concluir sobre el contenido en flavonoides del *guishe*.

Derivado del metabolismo primario se identificaron las enzimas de los dos orígenes metabólicos de la biosíntesis de los flavonoides. Primero, a partir de la ruta metabólica de la fenilpropanoide, la enzima fenilalanina amilasa liasa (PAL) cataliza la reacción de desaminación de la fenilalanina en cinamato. Posteriormente, la cinamoil 4-hidroxilasa (C4H) que hidroxila el cinamato en ácido *p*-cumárico antes de que la *p*-cumaroil CoA ligasa (C4L) agregara el grupo coenzima A. En el *A. lechuguilla* se encontró una ruta alternativa, con la intervención de la cinamoil-CoA reductasa (CCR) que agrega directamente el grupo coenzima-A. A partir de ambos sustratos, de manera independiente, las chalcona sintasas (CHS) producen las tetrahydroxichalconas con la agregación de tres moléculas de malonil-CoA. En estos primeros pasos se han caracterizado genes codificantes para enzimas como las policétido sintasas (PKS) descritas a partir de *Aloe arborescence* como isoformas de chalcona sintasa. El papel de las PKS en la síntesis de los flavonoides no está bien determinado (Mizuuchi *et al.*, 2009), sin embargo, su presencia manifiesta de la originalidad metabólica de plantas de desierto como las Aloe y Agaves. Otras vías de producción de chalconas se encontraron con la enzima bifuncional (F6H) que convierte el *p*-cumaroil-CoA en dihydroxicumaroil-CoA como inicio del proceso biosintético de los compuestos cumáricos (Matsumoto *et al.*, 2012), y la enzima shikímato *O*-hidroxicinamoiltransferasa (HCT) que usa el *p*-cumaroil-CoA como sustrato para transferir el shikímato mediante la acetilación del compuesto.

Posteriormente, las chalcona isomerasas (CFI o CHI) catalizan las tetrahydroxichalconas en chalconas tipo naringeninas ya con la estructura característica de los flavonoides (Fig. 24). La naringenina es el precursor de todos los demás flavanonas, flavonoles, flavonas, flavonoles, antocianinas, proantocianinas e isoflavonoides (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019). Los genes codificantes para estas enzimas de síntesis de la naringenina (*cluster 2*) se encontraron sobre expresados en el *guishe*. Lo que coincide con la presencia de factores de regulación de la

familia de los MYB (*cluster* 10) que favorecen la expresión de las CHS y CIF (Xu *et al.*, 2015). Además, la baja concentración de naringenina medida por HPLC-UV confirma la transformación de la naringenina en otros tipos de flavonoides validando el hecho de que la diversificación de la ruta metabólica de los flavonoides está regulada de manera positiva en el *guishe*. A partir de este paso ocurre la diversificación de la ruta metabólica de las seis diferentes clases de flavonoides dependiendo principalmente del estado de oxidación de los carbonos 2, 3 y 4 del heterociclo C y de las modificaciones secundarias en los anillos A y B (Taiz y Zeiger, 2003; Mierziak *et al.*, 2014; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019).

En la síntesis de antocianinas y de los flavonoles, interviene las flavanonas 3-hidroxisasas también llamadas naringenina 3-dioxigenasas (F3H) que producen los compuestos tipos dihidroflavonoles (Liu *et al.*, 2017). Las F3H son específicas a la hidroxilación de los grupos funcionales del anillo B y catabolizan la síntesis de kaempferol, quercetina y eridictiol a partir de la apigenina (Lam *et al.*, 2015). La sobre regulación del factor de transcripción MYB12, interfiere con los genes codificantes para los F3H y FLS estimulando la síntesis de flavonoles (Kumar *et al.*, 2016). La co-expresión de estos genes en el *guishe* como parte de los *clusters* 3 y 10, explica las bajas concentraciones de apigenina cuantificadas por HPLC en comparación a kaempferol y quercetina. Además, la presencia de compuestos tipos kaempferoles en el *guishe* es consistente con la identificación de los flavonoles en residuo de *A. sisalana* por HPLC-DAD (Santos *et al.*, 2015).

La ruta de biosíntesis más conservada en las plantas en cuanto a la naringenina es su transformación en dihidrokaempferol por la 3-hidroxisasa (F3H). El dihidrokaempferol se convierte en kaempferol por medio de las flavonoles sintasas (FLS). El kaempferol tiende a ser hidroxilado en la posición 6 antes de ser glicosilado, preferencialmente en la posición 3, por la flavonol 3-*O*-glucosiltransferasa (UGT o 3GT) produciendo el 6-hidroxi-kaempferol-3-*O*- β -glucósido. La 3GT puede usar el mismo producto para una segunda glicosilación resultando en el 6-hidroxi-kaempferol-3,6-di-*O*- β -D-glucósido (Fig. 24). Finalmente, por intervención de la flavonol-3-*O*-glucosida L-ramnosiltransferasa (URT), se produce el kaempferol-3-*O*-rutinoside. El kaempferol y sus derivados glicosilados se encontraron en abundancia en los extractos etanólicos y metanólicos obtenidos del *guishe*, lo que está directamente relacionado a la sobre regulación de estos genes en el subproducto y el alto

número de los genes identificados como parte del *cluster* 9. Estas observaciones son consistentes con lo reportado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Ali y McNear, 2014). Otra ruta de biosíntesis es la transformación del kaempferol en quercetina por hidroxilación en la posición 3' involucrando a las enzimas flavonoides 3'-hidroxilasas (F3'H). En otras plantas se ha reportado la misma actividad por parte de las flavonoides 3',5'-hidrolasas (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019) lo que corresponde al citocromo P450 (CYP75B4 y CYP75B3) encontrado en *A. lechuguilla*. De hecho, la homología de secuencia con el gene CYP75B4 descrito en el arroz (*Oryza sativa*) indica que esta enzima probablemente solo presenta actividad 3'-hidroxilasa y no tiene actividad 5'-hidroxilasa (Lam *et al.*, 2015). El mismo estudio de Lam *et al.* (2015) también demostró la acumulación de quercetina e isorhamnetina en los mutantes que presentaron un sobre expresión de la isoforma del gen de la enzima OMT. Esto corresponde a los resultados obtenidos de sobre regulación de los *cluster* 3 y 7 en el *guishe* y la alta concentración de isorhamnetina cuantificada por HPLC-UV. De hecho, las enzimas flavonoides *O*-metiltransferasas reconocen como sustratos a las flavonas, dihidroflavonas y flavonoles que tienen por lo menos dos grupos hidroxilos en el ciclo B. Es en estos grupos hidroxilos que se lleva a cabo la metilación de los compuestos. En el modelo metabólico establecido para el *guishe*, la isorhamnetina se está sintetizando a partir de la quercetina por agregación de un grupo metilo en posición 3' (Fig. 24). La isorhamnetina es conocida por su diversidad de derivados glicosídicos con propiedades terapéuticas (Antunes-Ricardo *et al.*, 2015). El proceso de glicosilación de la isorhamnetina es el mismo que se ha descrito para el kaempferol. La presencia de los derivados glicosilados se corrobora con la identificación por análisis de MS/MS mostrando una acumulación de estos compuestos en el *guishe*. Estos compuestos ya se habían reportado en agaves (Santos-Zea *et al.*, 2012; Ahumada-Santos *et al.*, 2013; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013b) y están en abundancia en otras suculentas como *Opuntia ficus indica* (Antunes-Ricardo *et al.*, 2015, 2017).

Siguiendo con las antocianinas, las dihidroflavonoles reductasas (DFR) producen las leucoantocianidinas, precursores de las antocianinas y proantocianidinas. La síntesis de antocianinas representada en las figura 24, ocurre en el citosol (Fig. 60) con las antocianidinas sintasas (ANS), incluyendo la leucoantocianidina oxidasa (LDOX), llevan a cabo la síntesis de antocianinas tales como la cianidina y delphinidina (Ma *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2020). Las DFR como productoras de

leucoantocianidinas (*cluster 3*) presentan una sobre expresión en el *guishe* ya que sus procesos de transcripción se encuentran regulados por el MYB12 (Ali y McNear, 2014). De igual manera, los TFs R2R3-MYB y BHLH regulan de manera positiva la síntesis de las antocianinas (Xu *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016; Arlotta *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Por otra parte, la ausencia de los factores de transcripción PAP confirma que no hay regulación negativa de la síntesis de las antocianinas en el *guishe* (Jiang *et al.*, 2013). Asimismo, el enriquecimiento de ontologías de genes de los transcritos sobre regulados en el *guishe* permitió identificar el proceso de síntesis de cianidinas (Fig. 23). Además, las enzimas involucradas en la síntesis de los derivados glicosilados, las glicosiltransferasas (3GT, ANGT, 2GT y URT), se encuentran sobre reguladas en el *guishe* como parte del *cluster 9*. Lo que se relaciona directamente con la presencia de las cianidinas y delfinidinas glicosiladas en el extracto etanólico con una abundancia relativa alta en comparación a las formas agliconas encontradas en menor concentración por HPLC cuantitativa. La intervención de la HCT en el proceso de acetilación de las antocianinas glicosiladas favorece la acumulación de los dichos compuestos en la vacuola. Por lo tanto, la gentiodelfinidina se caracterizó en los espectros de masas además de que su síntesis se había predicho por el mapeo en KEGG (Fig. 24). En contra parte, se ha mostrado que la sobre expresión de los genes de síntesis de esta enzima está asociada a una limitación de la producción de lignina y una represión del transporte de la fitohormona auxina (Besseau *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2019).

Por otro lado, las antocianinas reductasas (ANR) convierten la cianidina y delfinidina en flavanoles como la catequina (Li *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020a). Sin embargo, los genes codificantes para las ANR se encuentran sub-regulados en el *guishe* y los genes de las antocianinas sintasas sobre regulados, lo que se relacionó con la baja concentración de catequina y una concentración más alta de la cianidina y delfinidina en los extractos etanólicos. Adicionalmente, el análisis por MS/MS resultó en la detección de varias antocianinas glicosiladas con una abundancia relativamente alta.

Aunque que no se identificaron enzimas de los primeros pasos de la síntesis de isoflavonoides a partir de flavonoles y flavanonas, la sobre expresión, en el *guishe*, de genes de enzimas que llevando a cabo la deshidratación de las hidroxisoflavanonas para sintetizar daidzein y genistein (HID) indican la existencia de este proceso biosintético en el *A. lechuguilla*. Asimismo, la identificación de enzimas de 7-O- y C-glicosilación de las isoflavanos

evidencian la presencia de los derivados glicosilados (Wang *et al.*, 2017b; Nakayama *et al.*, 2019), mientras la isoflavonoide 7-O- β -apiosil-glucósido β -glucosidasa tiende a quitar las fracciones di-glucosídica de las isoflavonas di-glicosiladas (Chuankhayan *et al.*, 2005). Otra enzima que interviene en esa rama de los flavonoides, la vestigiosa reductasa, que sugiere la presencia de isoflavonas metiladas (Guo *et al.*, 1994). No se han encontrado isoflavonoides por HPLC-MS ya que se necesitan procesos de purificación drásticos y una columna RP-C18 para permitir una buena detección de estos compuestos (Gampe *et al.*, 2016).

La mayoría de los compuestos previamente descritos se van acumulando en la vacuola por medio de vesículas secretadas por el aparato de Golgi (GO:1903415; GO:0016192) (Fig.60). Este proceso se encuentra regulado, tal como se describe para *A. taliana* (Ichino *et al.*, 2014; Ali y McNear, 2014). Por otra parte, la presencia de la enzima flavonoide sulfotransferasa (SOT) sugiere que los flavonoides presentes en el citosol se encuentran en forma sulfatada. Las sulfato transferasas identificadas en *el A. lechuguilla* presentan actividad de sulfatación preferencialmente en posición 3 de los flavonoides agliconas o 7-O-glicosilados. Los flavonoides 3-sulfatados y 3-O-glicosilados pueden ser catalizados para transferencia de un grupo sulfato en posición 3' y 4' (Gidda y Varin, 2006). Esta enzima puede usar como sustrato kaempferol 3-sulfato, isorhamnetina kaempferol, quercetina y apigenina en orden de preferencia (Gidda y Varin, 2006). El amplio espectro de sustratos de estas enzimas sugiere la presencia de formas sulfatadas tanto de los flavonoides agliconas que glicosiladas, los cuales presentan interés en cuanto a aplicaciones en medicina (Teles *et al.*, 2018). Estos compuestos no se caracterizaron por HPLC-MS debido a que los métodos de detección no eran adecuados según el trabajo recién publicado de Kleinenkuhnen *et al.* (2019) quienes adaptaron el método de HPLC-MS de manera específica a los flavonoides sulfatados.

La correlación entre transcritos, abundancia proteica y concentración en metabolitos se observó anteriormente en *A. americana* para los genes involucrados en el metabolismo CAM (Abraham *et al.*, 2016). Enfocado en los flavonoides, estudios realizados en otras plantas corroboraron la relación entre número de genes codificante para enzimas de biosíntesis y la observación de los compuestos por HPLC-MS (Jiang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017). Estos antecedentes, soportan lo encontrado en *el A. lechuguilla* en cuanto a la relación entre los perfiles de expresión de los diferentes *clusters* de genes y la identificación y cuantificación de los flavonoides.

Por ende, se pueden enlistar los siguientes flavonoides agliconas: kaempferol, quercetina, miricetina, cianidina y delfinidina. Los flavonoles metilados como la quercetina 8-*O*-metiltransferasa y la isorhamnetina. Los de derivados de flavonoles *O*- β -D-glicósidos, 3-*O*-glicósidos, 7-*O*-glicósidos y derivados rutinósidos. Las antocianinas 3-*O*-mono-, di- y tri-glicósidos, isoflavonas 3-*O*-glicósidos, 7-*O*-glicósidos y C-glicósidos, todos con una mayor presencia, en orden, de glucosa, galactosa, ramnosa y xilosa. La antocianina acetilada, gentiodelfinidina, y por terminar las formas sulfatadas. Todos estos flavonoides están presentes en abundancia en el *guishe* de tal manera que se sugiere el potencial de valorización del *guishe* por su contenido en flavonoides.

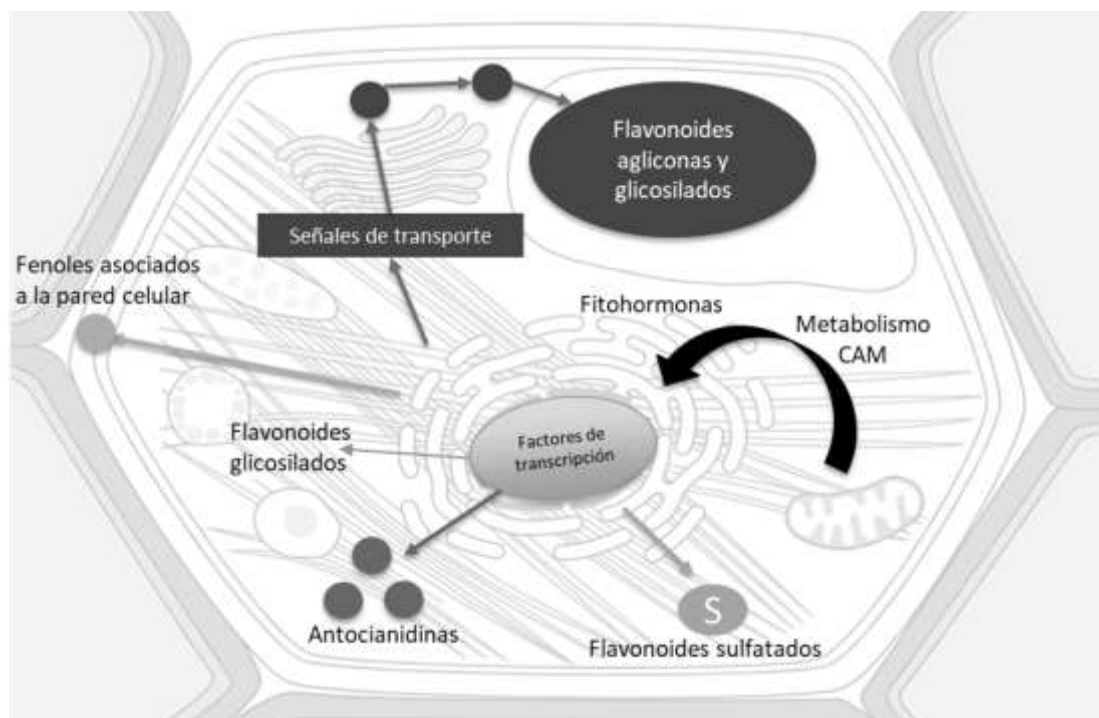


Figura 60. Metabolismo celular de la síntesis y acumulación de los flavonoides en el *guishe* de *A. lechuguilla*.

8.2 Propiedades biológicas

La diversidad estructural de los flavonoides encontrados en el *guishe* sugiere una amplia gama de actividades biológicas. Algunas de las propiedades biológicas de los flavonoides de Agaves se han reportado en estudios anteriores (Tabla 1), y la capacidad bioactiva de los flavonoides, sin importar su fuente, se ha establecido de manera siempre más precisa (Wang *et al.*, 2018).

Las propiedades de preservación de la integridad celular de los flavonoides del *guishe*, en particular las formas agliconas, está sugerido por la predicción de interacción con proteínas blanco tales como la transcriptasa inversa de la telomerasa (Haendeler *et al.*, 2004), los transportes electroquímicos, los factores de crecimiento, los factores de transcripción, las ADN topoisomerasas, y la interacción con enzimas *erasers* involucradas en procesos de epigenética. También se predijo la interacción de los flavonoides agliconas con proteínas del metabolismo lipídico como la frutosa-2,6-bifosfatasa, los citocromos p450, la escualeno monoxigenasa, la colesterol acetiltransferasa, las aldo-keto reductasas, las fosfolipasas y fosfoestaras.

De igual manera, todas las formas agliconas, las antocianinas glicosiladas, y algunos flavonoles glicosilados mostraron potencial de interacción con 13 liasas, todas carbónico anhidrasas, las cuales están involucradas en la homeostasis del plasma, regulación del pH y sistema secretoria. También se identificaron por estar involucradas en enfermedades como retinitis pigmentosas (Yang *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2007), la hipercloridrosis (Feldshtein *et al.*, 2010), osteoporosis (Shah *et al.*, 2004), y el cáncer del útero (Hilvo *et al.*, 2008). Con base en la capacidad de los flavonoides en pasar las barreras del epitelio gastrointestinal o la barrera sangre-sistema nervioso, y entonces llegar a los diferentes órganos, pueden interactuar con la diferente carbónica anhidrasa que se expresan de manera específica según los órganos. Otras enzimas quinasas resultaron blanco de los flavonoides del *guishe*, de las cuales se destacan 12 proteínas involucradas en la homeostasis de la insulina, y relacionadas con la resistencia a la insulina y la diabetes de las cuales dos receptores a la insulina, las serina/treonina-proteína quinasas, las tirosina-proteína quinasas, y la glicógeno sintasa (Pucelik *et al.*, 2021). De los flavonoides identificados, solo las formas agliconas y los flavonoides que presentan un grupo galato presentaron probabilidad de interacción con estas enzimas. Asimismo, Ackeifi *et al.* (2020) reportan el acoplamiento de epicatequina-galato con quinasas y lo proponen como medicina para regeneración de las células β en caso de diabetes de tipo I.

Como parte del metabolismo lipídico, se identificaron las lipogénasas que están involucradas en el sistema cardiovascular, y su disfuncionamiento pueden generar enfermedad coronaria (Assimes *et al.*, 2008). Se observó que flavonoles identificados en el *guishe* tienen mayor probabilidad de interacción con estas enzimas, mientras que las flavanonas presentaron baja

probabilidad de acoplamiento, y ningún derivado glicosilado presentó potencial interacción. En contraste, para los factores de tejido (TF por su sigla en inglés), el factor de coagulación; lo cual es clave para desencadenar la reacción de coagulación (Bogdanov *et al.*, 2003); y el TNF- α ; involucrado en la regulación del epitelio vascular entre otros mecanismos (Rizza *et al.*, 2011), solo la naringenina y la epicatequina-galato (flavanonas) presentaron potencial de interacción. Esto concuerda con las propiedades vasoprotectoras de las flavanonas desglicosiladas y de la epigallocatequina-galato reportado en relación con su interacción con el TNF- α (Rizza *et al.*, 2011). Por otro lado, los flavonoides glicosídicos presentaron alta probabilidad de acoplamiento con la trombina involucrada en la homeostasis de la sangre (Negrier *et al.*, 2019), y como mediador de la respuesta inmune por activación de la interleucina-1 α (Burzynski *et al.*, 2019).

Las citoquinas TNF (tumor necrosis factor por su sigla en inglés) son considerados como los mediadores más importantes del proceso de apoptosis e inflamación, y están involucrados en la inducción de procesos patogénicos de varias enfermedades como la diabetes, el cáncer, la osteoporosis, la esclerosis múltiple, la sepsis, la artritis reumatoide (Gutiérrez Nava *et al.*, 2017; Wajant y Siegmund, 2019). Estos mecanismos celulares involucrados en estas enfermedades se activan por interacción de los TNFs con receptores membranales, en particular el receptor 1 (TNF-R1), lo que desencadena las cascadas de señalización (Wajant, 2002; Wajant y Siegmund, 2019). Por lo tanto, además de la predicción de acoplamiento de algunos flavonoides con los TNF, se evaluó el potencial de los flavonoides del *guishe* como *ligand* del TNF-R1. La modelización *in silico* de acoplamiento reveló un alto potencial de interacción polares, no-polares y de formación de puentes de hidrógeno con este receptor, sugiriendo su potencial inmunomodulador y anticáncer (Figura 27-29). Los grupos hidroxilos, tanto de las formas agliconas que de los residuos glicosídicos fueron claves para la formación de puentes de hidrogeno con el TNF-R1. Asimismo, la presencia de grupos metilos y la posición de los dobles enlaces de los ciclos aromáticos influyeron en la dinámica molecular de los flavonoides impactando el perfil de acoplamiento. Eso explica la diferencia de interacción según la subclase de flavonoide (Wang *et al.*, 2018). Además, la presencia de residuos glicósidos en la estructura del compuesto modula su superficie electrónica lo que resultó en interacciones polares en sitios distintos a las formas agliconas. Por eso mismo, se observaron puentes de hidrógeno con amino ácidos distintos entre los agliconas y los glicosilados. Los resultados de acoplamiento con este receptor sugiere el potencial

terapéutico, lo cual podría ser potencializado por la sinergia de la mezcla de flavonoides identificados en los extractos de *guishe*. El efecto sinérgico de los extractos hoja completa de la lechuguilla se había sugerido previamente con el estudio de interacción de tres flavonoides con el TNF-R1 y otras proteínas involucradas en el desarrollo de cáncer (Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018). Por otro lado, el análisis de búsqueda de potencial interacción entre los flavonoides del *guishe* y proteínas blanco reveló que los flavonoles y antocianinas del *guishe* tienen efecto inhibitor en la enzima glioxalasa I, la cual está involucrada en procesos de apoptosis en el desarrollo de células cancerígenas. Asimismo, una serina/treonina-proteína quinasa distinta, la Aurora B, se identificó como blanco de todos los flavonoides, tanto agliconas como mono-, di- y tri-glicosilados, cuya enzima está involucrada en procesos de desarrollo de diversos cáncer cuando su expresión se encuentra desregulada (Portella *et al.*, 2011).

Del sistema inmune, se identificaron las interleucinas-2 y 8 como blanco de los flavonoides del *guishe*. Los flavonoles y antocianinas agliconas y los derivados glicosilados tienen mayor potencial de interacción con la interleucina-2, mientras las flavonas, flavonoles, y flavonol tienen mayor probabilidad de interactuar con el receptor A de la interleucina-8. Por otro lado, nueve metaloproteinasas presentaron probabilidad de interacción, principalmente con las formas agliconas. Estas proteínas están involucradas en diversos procesos de los cuales se reportan la reparación de tejidos, la respuesta neuro inflamatoria, la vasoconstricción, la ruptura de placas de aterosclerosis, mientras su disfunción está relacionada con varias enfermedades del sistema nervioso y circulatorio (Takino *et al.*, 2003). Otras enzimas reconocidas por estar involucradas en la respuesta inflamatoria son las fosfolipasas, en particular las fosfolipasas A2 secretorias, identificadas en varias rutas metabólicas desde la síntesis de fosfolípidos hasta la inflamación aguda asociada a enfermedades inmuno-metabólicas y al síndrome de dificultad respiratoria aguda (Schilke *et al.*, 2020; Kuypers *et al.*, 2021). Varios candidatos bioactivos que tienen como blanco específico estas PLA2 se han probado en fase clínica, sin embargo, ninguno ha llegado al mercado todavía (Batsika *et al.*, 2021). De los flavonoides del *guishe*, se predijo la interacción de los flavonoles con la fosfolipasa A2 de grupo 1B, mientras que las flavanonas y flavanoles tienen mayor probabilidad de interacción con las fosfolipasas A2 del grupo IIA, V, y X (Fig. 26). Por la predicción de acoplamiento realizado con una fosfolipasa A2 de secreción, se observó que todos los flavonoides de *guishe* presentaron varios sitios de acoplamiento con la proteína. Al

igual que para el TNF-R1, se evidenció la influencia de las características físico químicas de las diversas subclases de flavonoides en las interacciones polares y por puentes de hidrogeno (Fig. 30-31). Asimismo, Santos-Zea *et al.* (Santos-Zea *et al.*, 2012) relacionaron la actividad inmunomoduladora e antiinflamatoria de los flavonoides de agaves con la presencia de grupos metilos e hidroxilos. Además, se observó que el número, más que la naturaleza, de los residuos glicosídicos ligado al flavonoide modula su potencial de interacción y en particular la formación de puentes de hidrógeno. El impacto del número y posición de los residuos glicosídicos en la actividad antiinflamatoria *in vivo* se describió previamente para la isorhamnetina (Antunes-Ricardo *et al.*, 2015). Por otro lado, la presencia de grupos acétilos y galatos favoreció las interacciones con proteínas de respuesta a patógenos. De igual manera, Khalifa *et al.* (Khalifa *et al.*, 2020) atribuyeron el potencial antiviral a los grupos acétilos de la gentiodelfinidina.

Con base en lo anterior, se confirma el potencial inmunomodulador y antiinflamatorio de los flavonoides de *guishe*, resaltando que pueden actuar por diferentes vías en los procesos fisiológicos. Esto es consistente con el hecho que un flavonoide puede tener una diversidad de gran actividades biológicas (Wang *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2020). Por otro lado, se reafirma el potencial efecto sinérgico de la mezcla de flavonoides identificados en los extractos, al igual que lo previamente reportado de extractos de agaves (Rizwan *et al.*, 2012; Santos-Zea *et al.*, 2012; Ahumada-Santos *et al.*, 2013; Karamova *et al.*, 2016; Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018).

Como indicador de la bioactividad de los extractos del *guishe*, los resultados de actividad antioxidante *in vitro*, y en particular el estudio cinético de la capacidad antioxidante sugiere una actividad continua de los flavonoides identificados en los extractos etanólicos. La AA más alta obtenida a partir de extractos de *guishe* es de 60% I DPPH, mientras que, en otro estudio de la lechuguilla, se reportó una AA de 90% I con prueba ORAC (Carmona *et al.*, 2017). Esto refleja la necesidad de evaluar las propiedades antioxidantes del extracto enriquecido en flavonoides por medio de una diversidad de pruebas debido al amplio rango de mecanismos de acción tales como la quelación de ROS metálicos (Kejík *et al.*, 2021), y sus interacciones con enzimas oxidativas o de detoxificación celular (Khan *et al.*, 2021), por ejemplo. Por otro lado, otros compuestos potencialmente co-extraídos como las saponinas y los azúcares libres son conocidos por tener potencial antioxidante por lo que pueden

interferir con la prueba de DPPH (Ahumada-Santos *et al.*, 2013; Puente-Garza *et al.*, 2017b). Sin embargo, es una herramienta valiosa como indicadora del potencial bioactivo de los extractos, por lo tanto, se considera una prueba rápida y cualitativa para evaluar la preservación de la integridad de los flavonoides a lo largo del procesamiento, pretratamiento y procesos de extracción para establecer las condiciones adecuadas para la obtención de los flavonoides bioactivos a partir del *guishe* para poder proponerlos como productos naturales de alta calidad.

8.3 Obtención de flavonoides del *guishe*

8.3.1 Aprovechamiento a nivel regional y manejo agronómico

La caracterización físico química de los flavonoides en el *Agave lechuguilla* y el *guishe* sugiere su potencial de uso como materia prima renovable para la obtención de productos derivados de alto valor agregado para el desarrollo de biorrefinería, así como soportar el desarrollo de cultivos comerciales para su aprovechamiento.

Las condiciones ambientales silvestres y el manejo agronómico, han sido estudiados previamente por su influencia en la obtención de biomasa (Nobel, 1991; Burciaga *et al.*, 2011), regeneración del cogollo (Narcia Velasco *et al.*, 2012) y su efecto en la calidad de la fibra (Castillo Quiroz *et al.*, 2013). Por ejemplo, con base en estos trabajos, se identificaron 1,359,000 ha para el establecimiento de plantaciones de lechuguilla en el estado de Coahuila (Castillo-Quiroz *et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha considerado el efecto de las condiciones ambientales o del manejo agronómico en el contenido en fitoquímicos del *guishe*.

En este sentido, considerando los estados más productivos de *ixtle*; San Luis Potosí (107,191 ton/año) y Coahuila (44,879 ton/año) (SAGARPA, 2009); se realizó un estudio comparativo del perfil en flavonoides en los extractos etanólicos y se relacionó con las características geoclimáticas específicas de cada región (Tabla 16). Esto, con la perspectiva de que los perfiles de acumulación de los flavonoides según los factores ambientales divergentes entre las regiones brinden información valiosa para su consideración agronómica.

El patrón de acumulación de fenoles totales resultó diferente entre Matehuala y las dos localidades de Coahuila (Fig. 33) lo que pudo ser inducido por la diferencia de sustrato entre las regiones y la cobertura nebulosa que difiere entre los dos estados (Tabla 16). En

contraste, el contenido en flavonoides totales se mantuvo en rangos similares entre las regiones por lo que se confirma el potencial de aprovechamiento del *guishe* proveniente de las tres regiones (Fig. 33). Asimismo, en *A. attenuata*, se reportaron TPC y TFC similares entre dos sitios de recolecta (Rahmani y Toumi Benali, 2016). Es interesante resaltar que la concentración en TPC y TFC encontrado en el subproducto de la lechuguilla es superior a lo encontrado en otras agaves. Por ejemplo, a partir de hojas de *A. attenuata*, se reportó un TPC de 1.05-3.93 mg GAE/g PF y un TFC de 0.43 a 3.05 mg CE/g PF (Rizwan *et al.*, 2012), y en *A. ornithobrama* y *A. americana* se encontraron TPC de 2.37-18.72 mg GAE/g PF, y un TFC de 0.11 a 3.76 mg CE/g PF según el solvente usado (Rahmani y Toumi Benali, 2016).

Los agaves son conocidos por ser tolerantes a condiciones de sequía lo cual engloba un conjunto de factores incluyendo la temperatura, la disponibilidad en agua y la exposición a las radiaciones UV (Cervantes-Pérez *et al.*, 2018). Como se ha discutido anteriormente en la descripción del metabolismo específico de los flavonoides, estos compuestos están involucrados en el mecanismo de resistencia y adaptación a tales condiciones (Zahedi *et al.*, 2019; Mandujano *et al.*, 2020). Por lo tanto, aún que el TFC no difirió con el origen de la muestra, el perfil específico en flavonoides se vió afectado (Tabla 20). Las condiciones ambientales influyeron particularmente en la acumulación de flavanona, flavonoides metilados, (isorhamnetina) y antocianinas (cianidina y hesperidina) lo que se confirmó con una diferencia en la abundancia relativa de sus derivados glicosilados observado en los perfiles de masas (Tabla 21). Resultados similares se reportaron en un estudio poblacional de *A. victoriae-reginae*, en el cual los derivados glicosilados variaron entre 12 y 20 según el origen geográfico (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a). Por ejemplo, los dihidroflavonoides y flavonoles descritos en el *A. lechuguilla*, los cuales difieren de los compuestos descritos en otros agaves, se consideran como compuestos involucrados en la adaptación a la baja disponibilidad en agua (Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a; Puente-Garza *et al.*, 2017a; Zahedi *et al.*, 2019). Por otro lado, el estrés por radiaciones UV afectó de manera significativa la abundancia de catequina que presentó menor concentración en la muestra de Matehuala, región con mayor exposición a radiaciones (Tabla 16). Esta observación es consistente con el hecho de que las radiaciones UV -A y -B aumentan la actividad de la enzima PAL del inicio de la biosíntesis de los flavonoides, provocando una disminución de la abundancia del precursor de la catequina con una redirección de la biosíntesis hacia la producción de flavonoles, antocianinas y taninos condensados (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Por lo mismo, la

ausencia de antocianinas en la muestra de Matehuala sugiere la síntesis de polímeros así como se observa en los espectros de masas (Tabla 19). Por otra parte, la mayor abundancia de antocianinas en Cosme y Tuxtepec se puede relacionar con la menor disponibilidad en agua en estas regiones en comparación a Matehuala (Tabla 18). En efecto, se sabe que la síntesis de antocianinas es activada por la limitación en agua disponible (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Zahedi *et al.*, 2019). Además, la mayor concentración en antocianinas en Tuxtepec en comparación a Cosme (Tabla 18) se puede relacionar con la exposición diferencial a radiaciones UV entre estas dos localidades.

Relacionando estos datos con el establecimiento de plantaciones de lechuguilla, se ha mostrado que un riego inicial favorece el establecimiento del cultivo (Campos *et al.*, 2020). Sin embargo, un riego regular puede inducir cambios metabólicos hasta perder la resistencia a sequía, el cual se ha atribuido al cambio en el metabolismo específico como el de los flavonoides (Maeda, 2019; Zahedi *et al.*, 2019). Además, esta resistencia está estrechamente relacionada con el tipo de metabolismo CAM. Sin embargo, se ha mostrado un cambio drástico a metabolismo C3 cuando el *A. lechuguilla* está sometido a un riego diario (Nobel, 2003; Burciaga *et al.*, 2011). El cambio del metabolismo fotosintético puede inducir una diferencia en el contenido en azúcares los cuales se unen a los flavonoides como parte de su vía de biosíntesis, tal como se describió anteriormente, por lo que una modificación del perfil en flavonoides glicosilados se puede esperar por modulación de la ocurrencia de arabinosa, galactosa, ramnosa y xilosa (Nobel *et al.*, 1989; Aragón-Gastélum *et al.*, 2020). Esto se vió reflejado en la cantidad de derivados glicosilados más alto en las muestras la región más seca (Coahuila), en comparación a la región más húmeda (San Luis Potosí). En particular, no se encontró la quercetina-3-O-xilosa en la muestra de Matehuala (Table 19). En este sentido, un incremento de la intensidad del estrés hídrico en cultivos *in vitro* de *A. salmiana* permitió demostrar el incrementó en el contenido en flavonoides y el potencial antioxidante de los extractos derivados (Puente-Garza *et al.*, 2017b).

Asimismo, si se ha mostrado que el uso de fertilizante con nitrógeno y fósforo favorece la producción de biomasa (Nobel *et al.*, 1989; Castillo-Quiroz *et al.*, 2012), también pueden alterar el perfil en flavonoides, en particular de naringenina, quercetina y kaempferol, conocidos por estar involucrados en el proceso de simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno (Mierziak *et al.*, 2014; López-Lozano *et al.*, 2020). Esto se confirma por su

concentración similar en las tres regiones (Tabla 18) probablemente en respuesta la falta de nitrógeno del suelo de las tres regiones (Sheldon, 1980; Scheinvar, 2018). Por otro lado, estos compuestos también están involucrados en la resistencia contra microorganismos patógenos (Pistelli y Giorgi, 2012; Mierziak *et al.*, 2014; Mithöfer y Maffei, 2017), lo que es de interés para los cultivos susceptibles a plagas por hongos o gusanos (Castillo-Quiroz *et al.*, 2012).

Por otra parte, algunos flavonoides descritos en el *A. lechuguilla* y en el *guishe* están involucrados en la competencia interespecífica como mecanismo de supervivencia en un ecosistema hiperdiversificado (Mandujano *et al.*, 2020). Entre ellos, la catequina y los derivados *O*-glicosilados, los cuales fueron encontrados en abundancias diferentes según el sitio de muestreo (Tabla 18 y 19), los cuales inhiben la germinación de otras especies cuando se encuentran concentrados en el suelo (Kong *et al.*, 2007; Buer *et al.*, 2010). Su abundancia diferencial entre Coahuila y San Luis Potosí es coherente con la diferencia de especies asociadas a la lechuguilla entre las dos regiones (Anexo D) y explica la mayor densidad de *A. lechuguilla* en Coahuila en comparación a Matehuala (Reyes-Agüero *et al.*, 2000; Nobel, 2003). Asimismo, la presencia de estos compuestos con propiedades alelopáticas en el *guishe* sustenta el impacto negativo de su desecho en el ambiente de estos ejidos.

A pesar de la variabilidad en el perfil de flavonoides inducida por factores bióticos y abióticos la acumulación global de TPC, TFC y los espectros de masa, confirman el potencial del *guishe* de *A. lechuguilla* proveniente de las tres regiones para su valorización en lugar de ser desechado. Además, la cantidad de polifenoles caracterizado en el *guishe* es coherente con el 10.4% de fitoquímicos considerado el esquema de biorrefinería propuesto por Díaz-Jiménez *et al.* (2019). Por lo tanto, para un desarrollo integrado de los cultivos comerciales dirigido a un aprovechamiento tipo biorrefinería el balance entre productividad y acumulación de metabolitos especializados se tiene que considerar (Fig. 61).

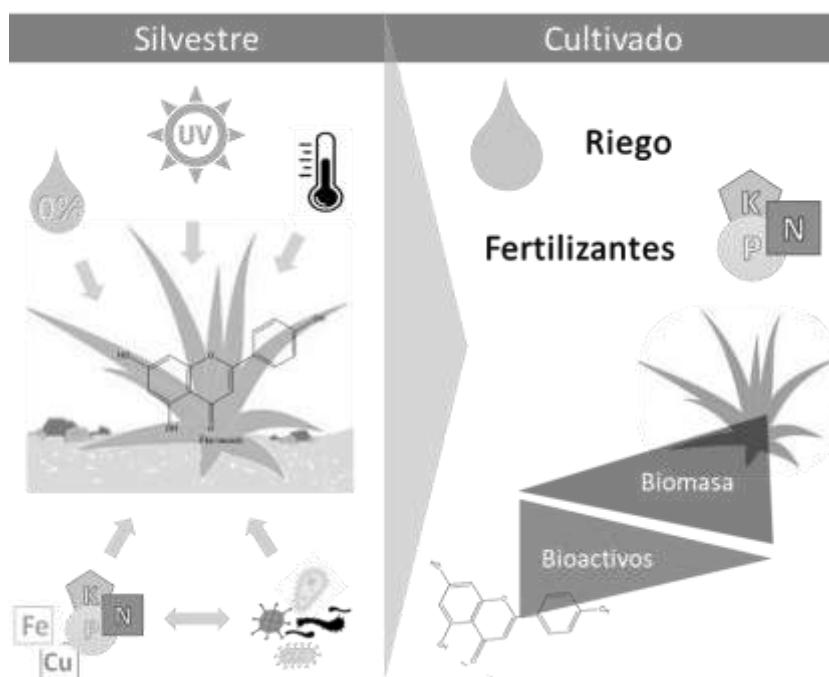


Figura 61. Factores que influyen en el contenido en flavonoides del *Agave lechuguilla* silvestre y cultivada.

8.3.2 Procesamiento de la muestra

La valorización de los agro-residuos a través de la obtención de fitoquímicos activos requiere un manejo y pretratamiento adecuado de la biomasa (Bilal y Iqbal, 2019; Mehmood *et al.*, 2021). En este contexto, estudios previos han evaluado el efecto del procesamiento de la biomasa de agaves para la obtención de compuestos de alto valor agregado (Palomo-Briones *et al.*, 2018) y se ha conceptualizado la biorrefinería del *A. lechuguilla* (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019). Sin embargo, el manejo del *guishe* de la lechuguilla no se ha enfocado en los flavonoides, a pesar del alto potencial de estos compuestos para desarrollo de productos comerciales. Por lo tanto, en este estudio se evaluaron el efecto de los métodos de secado, tratamientos enzimáticos y procesos de extracción centrándose en la obtención de los flavonoides bioactivos previamente identificados.

8.3.2.1 Método de secado

El secado de la biomasa es una etapa crucial en el uso de materia vegetal susceptibles a ataque microbiano, y procesos enzimáticos y químicos intrínsecos, los cuales tienden a alterar los compuestos fenólicos (Rodríguez *et al.*, 2016; Papoutsis *et al.*, 2017). Estudios previos del efecto de las condiciones de almacenamiento y pretratamiento en el contenido

en compuestos fenólicos y flavonoides han mostrado que la congelación y liofilización, permiten una mayor conservación de los compuestos y sus actividades, en comparación con cualquier otro protocolo (Marston y Hostettman, 2006; Quispe-Fuentes *et al.*, 2018). Sin embargo, considerando la implementación de la tecnología a gran escala, para tratar hasta 150,000 toneladas anualmente, la liofilización presenta la desventaja de tener alto costo de operación. Los resultados de rendimientos de extracción obtenidos con el secado al horno fueron comparables a los obtenidos con el *guishe* liofilizado (Fig. 35). Considerando el tiempo, la deshidratación en horno a convección presenta la ventaja de disminuir el tiempo de secado por dos en comparación a la liofilización. Finalmente, la temperatura regulada a 40°C y la condición de oscuridad que permite el uso de tal equipo comparando a un secado al sol permite la preservación adecuada de los flavonoides en el *guishe*. De hecho, la temperatura y la exposición a la luz son los parámetros que pueden alterar la estructura de los flavonoides, principalmente por oxidación, y entonces su potencial bioactivo (Sisa *et al.*, 2010; Nemzer *et al.*, 2018; Cheah *et al.*, 2020). En comparación, estudios previos usando una temperatura de 85°C mostraron efecto en el contenido en flavonoides de los extractos de *A. tequilana* (Santana-Jiménez *et al.*, 2020). Por lo tanto, la temperatura de 40°C aplicada al *guishe* se considera como adecuada ya que no se observó diferencia en el TFC (Fig. 36). Esto coincide con lo previamente reportada para *A. fourcoides* secado al horno a 60°C, lo cual no tuvo impacto significativo en el TPC y TFC de los extractos etanólicos. En contraste, la diferencia de exposición a la luz entre los tratamientos impactó el contenido en fenoles totales en los extractos de *guishe*. La sensibilidad de los flavonoides a las condiciones de secado se observó de manera más significativa considerando el perfil específico en flavonoides (Fig. 38). Las antocianinas disminuyeron drásticamente en los tratamientos con luz. Efectos similares se observaron en la concentración de flavonoles glicosilados y flavanonas, que tuvieron valores menores para el secado al sol. El comportamiento de los flavonoides del *guishe* según el método de secado es coherente con lo reportado para otras biomásas vegetales (Quispe-Fuentes *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Asimismo, se ha mostrado heterogeneidad en la calidad de los productos derivados de plantas medicinales secadas al sol (Arslan *et al.*, 2021). Finalmente, la variación en el contenido en fenoles y de los perfiles de flavonoides en los diferentes tratamientos se reflejó en la actividad antioxidante de los extractos con los valores de inhibición mayores en los tratamientos a la oscuridad. Adicionalmente, se observó una mejor capacidad antioxidante en los extractos obtenidos del *guishe* secado en horno que con el *guishe* liofilizado (Fig. 39), lo que contrasta

con lo generalmente reportado (Nemzer *et al.*, 2018; Quispe-Fuentes *et al.*, 2018). Un incremento de la actividad antioxidante con el secado al horno y al sol se ha relacionado con una mayor liberación de polifenoles atribuido a un efecto de la temperatura aplicada en el proceso en comparación a la liofilización (Papoutsis *et al.*, 2017).

Con base en los resultados para el *guishe*, se propone el secado en horno de convección, a la oscuridad y una temperatura de 40°C, como el proceso de secado más adecuado para la conservación del contenido en flavonoides bioactivos. Además, es un procedimiento fácilmente aplicable y viable a mayor escala.

8.3.2.2 Almacenamiento

Para la conservación de las muestras, el almacenamiento en la oscuridad, en contenedor hermético y a temperatura ambiente resultó eficiente ya que no hubo alteración de los flavonoides tanto cualitativa como cuantitativa en análisis realizados sobre la misma muestra recién procesada y después de nueve meses almacenada. De manera similar, se reportó la preservación del contenido en flavonoides y antocianinas en la biomasa de *A. fourcoides* almacenada seis meses en las mismas condiciones (Iser *et al.*, 2020). Asimismo, el contenido en fenoles totales se preservó en *Agave* spp. almacenadas 5 meses, incluso se incrementó el potencial antioxidante de los extractos (Santos-Zea *et al.*, 2012).

8.3.3 Pretratamiento enzimático de la muestra

Para seguir con el procesamiento del *guishe* para la obtención de flavonoides, se consideró un pretratamiento previo a la extracción. Esto, debido a que la recuperación de fitoquímicos a partir de biomásas vegetales está limitada por las paredes celulares y membranas que constituyen una barrera física (Nadar *et al.*, 2018; Tsouko *et al.*, 2020). Considerando los tratamientos térmicos, ácidos y alcalinos inadecuados para la integridad de los compuestos bioactivos (Carmona *et al.*, 2017; Cheah *et al.*, 2020), se eligió un tratamiento enzimático. Por otro lado, considerando la integración de la valorización de los flavonoides del *guishe* como parte de la biorrefinería en desarrollo, se evaluó el efecto de enzimas lignocelulósicas que se emplean en procesos de pretratamiento dirigido a la producción de bioenergía y obtención de compuestos bioactivos (Bergeron *et al.*, 2012; Sánchez-Camargo *et al.*, 2017; Arora *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2018; Larios-Cruz *et al.*, 2019).

La formulación de una mezcla enzimática con lacasa, celulasa y pectinasa fue eficiente para incrementar los rendimientos de extracción en comparación a lo obtenido del *guishe* no pretratado. Además, se observó un incremento de los rendimientos conforme a la disminución del pH de medio de reacción, el incremento de la temperatura, y del tiempo de incubación (Fig. 40). Esto se relaciona con las condiciones óptimas reportadas para las enzimas incluidas en la mezcla. La celulasa y la pectinasa adquiridas de Sigma-Aldrich presentan una actividad óptima a pH 5.0 y 37°C, y a pH 4.0 y 50°C respectivamente. La lacasa fúngica proporcionada por el grupo SAB presenta una actividad óptima a pH 4.0 en un rango de temperatura de 40 a 60°C (Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014).

En comparación, con el uso de mix comerciales, no se observó un efecto del pH mientras que la temperatura y el tiempo de incubación impactaron de manera significativa el TPC y el TFC. Esto se debe a que el pH óptimo del Ultraflo se encuentra alrededor de 6.0, con una temperatura de entre 50 y 60°C, y la actividad óptima del Viscozyme se reporta con un rango de pH de 3.5 a 5.5 y una temperatura de 40 a 50°C. En estudios previos, se ha demostrado la eficiencia del Viscozyme a pH 3-6 y temperatura de 30-50°C (Huynh *et al.*, 2014; Mill *et al.*, 2019), y del Ultraflo a pH 4-5 y temperatura de 40-50°C (Kim *et al.*, 2013; Cruz-Zúñiga *et al.*, 2016) para la obtención de compuestos fenólicos.

En cuanto a las concentraciones individuales de las enzimas en la mezcla formulada, el incremento de la cantidad de celulasa y pectinasa no favorece el rendimiento de extracción. Sin embargo, se obtuvieron concentraciones mayores en TPC y TFC que con el tratamiento control, y los valores más altos se observaron usando la cantidad mínima de cada enzima (Fig. 41 y 42). De igual manera, el uso de 5 UI (2mg/mL) de celulasa y pectinasa para la hidrólisis de hojas de *Ginkgo biloba* incrementó el TFC (Chen *et al.*, 2011). En contraste, la concentración de lacasa tuvo un efecto positivo en el rendimiento, mientras se observó un efecto negativo en el contenido total en fenoles y flavonoides, y en el perfil específico de flavonoides de los extractos (Fig. 43). Esto se atribuye a su actividad fenoxidasa, la cual le permite romper los polímeros de lignina sin alterar la integridad de los azúcares (Giacobbe *et al.*, 2020). Sin embargo, esta actividad oxidativa no es deseable para la obtención de compuestos fenólicos ya que altera su potencial antioxidante (Papoutsis *et al.*, 2017; Pham *et al.*, 2020). Entonces, la presencia de lacasa en los mix formulados indujo un efecto negativo, lo que explica que se obtuvieron mejores resultados con los mix comerciales. Sin

embargo, debido a sus ventajas para los objetivos de biorrefinería, su uso no se debe de descartar, por ejemplo, el uso de lacasas bacterianas en lugar de fúngicas podría preservar mejor la integridad de los compuestos bioactivos (Giacobbe *et al.*, 2020).

A continuación, las mezclas enzimáticas comerciales favorecieron tanto el rendimiento global de extracción como el rendimiento específico en algunos flavonoides en comparación al tratamiento control y a lo obtenido con los mix formulados (Fig. 40-43). Esto se reflejó en el potencial antioxidante de los extractos (Fig. 44 y45). Asimismo, a partir de *Opuntia* spp. el uso de Ultraflo y Viscozyme favoreció la recuperación de los compuestos fenólicos y algunos flavonoides específicos como los derivados glicosilados de isorhamnetina. Además, en estos mismos trabajos, se reporta una mayor actividad antioxidante de los extractos obtenidos después de la hidrólisis enzimática, en comparación con los extractos sin tratamiento de la biomasa (Kim *et al.*, 2013; Antunes-Ricardo *et al.*, 2018, 2020; Mill *et al.*, 2019). La mayor eficiencia de los mix comerciales en comparación a los mix formulados se puede atribuir a la diversidad de enzimas presentes en los mix y en particular a la xilanasa, ya que la hemicelulasa de la lechuguilla está compuesta al 63% de xilosa (Díaz-Blanco *et al.*, 2018).

Esta es una enzima clave del Ultraflo y que puede explicar también los mejores resultados de TFC y concentración específica en flavonoides con el uso de este mix en comparación con el uso del Viscozyme. La disminución de las formas glicosiladas de antocianinas, flavanona, isorhamnetina, quercetina y kaempferol en los extractos obtenidos de *guishe* hidrolizado con Viscozyme concuerda con la bioconversión de los flavonoides glicosilados en agliconas causada por el uso del Viscozyme (Dueñas *et al.*, 2007; Berlowska *et al.*, 2018). Por otro lado, la conservación de los derivados glicosilados con el uso del Ultraflo a diferencia del uso del Viscozyme se puede explicar por la actividad de transglicosilación de las enzimas (Kim *et al.*, 2013; Berlowska *et al.*, 2018). Asimismo, por el efecto de β -glicosidasas endógenas que tienen a favorecer la producción los flavonoides agliconas (Chen *et al.*, 2011). Sin embargo, si el mix Viscozyme ha sido ampliamente usado para la hidrólisis de una gran diversidad de materia vegetal, existen pocos reportes del uso del Ultraflo.

Considerando las actividades biológicas individuales y en sinergia de los flavonoides agliconas y glicosídicos de *guishe*, se considera el tratamiento con Ultraflo como el más adecuado para mantener la diversidad de los flavonoides en el extracto final. Por lo tanto, el

uso del Ultraflo para la hidrólisis óptima de *guishe* por 2.5 h, pH 4 y 40°C se validó de manera experimental. Los resultados mostraron un incremento de hesperidina (x2.5), cianidina (x1.5), delphinidina (x1.4), isorhamnetina (x1.3), y flavanona (x1.2), en comparación con el *guishe* no pretratado (Tabla 21). Además, las concentraciones de apigenina, kaempferol, y naringenina se mantuvieron en los mismos rangos en el *guishe* hidrolizado y el control. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática del *guishe* se presenta como un paso primordial en la obtención de flavonoides de alto valor comercial.

8.3.4 Extracción

Para llegar a aplicaciones comerciales, los flavonoides bioactivos tienen que ser obtenidos con procesos estrictos en cuanto al uso de solventes (FDA, 2020, 2021). Por lo tanto, considerando los resultados de extracción asistida por ultrasonido empleada para la caracterización de los flavonoides, los TPC y TFC fueron similares con el uso de metanol y etanol como solvente de extracción (Tabla 22). Aunque se encontró un mayor contenido en algunos flavonoides en la fracción metanólica, otros como las antocianinas solo se encontraron en la fracción etanólica. Eso debido a la polaridad diferencial entre las dos mezclas hidroalcohólicas (Rizwan *et al.*, 2012; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013a). Una polaridad moderada favorece la extracción de los flavonoides en particular los glicosilados (Rahmani y Toumi Benali, 2016; Osorio-Tobón, 2020). En estudios previos, se ha mostrado la eficiencia del metanol para la extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante y antifúngica de *A. attenuata* (Rizwan *et al.*, 2012) y *A. salmiana* (Hammuel *et al.*, 2011). Por otro lado, con etanol, a partir de *A. fourcoydes* se obtuvieron flavonoides y antocianinas (Iser *et al.*, 2020), y de *A. lechuguilla*, extractos con potencial anticáncer (Anguiano-Sevilla *et al.*, 2018). Finalmente, tanto para la extracción con sonicación y la extracción por fluidos supercríticos, se descarta el uso del metanol debido a su alta toxicidad por lo que lleva a restricción de usos comerciales (Panzella *et al.*, 2020; FDA, 2021).

Para la extracción por fluidos supercríticos, el CO₂, por sus características de inocuidad (Barba *et al.*, 2016; Lucci *et al.*, 2017), se considera como un solvente GRAS (Generally Recognized As Safe por sus siglas en inglés), al igual que la mezcla etanol/agua (FDA, 2020, 2021), usada como solvente para modificar la polaridad del CO₂ de tal manera que fuera posible extraer compuestos polares como lo son los flavonoides. Respecto a la proporción de solvente, se considera la mezcla etanol/agua (70/30, v/v) como la más eficiente para la

obtención de compuestos bioactivos de bagazo de agave debido a que incrementa la permeabilidad de las membranas y favorece la transferencia de masas (Santos-Zea *et al.*, 2021). La adición de un co-solvente, además de incrementar la solubilidad de los flavonoides en fluido supercrítico, también afectó las propiedades de los fluidos como su masa volúmica (Pardo-Castaño *et al.*, 2015; García-Pérez *et al.*, 2017). Por otro lado, conforme se van solubilizando los compuestos durante el proceso de extracción, también se observa una modificación del equilibrio de las fases en estado supercrítico (Pardo-Castaño *et al.*, 2015; García-Pérez *et al.*, 2017) debido a las características de los flavonoides (Tabla 25). Esto explica el efecto combinado observado entre la variable co-solvente con la presión y temperatura para la obtención de los fenoles y flavonoides (TPC y TFC). Por lo mismo, una variación de la temperatura y la presión en el rango de valor que permitió estar en estado supercrítico, no afectó la extracción de los polifenoles (Fig. 47-49). En contraste, se observó un efecto de las tres variables en el perfil específico en flavonoides de interés (Fig. 51).

Para la obtención de flavonas y flavanonas del *guishe*, las condiciones más propicias según el DOE fueron un 15% de cosolvente, 150 bar y 70°C. Con condiciones de SFE similares (15% de etanol, 95 bar y 58.6°C), Giannuzzo *et al.* (2003) reportan un rendimiento específico de naringenina de 14.4 g/kg a partir de la cáscara fresca de *Citrus paradisi*. Asimismo, con un 10% de etanol, 200 bar y 50°C, se obtuvieron 4.83 mg/g de catequina, 4.55 mg/g de epicatequina, 3.75 mg/g de apigenina y 3.63 mg/g de naringenina a partir de *Strobilanthes crispus* (Liza *et al.*, 2010). En este mismo trabajo de Liza *et al.* (2010), las mismas condiciones permitieron obtener 4.10 mg/g de miricetina, 12.52 mg/g de luteolina, 19.45 mg/g de kaempferol y 8.47 mg/g de rutina, los cuales son flavonoles. En el caso del *guishe*, la extracción de los flavonoles incrementó con la proporción de co-solvente y una baja temperatura de extracción (40-55°C) (Fig. 51). Asimismo, con un 20% de etanol, 230 bar y 45°C, se obtuvo una fracción enriquecida en flavonoles (miricetina y quercetina) a partir de hojas de *Myrthus communis* (Pereira *et al.*, 2016b). El 20% de co-solvente se considera como la cantidad máxima que se puede usar de tal manera que no se supera el uso de solvente en comparación a la extracción con métodos convencionales con una proporción biomasa/volumen de 1/10.

En contraste, una disminución de la proporción de co-solvente y un incremento de la presión favoreció la obtención de flavonoides glicosilados a partir del *guishe* (Fig. 50). Asimismo, a

partir de nopal (*Opuntia ficus-indica*), Antunes-Ricardo *et al.* (2017 y 2020) optimizaron la SFE de derivados glicosídicos de isorhamnetina por lo que se recomienda un 5% de etanol (EtOH 70%), 300 bar y 50°C, mientras que los derivados glicosídicos de quercetina se obtuvieron en mayor proporción con una temperatura de 35°C. De manera similar, Paes *et al.* (2014) obtuvieron 808 µg/g de flavonoides 3-O-glicósidos a partir de cáscara, pulpa y semillas de *Vaccinium myrtillus* aplicando un 5% de etanol/agua. Debido a los flavonoides presentes en *V. myrtillus*, estos fueron en mayoría antocianidinas (Paes *et al.*, 2014). A partir de sus frutos también se extrajeron antocianinas (0.62 mg/g PS) usando 10% de etanol 70%, 250 bar y 45°C. Estas condiciones son de los mismos rangos que los sugeridos en este trabajo para la obtención de antocianinas a partir del *guishe* (Fig. 51). Los resultados del diseño experimental aplicado sugirieron un incremento de la proporción de las antocianinas en los extractos obtenidos con un 15% de co-solvente, 250 bar y 60°C. Por otro lado, en estas condiciones, se observó la mayor actividad antioxidante de los extractos (Fig. 52), lo que se relaciona con la modulación del perfil en flavonoides presentes en los extractos (Monroy *et al.*, 2016).

El uso de la UAE mostró una eficiencia adecuada para la caracterización del contenido en flavonoides en el *guishe*. Sin embargo, las antocianinas, que presentan un particular interés comercial, se presentaron como los flavonoides de menor abundancia en comparación a los demás flavonoides identificados en los extractos. Además, este método extractivo es inespecífico y los extractos presentaron un alto contenido en azúcares libres y ácidos fenólicos, indeseables para algunas aplicaciones (FDA, 2021). Por lo tanto, se considera el uso de la extracción y purificación por fluidos supercríticos (SFE) como una alternativa que permite dirigir la extracción de manera específica para obtener una fracción enriquecida en antocianinas. Los resultados de validación experimental confirmaron la especificidad de estas condiciones de extracción por fluidos supercríticos hacia las antocianinas (Tabla 27). La cantidad relativa de antocianinas en los extractos SFE soporta el uso de esta técnica en comparación a la UAE y la maceración convencional. Asimismo, es interesante resaltar que la hidrólisis enzimática del *guishe*, previa a la SFE, favoreció los rendimientos específicos de obtención de antocianinas, flavonoles y flavonoides glicosilados.

Finalmente, la constancia de las relaciones termodinámicas en tal sistema ha mostrado que la modelación se reflejó de manera satisfactoria en experimentos de escalamiento con poca

variación de acuerdo a la modelación (Pieck *et al.*, 2015; García-Pérez *et al.*, 2017). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo pueden usarse para plantear el escalamiento de la extracción por fluidos supercríticos de los flavonoides de interés del *guishe* previamente hidrolizado. Por otra parte, la integración de la SFE en el bioproceso presenta la ventaja de ser una técnica verde que limita el consumo de solventes orgánicos y entonces los costos económicos y ambientales (Panzella *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2021).

En resumen, la hidrólisis del *guishe* y la SFE dirigida a las antocianinas permitieron obtener un extracto enriquecido en flavonoides de alto valor agregado a partir del subproducto del *A. lechuguilla*. Se espera que con el valor del producto, exista un balance en relación al costo del bioproceso propuesto, lo cual se tiene que establecerse con el análisis de factibilidad tecno-económica correspondiente. Asimismo, se propone el *guishe* como materia prima, el extracto enriquecido en flavonoides como producto de alto valor comercial y el bioproceso como un paquete tecnológico sustentable.

8.4 Uso del extracto

El grupo principal de flavonoides encontrados en mayor abundancia en el *guishe* son los flavonoles glicosilados conocidos por actuar como antioxidantes, antibacterianos, antivirales, cardioprotectores, antiinflamatorios y anticancerígenos (Barreca *et al.*, 2021). Los segundos compuestos más abundantes son las antocianinas, especialmente interesantes por sus efectos benéficos en la salud y sus propiedades antibacterianas y antioxidantes para aplicación en la industria agroalimentaria (Belwal *et al.*, 2020; Ockermann *et al.*, 2021). En concentraciones más bajas, los agliconas flavonoles y flavanoles presentan efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos (Wang *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2021). En conjunto, estos flavonoides identificados en el *guishe* tienen alto potencial antiinflamatoria e inmunomodulador, y un potencial antioxidante intermediario en comparación a productos comerciales.

Para su uso en humano, la predicción de las características de farmacodinámica sugiere una fuerte probabilidad de absorción de las formas agliconas en el tracto digestivo. En contraste, se observa una disminución de la biodisponibilidad los derivados glicosilados. Esto confirma que el efecto observado de extractos enriquecidos en flavonoides glicosilados ocurre por la interacción con la microbiota intestinal actuando como prebiótico (Jasso-Padilla *et al.*, 2017).

Por otro lado, la microbiota intestinal puede degradar los flavonoides glicosilados, incrementando la biodisponibilidad de las formas agliconas (Rizza *et al.*, 2011) las cuales presentan mayor potencial de interacción con el metabolismo humano y una menor toxicidad *in vivo*. Esto sugiere su aplicación en nutraceutica y farmacología (Sun *et al.*, 2019; Blahova *et al.*, 2021). Por otro lado, en la piel, su adsorción varía según la estructura de los flavonoides mayoritarios, lo que presenta diversos interés para cosmética (Barreto *et al.*, 2017).

Aunque las propiedades y aplicaciones de los flavonoides están ampliamente reportadas en la literatura, la obtención de tales compuestos sigue siendo un reto. Por ejemplo, las antocianinas son mayormente descritas en frutas, verduras y flores (Belwal *et al.*, 2020; Ockeman *et al.*, 2021), por lo que su obtención a partir del *guishe* presenta la ventaja de no entrar en competencia con la alimentación humana. Por lo tanto, las concentraciones de los flavonoides con potenciales efectos terapéuticos sugieren los usos posteriores de los productos derivados de *A. lechuguilla* en cosmética, nutracéutica y farmacia. Además, la conservación de los perfiles de flavonoides a través de las áreas productivas confirmó el potencial de este abundante material vegetal para la obtención de ingredientes naturales bioactivos para aplicaciones comerciales.

Por otra parte, el análisis de farmacodinámica por similitud con otros productos bioactivos de las bases de datos reveló un potencial riesgo asociado a la similitud con el catecol, lo cual puede ser producto de degradación de los flavonoides presentes en los extractos. Sin embargo, en este trabajo se demostró la estabilidad de los flavonoides a temperatura ambiente cuando se cuidan de la luz y exposición al aire. Además, se preserva el potencial antioxidante con estas condiciones de almacenamiento. Estos resultados sirven de base para recomendar el manejo adecuado de los extractos como insumos para la industria.

Asimismo, el estudio preliminar *in silico* de la interacción de las antocianinas con proteínas humanas, confirmó el alto potencial de valorización de estos compuestos los cuales se incrementaron en los extractos por el uso de la SFE. Por otra parte, es interesante resaltar que para algunas proteínas blanco con las cuales se predijo una interacción, no presentan medicinas ni candidatos para estudios clínicos (ChEMBL, 05.10.2021). Además, considerando el ambiente mundial actual, las antocianinas y sus derivados están llamando la atención por

sus efectos antivirales predichos en contra del SARS-CoV-2 por interacción con la proteasa identificada como parte del proceso de infección (Khalifa *et al.*, 2020; Fakhar *et al.*, 2021; Rameshkumar *et al.*, 2021; Zígolo *et al.*, 2021).

9 CONCLUSIONES

9.1 Conclusiones

El primer transcriptoma *de novo* de *A. lechuguilla* obtenido en este estudio permitió elucidar la biosíntesis y regulación de los flavonoides. La identificación de los genes codificantes de enzimas específicas, los factores de regulación y los perfiles de expresión sugirieron la acumulación de flavanonas (naringenina y hesperidina), flavonas (apigenina), flavanoles (catequina y galocatequina), flavonoles (isorhamnetina, miricetina, quercetina y kaempferol) y antocianidinas (cianidina y delphinidina), y sus formas glicosiladas. La validación de esta predicción por análisis de HPLC-UV-MS/MS confirma la presencia de estos flavonoides. Adicionalmente, la abundancia de los compuestos evaluada por los análisis cuantitativos con métodos colorimétricos y de espectrometría mostraron una relación estricta con la abundancia de los genes involucrado en la biosíntesis de los flavonoides. Por lo tanto, se valida la predicción del contenido en flavonoides en el *guishe* por el método indirecto de transcriptómica funcional. Con base en esto, se propone un método de bioprospección confiable, de menor costos y que limita los residuos químicos necesario para los análisis.

Además, la información generada en cuanto a las estructuras de las enzimas específicas del transcriptoma de la lechuguilla permitió establecer las estructuras de los compuestos sintetizados y sus características fisicoquímicas. Asimismo, se permitió modelizar *in silico* el acoplamiento de los flavonoides con biomoléculas identificadas como parte de los procesos celulares involucrados en el desarrollo de varias enfermedades. Los resultados de interacción de los flavonoides del *guishe* con las proteínas blanco sugiere su potencial terapéutico tales como antiinflamatorio, anticáncer e inmunomodulador. Además, algunas de las proteínas blanco consideradas no tienen productos comerciales asociados por lo que los flavonoides del *guishe* presenta un interés particular. Por otro lado, la bioactividad de los extractos de *guishe* se evidenció usando el potencial antioxidante como indicador.

Con base en la caracterización química y biológica de los flavonoides del *guishe*, puede afirmarse que el residuo del *A. lechuguilla* es una valiosa fuente de flavonoides activos de interés para las industrias farmacéutica, cosmética y nutracéutica sugieren el alto valor de los productos derivados.

Además, la conservación del perfil en flavonoides en el *guishe* proveniente de tres distintas regiones productoras de *ixtle* permite confirmar el potencial de valorización a nivel nacional. Por lo tanto, el secado usando un horno de convección a baja temperatura y oscuridad se contempla como un procedimiento adecuado para la conservación de los flavonoides bioactivos y el procesamiento de la gran cantidad de *guishe* generado cada año. De igual manera, aunque el pretratamiento enzimático se optimizó a nivel laboratorio, el incremento de la cantidad de algunos flavonoides, así como la mayor actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la biomasa hidrolizada 2.5h, pH 4.0 y 40°C con el mix comerciales Ultraflo® sugiere su implementación a mayor escala. Finalmente, se pudieron obtener los flavonoides de interés comercial a partir del *guishe* hidrolizado por medio de la extracción por fluidos supercríticos. Además de ser una alternativa verde a la extracción con solventes, esta técnica permitió obtener extractos que no necesitan un paso de purificación antes de ser usado en la formulación de productos comerciales.

9.2 Perspectivas

El transcriptoma *de novo* se complementó con los datos de las tres regiones del muestreo del 2018. Eso se relacionará con el análisis bioquímico que se llevó a cabo en este trabajo. Además de generar conocimiento en cuanto a la biosíntesis de los flavonoides en el *A. lechuguilla*, eso permitirá corroborar que el uso de la bioprospección por medio de análisis transcriptómicos como metodología base para la búsqueda de otros compuestos como los terpenos, alcaloides y fructanos, entre otros.

Para la implementación del bioproceso a escala industrial, varios parámetros se tienen que considerar en las diferentes operaciones unitarias. Por ejemplo, la proporción biomasa/volumen y el tipo de agitación se debe de considerar para el escalamiento de la hidrólisis enzimática en biorreactor. Otra alternativa es el uso de enzimas directamente dentro del proceso de extracción por fluidos supercríticos. Considerando las enzimas como el producto que más influye más en la viabilidad económica de los bioprocesos, un estudio de factibilidad tecno-económico permitirá determinar la estrategia más sustentable al respecto. Asimismo, para la integración del proceso de obtención de los flavonoides previo a la producción de biogás y bioetanol, se requiere evaluar la liberación de carbohidratos (glucosa, xilosa etc.) con la hidrólisis enzimática establecida en este trabajo de manera dirigida a la obtención de flavonoides.

Con el fin de proponer los extractos del *guishe* obtenidos por extracción y purificación por fluidos supercríticos al sector productivo, estudios complementarios son necesarios todavía, como la cuantificación precisa de los flavonoides presentes en los espectros y pruebas de bioactividades *in vitro* e *in vivo*.

En caso de comprobar una de las aplicaciones propuestas basadas en la predicción *in silico* para uso farmacológico, el conocimiento de la biosíntesis de flavonoide brinda información valiosa para su producción heteróloga para cumplir las necesidades de cantidad y pureza de la molécula.

10 LITERATURA CITADA

- Abraham, PE., Yin, H., Borland, AM., Weighill, D., Lim, SD., De Paoli, HC., Engle, N., Jones, PC., Agh, R., Weston, DJ., Wullschlegler, SD., Tschaplinski, T., Jacobson, D., Cushman, JC., Hettich, RL., Tuskan, GA. y Yang, X. (2016). Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant Agave. *Nature Plants*, 2(1): 1-10. doi: 10.1038/nplants.2016.178
- Abu-Reidah, IM., Ali-Shtayeh, MS., Jamous, RM., Arráez-Román, D. y Segura-Carretero, A. (2015). HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*, 166: 179-191. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.011
- Ackeifi, C., Swartz, E., Kumar, K., Liu, H., Chalada, S., Karakose, E., Scott, DK., Garcia-Ocaña, A., Sanchez, R., DeVita, RJ., Stewart, AF. y Wang, P. (2020). Pharmacologic and genetic approaches define human pancreatic β cell mitogenic targets of DYRK1A inhibitors. *JCI Insight*, 5(1): 1-17. doi: 10.1172/jci.insight.132594
- Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, ME., Martínez, AL., Moreno, J., Kite, G., Terrazas, T. y Soto-Hernández, M. (2010). HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. mexicana. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1): 91-97. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.044
- Ahumada-Santos, YP., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M de J., Díaz-Camacho, ç SP., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, JÁ., Heredia, JB. 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. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.04.050
- Alam, MN., Bristi, NJ. y Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2): 143-152. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002
- Ali, MB. y McNear, DH. (2014). Induced transcriptional profiling of phenylpropanoid pathway genes increased flavonoid and lignin content in Arabidopsis leaves in response to microbial products. *BMC Plant Biology*, 14(1): 84. doi: 10.1186/1471-2229-14-84
- Almaraz-Abarca, N., Del Socorro González-Elizondo, M., Da Graça Campos, M., Ávila-Sevilla, ZE., Delgado-Alvarado, EA. y Ávila-Reyes, JA. (2013a). Variability of the foliar phenol profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Botanical Sciences*, 91(3): 295-306. doi: 10.17129/botsci.9
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, EA., Ávila-Reyes, JA., Uribe-Soto, JN. y González-Valdez, LS. (2013b). The Phenols of the Genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 04(03): 9-16. doi: 10.4236/jbnb.2013.43a002
- Almaraz-abarca, N., Delgado-alvarado, EA. y Hernández-vargas, V. (2009). Profiling of Phenolic Compounds of Somatic and Reproductive Tissues of *Agave Durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Science*, 6(6): 1076-1085. Disponible en: <https://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/9256> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, EW. y Lipman, DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

- Alvarez, B V., Vithana, EN., Yang, Z., Koh, AH., Yeung, K., Yong, V., Shandro, HJ., Chen, Y., Kolatkar, P., Palasingam, P., Zhang, K., Aung, T. y Casey, JR. (2007). Identification and characterization of a novel mutation in the carbonic anhydrase IV gene that causes retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(8): 3459-3468. doi: 10.1167/iops.06-1515
- Ana Plazonić., Bucar, F., Maleš, Željani., Mornar, A., Nigović, B. y Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14(7): 2466-2490. doi: 10.3390/molecules14072466
- Anguiano-Sevilla, LA., Lugo-Cervantes, E., Ordaz-Pichardo, C., Rosas-Trigueros, JL. y Jaramillo-Flores, ME. (2018). Apoptosis induction of agave lechuguilla torrey extract on human lung adenocarcinoma cells (SK-LU-1). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). doi: 10.3390/ijms19123765
- Antunes-Ricardo, M., García-Cayuela, T., Mendiola, JA., Ibañez, E., Gutiérrez-Urbe, JA., Cano, MP. y Guajardo-Flores, D. (2018). Supercritical CO₂ enzyme hydrolysis as a pretreatment for the release of isorhamnetin conjugates from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Journal of Supercritical Fluids*, 141(1): 21-28. doi: 10.1016/j.supflu.2017.11.030
- Antunes-Ricardo, M. y Gutiérrez-Urbe, JA. (2018). Flavonoids. En: Nollet LML, Gutiérrez-Urbe JA (eds) *Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis*. Taylor & Francis Group, LLC, pp 173-183
- Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, JA. y Guajardo-Flores, D. (2017). Extraction of isorhamnetin conjugates from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill using supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 119: 58-63. doi: 10.1016/j.supflu.2016.09.003
- Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, JA., López-Pacheco, F., Alvarez, MM. y Serna-Saldívar, SO. (2015). *In vivo* anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. *Industrial Crops and Products*, 76: 803-808. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.089
- Antunes-Ricardo, M., Mendiola, JA., García-Cayuela, T., Ibañez, E., Gutiérrez-Urbe, JA., Pilar Cano, M. y Guajardo-Flores, D. (2020). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of antioxidant isorhamnetin conjugates from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Journal of Supercritical Fluids*, 158(1): 104713. doi: 10.1016/j.supflu.2019.104713
- Aragón-Gastélum, JL., Ramírez-Benítez, JE., González-Durán, E., González-Salvatierra, C., Ramírez-Tobías, HM., Flores, J., Gutiérrez-Alcántara, EJ., Méndez-Guzmán, E. y Jarquín-Gálvez, R. (2020). Photochemical activity in early-developmental phases of *Agave angustifolia* subsp. tequilana under induced global warming: Implications to temperature stress and tolerance. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 263(1): 151535. doi: 10.1016/j.flora.2019.151535
- Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R. y Iqbal, HMN. (2017). Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99: 308-318. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097
- Arlotta, C., Puglia, GD., Genovese, C., Toscano, V., Karlova, R., Beekwilder, J., De Vos, RCH. y

- Raccuia, SA. (2020). MYB5-like and bHLH influence flavonoid composition in pomegranate. *Plant Science*, 298: 110563. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110563
- Arora, A., Banerjee, J., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D. y Patti, AF. (2018). Process design and techno-economic analysis of an integrated mango processing waste biorefinery. *Industrial Crops and Products*, 116(1): 24-34. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.061
- Arslan, M., Zareef, M., Tahir, HE., Ali, S., Xiaowei, H., Rakha, A., Shi, J. y Xiaobo, Z. (2021). Comparative analyses of phenolic compounds and antioxidant properties of Chinese jujube as affected by geographical region and drying methods (Puff-drying and convective hot air-drying systems). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1): 933-943. doi: 10.1007/s11694-020-00697-6
- Assimes, TL., Knowles, JW., Priest, JR., Basu, A., Borchert, A., Volcik, KA., Grove, ML., Tabor, HK., Southwick, A., Tabibiazar, R., Sidney, S., Boerwinkle, E., Go, AS., Iribarren, C., Hlatky, MA., Fortmann, SP., Myers, RM., Kuhn, H., Risch, N. y Quertermous, T. (2008). A near null variant of 12/15-LOX encoded by a novel SNP in ALOX15 and the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 198(1): 136-144. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.003
- Atanasov, AG., Zotchev, SB., Dirsch, VM., Orhan, IE., Banach, M., Rollinger, JM., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, EA., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, GK., Braid, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., Diederich, M., Dinkova-Kostova, AT., Efferth, T., El Bairi, K., Arkells, N., Fan, TP., Fiebich, BL., Freissmuth, M., Georgiev, MI., Gibbons, S., Godfrey, KM., Gruber, CW., Heer, J., Huber, LA., Ibanez, E., Kijjoo, A., Kiss, AK., Lu, A., Macias, FA., Miller, MJS., Mocan, A., Müller, R., Nicoletti, F., Perry, G., Pittalà, V., Rastrelli, L., Ristow, M., Russo, GL., Silva, AS., Schuster, D., Sheridan, H., Skalicka-Woźniak, K., Skaltsounis, L., Sobarzo-Sánchez, E., Bredt, DS., Stuppner, H., Sureda, A., Tzvetkov, NT., Vacca, RA., Aggarwal, BB., Battino, M., Giampieri, F., Wink, M., Wolfender, JL., Xiao, J., Yeung, AWK., Lizard, G., Popp, MA., Heinrich, M., Berindan-Neagoe, I., Stadler, M., Daglia, M., Verpoorte, R. y Supuran, CT. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3): 200-216. doi: 10.1038/s41573-020-00114-z
- Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A. y Maffei, ME. (2016). Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 107: 358-363. doi: 10.1016/j.supflu.2015.09.029
- Barba, FJ., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, AS. y Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49: 96-109. doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.006
- Barreca, D., Trombetta, D., Smeriglio, A., Mandalari, G., Romeo, O., Felice, MR., Gattuso, G. y Nabavi, SM. (2021). Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities. *Trends in Food Science & Technology*, In press. doi: 10.1016/j.tifs.2021.03.030
- Barreto, SMAG., Maia, MS., Benicá, AM., de Assis, HRBS., Leite-Silva, VR., da Rocha-Filho, PA., de Negreiros, MMF., de Oliveira Rocha, HA., Ostrosky, EA., Lopes, PS., de Farias Sales, VS., Giordani, RB. y Ferrari, M. (2017). Evaluation of *in vitro* and *in vivo* safety of the by-product of *Agave sisalana* as a new cosmetic raw material: Development and

- clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing. *Industrial Crops and Products*, 108(1): 470-479. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.06.064
- Batsika, CS., Gerogiannopoulou, A-DD., Mantzourani, C., Vasilakaki, S. y Kokotos, G. (2021). The design and discovery of phospholipase A 2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 16(11): 1287-1305. doi: 10.1080/17460441.2021.1942835
- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, ID., Venskutonis, PR., Georgiev, MI., Clément, C. y Luo, Z. (2020). Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. *Biotechnology Advances*, 43(1): 107600. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107600
- Bergeron, C., Carrier, DJ. y Ramaswamy, S. (2012). *Biorefinery co-products: Phytochemicals, primary metabolites and value-added biomass processing*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
- Berlowska, J., Cieciora-Włoch, W., Kalinowska, H., Kregiel, D., Borowski, S., Pawlikowska, E., Binczarski, M. y Witonska, I. (2018). Enzymatic conversion of sugar beet pulp: A comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation for lactic acid production. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2): 188-196. doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5390
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapiere, C., Pollet, B. y Legrand, M. (2007). Flavonoid Accumulation in Arabidopsis Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *The Plant Cell*, 19(1): 148-162. doi: 10.1105/tpc.106.044495
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18): 2505-2512. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.059
- Bilal, M. y Iqbal, HMN. (2019). Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. *Food Research International*, 123(1): 226-240. doi: 10.1016/j.foodres.2019.04.066
- Blahova, J., Martiniakova, M., Babikova, M., Kovacova, V., Mondockova, V. y Omelka, R. (2021). Pharmaceutical Drugs and Natural Therapeutic Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmaceuticals*, 14(8): 806. doi: 10.3390/ph14080806
- Bogdanov, VY., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M. y Nemerson, Y. (2003). Alternatively spliced human tissue factor: A circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nature Medicine*, 9(4): 458-462. doi: 10.1038/nm841
- Bolger, AM., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I Ben., Casabianca, H. y Hosni, K. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Industrial Crops and Products*, 74(1): 485-493. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.050
- Bousios, A., Saldana-Oyarzabal, I., Valenzuela-Zapata, AG., Wood, C. y Pearce, SR. (2007). Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Science*, 172(2): 291-298. doi:

10.1016/j.plantsci.2006.09.002

- Brown, JP. (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 75(3): 243-277. doi: 10.1016/0165-1110(80)90029-9
- Buer, CS., Imin, N. y Djordjevic, MA. (2010). Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1): 98-111. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00905.x
- Burciaga, MUO., Castillo Quiroz, D. y Arreola, OM. (2011). Caracterización y selección de sitios para plantaciones de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en el estado de Coahuila. *Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, (47): 1-26. Disponible en: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/886.pdf> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Burrows, GE. y Tyrl, RJ. (2013). *Toxic Plants of North America*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, UK
- Burzynski, LC., Humphry, M., Pyriou, K., Wiggins, KA., Chan, JNE., Figg, N., Kitt, LL., Summers, C., Tatham, KC., Martin, PB., Bennett, MR. y Clarke, MCH. (2019). The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin. *Immunity*, 50(4): 1033-1042.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.003
- Caballero Galván, AS., Orrego Alzate, CE. y Cardona Álzate, CA. (2017). Economic assessment of polyphenolic compounds production at different purities and applications. *Polyphenolics: Food Sources, Biochemistry and Health Benefits*: 1-20. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Orrego-4/publication/330369288_Economic_assessment_of_polyphenolic_compounds_production_at_different_purities_and_applications/links/5fc7a177a6fdcc697bd36b01/Economic-assessment-of-polyphenolic-compounds-production-at-different-purities-and-applications.pdf [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Campos, H., Trejo, C., Peña-Valdivia, CB., García-Nava, R., Víctor Conde-Martínez, F. y Cruz-Ortega, R. (2020). Water availability effects on germination, membrane stability and initial root growth of *Agave lechuguilla* and *A. salmiana*. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 268(1): 151606. doi: 10.1016/j.flora.2020.151606
- Carmona, JE., Morales-Martínez, TK., Mussatto, SI., Castillo-Quiroz, D. y Ríos-González, LJ. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(42): 100-122. doi: 10.29298/rmcf.v8i42.21
- Castillo-Quiroz, D., Cano-Pineda, A. y Berlanga-Reyes, CA. (2012). Establecimiento y aprovechamiento de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Comisión Nacional Forestal-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 1-33. Disponible en: https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Establecimiento_y_aprovechamiento_de_la_lechuguilla_Agave%20lechuguilla_Torr.pdf [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Castillo-Quiroz, D., Martínez-Burciaga, OU., Ríos-González, LJ., Rodríguez-de la Garza, JA., Morales-artínez, TK., Castillo-Reyes, F. y Avila-Flores, DY. (2014). Determinación de

- áreas potenciales para plantaciones de *Agave lechuguilla* Torr. para la producción de etanol. *Acta Química Mexicana*, 6(12): 5-11. Disponible en: <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/articulos/12-2Determinacion.pdf> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Castillo-Reyes, F., Hernandez-Castillo, FD., Clemente-Constantino, JA., Gallegos-Morales, G., Rodriguez-Herrera, R. y Aguilar, CN. (2015). *In vitro* antifungal activity of polyphenols-rich plant extracts against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *African Journal of Agricultural Research*, 10(50): 4554-4560. doi: 10.5897/ajar2013.8072
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A. y Aguilar, CN. (2010). *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products*, 32(3): 324-328. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.05.013
- Castillo Quiroz, D., Berlanga Reyes, CA. y Cano Pineda, A. (2005). Recoleccion, Extraccion Y Uso De La Fibra de Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) En El Estado De Coahuila. *INIFAP-CIRNE Campo Experimental Saltillo Publicación Especial*, 6: 1-13
- Castillo Quiroz, D., Sáenz Reyes, JT., Narcia Velasco, M. y Vázquez Ramos, JA. (2013). Propiedades físico-mecánicas de la fibra de *Agave lechuguilla* Torr. de cinco procedencias bajo plantaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(19): 78-91
- Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, JM., González-Hernández, MD., Rojas, R., Ascacio-Valdés, JA., Aguilar, CN. y Martínez-Ávila, GCG. (2017). Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, 237: 1139-1148. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.032
- Cervantes-Pérez, SA., Espinal-Centeno, A., Oropeza-Aburto, A., Caballero-Pérez, J., Falcon, F., Aragón-Raygoza, A., Sánchez-Segura, L., Herrera-Estrella, L., Cruz-Hernández, A. y Cruz-Ramírez, A. (2018). Transcriptional profiling of the CAM plant *Agave salmiana* reveals conservation of a genetic program for regeneration. *Developmental Biology*, 442(1): 28-39. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.04.018
- Cheah, WY., Sankaran, R., Show, PL., Ibrahim, TNBT., Chew, KW., Culaba, A. y Chang, JS. (2020). Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: Current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Research Journal*, 7(1): 1115-1127. doi: 10.18331/BRJ2020.7.1.4
- Chemat., Abert Vian., Ravi., Khadhraoui., Hilali., Perino. y Tixier. (2019). Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules*, 24(16): 3007. doi: 10.3390/molecules24163007
- Chen, J., Dong, X., Li, Q., Zhou, X., Gao, S., Chen, R., Sun, L., Zhang, L. y Chen, W. (2013). Biosynthesis of the active compounds of *Isatis indigotica* based on transcriptome sequencing and metabolites profiling. *BMC Genomics*, 14(1): 1-13. doi: 10.1186/1471-2164-14-857
- Chen, PY., Kuo, YC., Chen, CH., Kuo, YH. y Lee, CK. (2009). Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine Ex Engelm. *Molecules*, 14(5): 1789-1795. doi: 10.3390/molecules14051789
- Chen, S., Xing, XH., Huang, JJ. y Xu, MS. (2011). Enzyme-assisted extraction of flavonoids

- from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1): 100-105. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.09.017
- Chu, T-C., Lu, C-H., Liu, T., Lee, G.C., Li, W-H. y Shih, AC-C. (2013). Assembler for *de novo* assembly of large genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(36): E3417-E3424. doi: 10.1073/pnas.1314090110
- Chuankhayan, P., Hua, Y., Svasti, J., Sakdarat, S., Sullivan, PA. y Ketudat Cairns, JR. (2005). Purification of an isoflavonoid 7-O- β -apiosyl-glucoside β -glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. *Phytochemistry*, 66(16): 1880-1889. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.06.024
- Ciarlini, JJS., Marangoni, A. y Bolzan, A. (2017). Selectivity of supercritical CO₂ extraction and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia involucrata* leaves from Southern Brazil. *Food and Bioproducts Processing*, 106: 29-34. doi: 10.1016/j.fbp.2017.08.008
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL). (2015). Medición de la Pobreza. Disponible en: <https://www.coneval.org.mx/Medicion/Paginas/POBREZA-URBANA-EN-MEXICO-2015.aspx>. [Consulta: 22 Febrero 2021]
- Consejo Nacional de Población (CONAPO). (2010). Índice de Marginación Por Localidad. http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Indice_de_Marginacion_por_Localidad_2010. [Consulta: 22 Febrero 2021]
- Correa, M., Bombardelli, MCM., Fontana, PD., Bovo, F., Messias-Reason, IJ., Maurer, JBB. y Corazza, ML. (2017). Bioactivity of extracts of *Musa paradisiaca* L. obtained with compressed propane and supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 122: 63-69. doi: 10.1016/j.supflu.2016.12.004
- Corso, M., Perreau, F., Mouille, G. y Lepiniec, L. (2020). Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Plant Science*, 296. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110471
- Cox, KR. y Chapman, WG. (2001). The Properties of Gases and Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 123(27): 6745-6745. doi: 10.1021/ja0048634
- Cruz-Zúñiga, JM., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Mendoza-Wilson, AM., Robles-Burgueño, MR., Auras, R. y Gámez-Meza, N. (2016). Development of an antioxidant biomaterial by promoting the deglycosylation of rutin to isoquercetin and quercetin. *Food Chemistry*, 204: 420-426. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.130
- Cuyckens, F. y Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1): 1-15. doi: 10.1002/jms.585
- Daina, A., Michielin, O. y Zoete, V. (2014). iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n -Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(12): 3284-3301. doi: 10.1021/ci500467k
- Daina, A., Michielin, O. y Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small

- molecules. *Scientific Reports*, 7(1): 1-13. doi: 10.1038/srep42717
- Daina, A., Michielin, O. y Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research*, 47: 357-364. doi: 10.1093/nar/gkz382
- Daina, A. y Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 11(11): 1117-1121. doi: 10.1002/cmdc.201600182
- Dávila-Pompermayer, R., Lopez-Yepey, LG., Valdez-Tamez, P., Juárez, CA. y Durán-Herrera, A. (2020). Lechugilla natural fiber as internal curing agent in self compacting concrete (SCC): Mechanical properties, shrinkage and durability. *Cement and Concrete Composites*, 112(1): 103686. doi: 10.1016/j.cemconcomp.2020.103686
- Dávila, JA., Rosenberg, M. y Cardona, CA. (2017). A biorefinery for efficient processing and utilization of spent pulp of Colombian Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.): Experimental, techno-economic and environmental assessment. *Bioresource Technology*, 223: 227-236. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.050
- Davis, SC., Kuzmick, ER., Niechayev, N. y Hunsaker, DJ. (2017). Productivity and water use efficiency of *Agave americana* in the first field trial as bioenergy feedstock on arid lands. *GCB Bioenergy*, 9(2): 314-325. doi: 10.1111/gcbb.12324
- Del Valle, JM. (2015). Extraction of natural compounds using supercritical CO₂: Going from the laboratory to the industrial application. *Journal of Supercritical Fluids*, 96: 180-199. doi: 10.1016/j.supflu.2014.10.001
- Del Valle, JM. y Aguilera, JM. (1999). Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology International*, 5(1): 1-24. doi: 10.1177/108201329900500101
- Del Valle, JM., De La Fuente, JC. y Cardarelli, DA. (2005). Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2): 35-57. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.051
- Dias, MC., Pinto, DCGA. y Silva, AMS. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17): 5377. doi: 10.3390/molecules26175377
- Díaz-Blanco, DI., de La Cruz, JR., López-Linares, JC., Morales-Martínez, TK., Ruiz, E., Rios-González, LJ., Romero, I. y Castro, E. (2018). Optimization of dilute acid pretreatment of *Agave lechuguilla* and ethanol production by co-fermentation with *Escherichia coli* MM160. *Industrial Crops and Products*, 114(February): 154-163. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.074
- Díaz-Jiménez, L., Carlos-Hernandez, S., Jasso de Rodríguez, D. y Rodríguez-García, R. (2019). Conceptualization of a biorefinery for guishe revalorization. *Industrial Crops and Products*, 138(May): 111441. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.06.004
- Dorta, E., González, M., Lobo, MG., Sánchez-Moreno, C. y de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57: 51-60. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.012
- Dueñas, M., Hernández, T. y Estrella, I. (2007). Changes in the content of bioactive

- polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 101(1): 90-97. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.11.053
- El-Hawary, SS., El-Kammar, HA., Farag, MA., Saleh, DO. y El Dine, RS. (2020). Metabolomic profiling of five Agave leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their anti-inflammatory, immunomodulatory and ulceroprotective activities. *Steroids*, 160(1): 108648. doi: 10.1016/j.steroids.2020.108648
- Escamilla-Treviño, LL. (2012). Potential of Plants from the Genus Agave as Bioenergy Crops. *Bioenergy Research*, 5(1): 1-9. doi: 10.1007/s12155-011-9159-x
- Espinosa-Pardo, FA., Nakajima, VM., Macedo, GA., Macedo, JA. y Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using supercritical CO₂ and cosolvents. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1): 1-10. doi: 10.1016/j.fbp.2016.10.002
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E. y Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6): 707-715. doi: 10.1016/S1044-0305(01)00226-4
- Fakhar, Z., Faramarzi, B., Pacifico, S. y Faramarzi, S. (2021). Anthocyanin derivatives as potent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: An in-silico perspective of therapeutic targets against COVID-19 pandemic. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(16): 6171-6183. doi: 10.1080/07391102.2020.1801510
- FAO. (2019). The state of Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy
- Farooq, S., Shah, MA., Siddiqui, MW., Dar, BN., Mir, SA. y Ali, A. (2020). Recent trends in extraction techniques of anthocyanins from plant materials. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6): 3508-3519. doi: 10.1007/s11694-020-00598-8
- FDA. (2020). Guidance, Compliance, & Regulatory Information. <https://www.fda.gov/drugs>. [Consulta: 14 Febrero 2021]
- FDA. (2021). GRAS Substances (SCOGS) Database. <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-substances-scogs-database>. [Consulta: 17 Septiembre 2021]
- Feldshtein, M., Elkrinawi, S., Yerushalmi, B., Marcus, B., Vullo, D., Romi, H., Ofir, R., Landau, D., Sivan, S., Supuran, CT. y Birk, OS. (2010). Hyperchlorhidrosis caused by homozygous mutation in CA12, encoding carbonic anhydrase XII. *American Journal of Human Genetics*, 87(5): 713-720. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.10.008
- Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey RN. y Willmitzer L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18(11): 1157-61
- Finn, RD., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, RY., Eddy, SR., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, ELL., Tate, J. y Punta, M. (2014). Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42(D1): 222-230. doi: 10.1093/nar/gkt1223
- Finn, RD., Clements, J. y Eddy, SR. (2011). HMMER web server: Interactive sequence

- similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2): 29-37. doi: 10.1093/nar/gkr367
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, MF. y Whitney, RA. (2010). A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101(23): 8915-8922. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.125
- Fleck, U., Tiegs, C. y Brunner, G. (1998). Fractionation of fatty acid ethyl esters by supercritical CO₂: High separation efficiency using an automated countercurrent column. *Journal of Supercritical Fluids*, 14(1): 67-74. doi: 10.1016/S0896-8446(98)00100-4
- Florita Ramos Casillas,. (2012). Cytotoxic activity of *Agave lechuguilla* Torr. *African Journal of Biotechnology*, 11(58): 12229-12231. doi: 10.5897/ajb-12-1123
- Freitas, LC., Barbosa, JR., da Costa, ALC., Bezerra, FWF., Pinto, RHH. y Carvalho Junior, RN de. (2021a). From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? *Resources, Conservation and Recycling*, 169(1): 105466. doi: 10.1016/j.resconrec.2021.105466
- Fusenig, NE., Capes-Davis, A., Bianchini, F., Sundell, S. y Lichter, P. (2017). The need for a worldwide consensus for cell line authentication: Experience implementing a mandatory requirement at the International Journal of Cancer. *PLoS Biology*, 15(4): 1-13. doi: 10.1371/journal.pbio.2001438
- Gampe, N., Darcsi, A., Lohner, S., Béni, S. y Kursinszki, L. (2016). Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny restharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 123: 74-81. doi: 10.1016/j.jpba.2016.01.058
- Gao, Q., Ma, R., Chen, L., Shi, S., Cai, P., Zhang, S. y Xiang, H. (2017). Antioxidant profiling of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): Off-line coupling heart-cutting HSCCC with HPLC-DAD-QTOF-MS/MS. *Food Chemistry*, 225: 55-61. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.122
- García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welte-Chanes, J. y Cano, MP. (2019). Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76(November): 1-13. doi: 10.1016/j.jfca.2018.11.002
- García-Pérez, JS., Robledo-Padilla, F., Cuellar-Bermudez, SP., Arévalo-Gallegos, A., Parra-Saldivar, R., Zavala-Yoe, R., Ramirez-Mendoza, RA. y Iqbal, HMN. (2017). Thermodynamics and statistical correlation between supercritical-CO₂ fluid extraction and bioactivity profile of locally available Mexican plants extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 122: 27-34. doi: 10.1016/j.supflu.2016.12.002
- Gene Ontology Consortium. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*, 32(90001): 258-261. doi: 10.1093/nar/gkh036
- Gentry, HS. (1982). *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press, Tucson, AZ, USA
- Ghandi, M., Huang, FW., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G V., Lo, CC., McDonald, ER., Barretina,

- J., Gelfand, ET., Bielski, CM., Li, H., Hu, K., Andreev-Drakhlin, AY., Kim, J., Hess, JM., Haas, BJ., Aguet, F., Weir, BA., Rothberg, M V., Paoella, BR., Lawrence, MS., Akbani, R., Lu, Y., Tiv, HL., Gokhale, PC., de Weck, A., Mansour, AA., Oh, C., Shih, J., Hadi, K., Rosen, Y., Bistline, J., Venkatesan, K., Reddy, A., Sonkin, D., Liu, M., Lehar, J., Korn, JM., Porter, DA., Jones, MD., Golji, J., Caponigro, G., Taylor, JE., Dunning, CM., Creech, AL., Warren, AC., McFarland, JM., Zamanighomi, M., Kauffmann, A., Stransky, N., Imielinski, M., Maruvka, YE., Cherniack, AD., Tsherniak, A., Vazquez, F., Jaffe, JD., Lane, AA., Weinstock, DM., Johannessen, CM., Morrissey, MP., Stegmeier, F., Schlegel, R., Hahn, WC., Getz, G., Mills, GB., Boehm, JS., Golub, TR., Garraway, LA. y Sellers, WR. (2019). Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature*, 569(7757): 503-508. doi: 10.1038/s41586-019-1186-3
- Giacobbe, S., Pezzella, C., Sannia, G. y Piscitelli, A. (2020). Old Enzymes at the Forefront of Lignocellulosic Waste Valorization. En: Schlosser D (eds) *Laccases in Bioremediation and Waste Valorisation, Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp 57-78
- Giannuzzo, AN., Boggetti, HJ., Nazareno, MA. y Mishima, HT. (2003). Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of Citrus paradisi. *Phytochemical Analysis*, 14(4): 221-223. doi: 10.1002/pca.706
- Gidda, SK. y Varin, L. (2006). Biochemical and molecular characterization of flavonoid 7-sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11-12): 628-636. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.10.004
- Gran View Research. (2016). Flavonoids Market. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-flavonoids-market#>. [Consulta: 04 Marzo 2018]
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, LD., Hidalgo, FJ., Miyashita, K., Camp, J van., Alasalvar, C., Ismail, AB., Elmore, S., Birch, GG., Charalampopoulos, D., Astley, SB., Pegg, R., Zhou, P. y Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? *Food Chemistry*, 264(1): 471-475. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.012
- Grosdidier, A., Zoete, V. y Michielin, O. (2007). EADock: Docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 67(4): 1010-1025. doi: 10.1002/prot.21367
- Gross, SM., Martin, JA., Simpson, J., Abraham-Juarez, MJ., Wang, Z. y Visel, A. (2013). *De novo* transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics*, 14(1): 1-14. doi: 10.1186/1471-2164-14-563
- Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M. y Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 3(3): 17-179. doi: 10.11648/j.ijnfs.20140303.16
- Guéniche, N., Huguet, A., Bruyere, A., Habauzit, D., Le Hégarat, L. y Fardel, O. (2021). Comparative *in silico* prediction of P-glycoprotein-mediated transport for 2010–2020 US FDA-approved drugs using six Web-tools. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 42(8): 393-398. doi: 10.1002/bdd.2299
- Guo, J., Wu, Y., Wang, G., Wang, T. y Cao, F. (2020). Integrated analysis of the transcriptome and metabolome in young and mature leaves of *Ginkgo biloba* L. *Industrial Crops and*

Products, 143(January): 111906. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111906

- Guo, L., Dixon, RA. y Paiva, NL. (1994). Conversion of vestitone to medicarpin in alfalfa (*Medicago sativa* L.) is catalyzed by two independent enzymes. Identification, purification, and characterization of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(35): 22372-22378. doi: 10.1016/s0021-9258(17)31799-4
- Gutiérrez Nava, Z., Jiménez-Aparicio, A., Herrera-Ruiz, M. y Jiménez-Ferrer, E. (2017). Immunomodulatory Effect of *Agave tequilana* Evaluated on an Autoimmunity Like-SLE Model Induced in Balb/c Mice with Pristane. *Molecules*, 22(6): 848. doi: 10.3390/molecules22060848
- Haas, BJ., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, PD., Bowden, J., Couger, MB., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, MD., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, CN., Henschel, R., LeDuc, RD., Friedman, N. y Regev, A. (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8): 1494-1512. doi: 10.1038/nprot.2013.084
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, JF., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, AM. y Dimmeler, S. (2004). Antioxidants Inhibit Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase and Delay Replicative Senescence of Endothelial Cells. *Circulation Research*, 94(6): 768-775. doi: 10.1161/01.RES.0000121104.05977.F3
- Hammuel, C., Yebpella, GG., Shallangwa, GA., Magomya, AM. y Agbaji, AS. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68(4): 535-539. Disponible en: https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2011/4/535.pdf [Consulta: 22 Febrero 2021)
- Han, R., Rai, A., Nakamura, M., Suzuki, H., Takahashi, H., Yamazaki, M. y Saito, K. (2016). *De Novo* Deep Transcriptome Analysis of Medicinal Plants for Gene Discovery in Biosynthesis of Plant Natural Products. En: *Methods in Enzymology*, 1st ed. Elsevier Inc., pp 19-45
- Herbert-Doctor, LA., Saavedra-Aguilar, M., Villarreal, ML., Cardoso-Taketa, A. y Vite-Vallejo, O. (2016). Insecticidal and Nematicidal Effects of *Agave tequilana* Juice against *Bemisia tabaci* and *Panagrellus redivivus*. *Southwestern Entomologist*, 41(1): 27-40. doi: 10.3958/059.041.0105
- Hernández-Ramos, L., García-Mateos, R., Ybarra-Moncada, MC. y Colinas-León, MT. (2020). Nutritional value and antioxidant activity of the maguey syrup (*Agave salmiana* and *A. mapisaga*) obtained through three treatments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(3): 1306-1316. doi: 10.15835/nbha48311947
- Hernández, R., Lugo, EC., Díaz, L. y Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *e- Gnosis Revista Digital Científica y tecnológica*, 3: 3-12. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/730/73000311.pdf> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Hilvo, M., Baranauskienė, L., Salzano, AM., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, SM., Di Fiore, A., De Simone, G., Lindfors, M., Jänis, J., Valjakka, J.,

- Pastoreková, S., Pastorek, J., Kulomaa, MS., Nordlund, HR., Supuran, CT. y Parkkila, S. (2008). Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41): 27799-27809. doi: 10.1074/jbc.M800938200
- Hoopes, GM., Hamilton, JP., Kim, J., Zhao, D., Wiegert-Rininger, K., Crisovan, E. y Buell, CR. (2018). Genome assembly and annotation of the medicinal plant *Calotropis gigantea*, a producer of anticancer and antimalarial cardenolides. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(2): 385-391. doi: 10.1534/g3.117.300331
- Houri, A. y Machaka-Houri, N. (2016). *Agave lechuguilla* as a potential biomass source in arid areas. *Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems*, 4(1): 89-93. doi: 10.13044/j.sdewes.2016.04.0008
- Huang, X., Wang, B., Xi, J., Zhang, Y., He, C., Zheng, J., Gao, J., Chen, H., Zhang, S., Wu, W., Liang, Y. y Yi, K. (2018). Transcriptome Comparison Reveals Distinct Selection Patterns in Domesticated and Wild Agave Species, the Important CAM Plants. *International Journal of Genomics*, 1-12. doi: 10.1155/2018/5716518
- Huang, X., Xiao, M., Xi, J., He, C., Zheng, J., Chen, H., Gao, J., Zhang, S., Wu, W., Liang, Y., Xie, L. y Yi, K. (2019). *De novo* transcriptome assembly of Agave H11648 by illumina sequencing and identification of cellulose synthase genes in Agave species. *Genes*, 10(2): 1-11. doi: 10.3390/genes10020103
- Huynh, NT., Smagghe, G., Gonzales, GB., Van Camp, J. y Raes, K. (2014). Enzyme-assisted extraction enhancing the phenolic release from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) outer leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30): 7468-7476. doi: 10.1021/jf502543c
- Ichino, T., Fuji, K., Ueda, H., Takahashi, H., Koumoto, Y., Takagi, J., Tamura, K., Sasaki, R., Aoki, K., Shimada, T. y Hara-Nishimura, I. (2014). GFS9/TT9 contributes to intracellular membrane trafficking and Flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 80(3): 410-423. doi: 10.1111/tpj.12637
- Iser, M., Martínez, Y., Ni, H., Jiang, H., Valdivié Navarro, M., Wu, X., Al-Dhabi, NA., Rosales, M., Duraipandiyar, V. y Fang, J. (2016). The Effects of *Agave fourcroydes* Powder as a Dietary Supplement on Growth Performance, Gut Morphology, Concentration of IgG, and Hematology Parameters in Broiler Rabbits. *BioMed Research International*, 2016. doi: 10.1155/2016/3414319
- Iser, M., Valdivié, M., Figueredo, L., Nuñez, E., Más, D. y Martínez, Y. (2020). Secondary metabolites, quality indicators and organoleptic characteristics of stems meal from *Agave fourcroydes* (Henequen). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1): 25-34
- Jasso-Padilla, I., Juárez-Flores, B., Alvarez-Fuentes, G., De la Cruz-Martínez, A., González-Ramírez, J., Moscota-Santillán, M., González-Chávez, M., Oros-Ovalle, C., Prell, F., Czermak, P. y Martínez-Gutierrez, F. (2017). Effect of prebiotics of *Agave salmiana* fed to healthy Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(2): 556-563. doi: 10.1002/jsfa.7764
- Jiang, J., Shao, Y., Li, A., Lu, C., Zhang, Y. y Wang, Y. (2013). Phenolic Composition Analysis and Gene Expression in Developing Seeds of Yellow- and Black-seeded *Brassica napus*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(6): 537-551. doi: 10.1111/jipb.12039

- Jin, Q., Yang, L., Poe, N. y Huang, H. (2018). Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends in Food Science and Technology*, 74(August 2017): 119-131. doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.014
- Joana Gil-Chávez, G., Villa, JA., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, EM. y González-Aguilar, GA. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1): 5-23. doi: 10.1111/1541-4337.12005
- Jorgensen, JH. y Ferraro, MJ. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11): 1749-1755. doi: 10.1086/647952
- Juárez, C., Durán, A., Valdez, P. y Fajardo, G. (2007). Performance of «Agave lecheguilla» natural fiber in portland cement composites exposed to severe environment conditions. *Building and Environment*, 42(3): 1151-1157. doi: 10.1016/j.buildenv.2005.12.005
- Juarez, DS., López, MLF., Sánchez-Robles, JH., Suárez, PCD la C., Charles, AVR. y Jiménez, LD. (2014). Variability of Saponins Concentration in Guishe Collected in Different Geographical Areas and Weather Conditions. *Journal of Chemistry and Biochemistry*, 2(2): 105-115. doi: 10.15640/jcb.v2n2a5
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S. y Nakaya, A. (2002). The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 42-46. doi: 10.1093/nar/30.1.42
- Karamova, N., Gumerova, S., Hassan, GO., Abdul-Hafeez, EY., Ibrahim, OHM., Orabi, MAA. y Ilinikaya, O. (2016). Antioxidant and Antimutagenic Potential of Extracts of Some Agavaceae Family Plants. *BioNanoScience*, 6(4): 591-593. doi: 10.1007/s12668-016-0286-x
- Kedare, SB. y Singh, RP. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4): 412-422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
- Kejík, Z., Kaplánek, R., Masařík, M., Babula, P., Matkowski, A., Filipenský, P., Veselá, K., Gburek, J., Sýkora, D., Martásek, P. y Jakubek, M. (2021). Iron complexes of flavonoids-antioxidant capacity and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2): 1-20. doi: 10.3390/ijms22020646
- Khalifa, I., Nawaz, A., Sobhy, R., Althawb, SA. y Barakat, H. (2020). Polyacylated anthocyanins constructively network with catalytic dyad residues of 3CLpro of 2019-nCoV than monomeric anthocyanins: A structural-relationship activity study with 10 anthocyanins using in-silico approaches. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 100: 107690. doi: 10.1016/j.jmgm.2020.107690
- Khan, J., Deb, PK., Priya, S., Medina, KD., Devi, R., Walode, SG. y Rudrapal, M. (2021). Dietary flavonoids: Cardioprotective potential with antioxidant effects and their pharmacokinetic, toxicological and therapeutic concerns. *Molecules*, 26(13): 1-24. doi: 10.3390/molecules26134021
- Kim, JH., Lee, HJ., Park, Y., Ra, KS., Shin, KS., Yu, KW. y Suh, HJ. (2013). Mucilage removal from cactus cladodes (*Opuntia humifusa* Raf.) by enzymatic treatment to improve extraction efficiency and radical scavenging activity. *LWT - Food Science and*

Technology, 51(1): 337-342. doi: 10.1016/j.lwt.2012.10.009

- Kirby, CW., Wu, T., Tsao, R. y McCallum, JL. (2013). Isolation and structural characterization of unusual pyranoanthocyanins and related anthocyanins from Staghorn sumac (*Rhus typhina* L.) via UPLC-ESI-MS, 1H, 13C, and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 94: 284-293. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.06.017
- Kleinenkuhnen, N., Büchel, F., Gerlich, SC., Kopriva, S. y Metzger, S. (2019). A novel method for identification and quantification of sulfated flavonoids in plants by neutral loss scan mass spectrometry. *Frontiers in Plant Science*, 10(July). doi: 10.3389/fpls.2019.00885
- Kong, CH., Zhao, H., Xu, XH., Wang, P. y Gu, Y. (2007). Activity and allelopathy of soil of flavone O-glycosides from rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15): 6007-6012. doi: 10.1021/jf0703912
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. y Sonnhammer, ELL. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3): 567-580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Kucharska, AZ., Sokól-Łętowska, A., Osziński, J., Piórecki, N. y Fecka, I. (2017). Iridoids, phenolic compounds and antioxidant activity of edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevast.). *Molecules*, 22(3): 1-20. doi: 10.3390/molecules22030405
- Kumar, A., Kumar, S., Bains, S., Vaidya, V., Singh, B., Kaur, R., Kaur, J. y Singh, K. (2016). *De novo* transcriptome analysis revealed genes involved in flavonoid and Vitamin C biosynthesis in *phyllanthus emblica* (L.). *Frontiers in Plant Science*, 7(October): 1-13. doi: 10.3389/fpls.2016.01610
- Kumar, BR. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6): 349-364. doi: 10.1016/j.jpha.2017.06.005
- Kuypers, FA., Rostad, CA., Anderson, EJ., Chahroudi, A., Jaggi, P., Wrammert, J., Mantus, G., Basu, R., Harris, F., Hanberry, B., Camacho-Gonzalez, A., Manoranjithan, S., Vos, M., Brown, LA. y Morris, CR. (2021). Secretory phospholipase A2 in SARS-CoV-2 infection and multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Experimental Biology and Medicine*, 2: 1-10. doi: 10.1177/15353702211028560
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, EA., Stærfeldt, HH., Rognes, T. y Ussery, DW. (2007). RNAMmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9): 3100-3108. doi: 10.1093/nar/gkm160
- Lam, PY., Liu, H. y Lo, C. (2015). Completion of Tricin Biosynthesis Pathway in Rice: Cytochrome P450 75B4 Is a Unique Chrysoeriol 5'-Hydroxylase. *Plant Physiology*, 168(4): 1527-1536. doi: 10.1104/pp.15.00566
- Larios-Cruz, R., Londoño-Hernández, L., Gómez-García, R., García-Galindo, I., Sepulveda, L., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar, CN. (2019). Extraction of Bioactive Molecules through Fermentation and Enzymatic Assisted Technologies. *High Value Fermentation Products*, 1: 27-59. doi: 10.1002/9781119460053.ch2
- Lauranson-Broyer, J. y Lebreton, P. (1993). Flavonoids and morphological traits of needles, as markers of natural hybridization between *Pinus uncinata* Ram. and *Pinus sylvestris* L.

Biochemical Systematics and Ecology, 21(2): 241-247. doi: 10.1016/0305-1978(93)90041-0

- Leong, HY., Chang, Y-K., Ooi, CW., Law, CL., Julkifle, AL. y Show, PL. (2019). Liquid Biphasic Electric Partitioning System as a Novel Integration Process for Betacyanins Extraction From Red-Purple Pitaya and Antioxidant Properties Assessment. *Frontiers in Chemistry*, 7(1). doi: 10.3389/fchem.2019.00201
- Li, MM., Xue, JY., Wen, YL., Guo, HS., Sun, XQ., Zhang, YM. y Hang, YY. (2015). Transcriptomic analysis of *Camellia ptilophylla* and identification of genes associated with flavonoid and caffeine biosynthesis. *Genetics and Molecular Research*, 14(4): 18731-18742. doi: 10.4238/2015.December.28.22
- Li, X., Kim, JK., Park, SY., Zhao, S., Kim, YB., Lee, S. y Park, SU. (2014). Comparative analysis of flavonoids and polar metabolite profiling of tanno-original and tanno-high rutin buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12): 2701-2708. doi: 10.1021/jf4049534
- Liang, W., Ni, L., Carballar-Lejarazú, R., Zou, X., Sun, W., Wu, L., Yuan, X., Mao, Y., Huang, W. y Zou, S. (2019). Comparative transcriptome among *Euscaphis konishii* Hayata tissues and analysis of genes involved in flavonoid biosynthesis and accumulation. *BMC Genomics*, 20(1): 1-14. doi: 10.1186/s12864-018-5354-x
- Liu, L., Han, R., Yu, N., Zhang, W., Xing, L., Xie, D. y Peng, D. (2018). A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense*. *PLoS ONE*, 13(5): 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0196592
- Liu, S., Liu, L., Tang, Y., Xiong, S., Long, J., Liu, Z. y Tian, N. (2017). Comparative transcriptomic analysis of key genes involved in flavonoid biosynthetic pathway and identification of a flavonol synthase from *Artemisia annua* L. *Plant Biology*, 19(4): 618-629. doi: 10.1111/plb.12562
- Liza, MS., Abdul Rahman, R., Mandana, B., Jinap, S., Rahmat, A., Zaidul, ISM. y Hamid, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3): 319-326. doi: 10.1016/j.fbp.2009.02.001
- Logan, SR. (2003). *Physical Chemistry for the Biomedical Sciences*. CRC Press
- López-Lozano, NE., Echeverría Molinar, A., Ortiz Durán, EA., Hernández Rosales, M. y Souza, V. (2020). Bacterial Diversity and Interaction Networks of *Agave lechuguilla* Rhizosphere Differ Significantly From Bulk Soil in the Oligotrophic Basin of Cuatro Ciénegas. *Frontiers in Plant Science*, 11(July): 1-14. doi: 10.3389/fpls.2020.01028
- Lucci, P., Saurina, J. y Núñez, O. (2017). Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 88: 1-24. doi: 10.1016/j.trac.2016.12.006
- Ma, XH., Ma, Y., Tang, JF., He, YL., Liu, YC., Ma, XJ., Shen, Y., Cui, GH., Lin, HX., Rong, QX., Guo, J. y Huang, LQ. (2015). The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Molecules*, 20(9): 16235-16254. doi: 10.3390/molecules200916235
- Maeda, HA. (2019). Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution

- to plant chemical diversity. *Frontiers in Plant Science*, 10(July): 1-8. doi: 10.3389/fpls.2019.00881
- Mandujano, MC., Pisanty, I. y Eguiarte, LE. (2020). *Plant Diversity and Ecology in the Chihuahuan Desert*. Springer International Publishing, Cham.
- Markham, KR. y Mabry, TJ. (1975). Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. *The Flavonoids*, : 45-77. doi: 10.1007/978-1-4899-2909-9_2
- Marston, A. y Hostettman, K. (2006). Separation and Quantification of Flavonoids. En: Andersen OM, Markham KR (eds) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC Press.
- Martinez-Gutierrez, F., Ratering, S., Juárez-Flores, B., Godinez-Hernandez, C., Geissler-Plaum, R., Prell, F., Zorn, H., Czermak, P. y Schnell, S. (2017). Potential use of *Agave salmiana* as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *Lwt*, 84: 151-159. doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.044
- Martínez Hernández, E. (2017). Actividad antifúngica de extractos vegetales contra *Botrytis cinerea* en fresa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
- Mathews, F. (1937). Lechuguilla (*Agave lechuguilla*) Poisoning in Sheep, Goats, and Laboratory Animals. College Station, Tex.: Texas Agricultural Experiment Station
- Matsumoto, S., Mizutani, M., Sakata, K. y Shimizu, B-I. (2012). Molecular cloning and functional analysis of the ortho-hydroxylases of p-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Phytochemistry*, 74: 49-57. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.11.009
- McKain, MR., Wickett, N., Zhang, Y., Ayyampalayam, S., Richard McCombie, W., Chase, MW., Chris Pires, J., DePamphilis, CW. y Leebens-Mack, J. (2012). Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). *American Journal of Botany*, 99(2): 397-406. doi: 10.3732/ajb.1100537
- Medellín-Castillo, NA., Hernández-Ramírez, MG., Salazar-Rábago, JJ., Labrada-Delgado, GJ. y Aragón-Piña, A. (2017). Bioadsorción de plomo (II) presente en solución acuosa sobre residuos de fibras naturales procedentes de la industria ixtlera (*Agave lechuguilla* Torr. Y *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey). *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(2): 269-280. doi: 10.20937/RICA.2017.33.02.08
- Mehmood, T., Nadeem, F., Qamar, SA., Bilal, M. y Iqbal, HMN. (2021). Bioconversion of Agro-Industrial Waste into Value-Added Compounds. En: Inamuddin, A. K (eds) *Sustainable Bioconversion of Waste to Value Added Products*. Advances in Science, Technology & Innovation (IEREK Interdisciplinary Series for Sustainable Development). Springer, Cham, pp 349-368
- Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, FD. y Aguilar, CN. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1): 445-450. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.07.017
- Merken, HM. y Beecher, GR. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance

- liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3): 577-599. doi: 10.1021/jf990872o
- Mierziak, J., Kostyn, K. y Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10): 16240-16265. doi: 10.3390/molecules191016240
- Mill, OL., Antunes-ricardo, M., García-cayuela, T. y Ibañez, E. (2019). Enzyme-assisted in situ supercritical fluid extraction of isorhamnetin conjugates from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill Marilena Antunes-Ricardo. *Institute of Food Science Research*, : 71-72
- Mithöfer, A. y Maffei, M. (2017). General mechanism of plant defense and plant toxins. En: Gopalakrishnanone P, Carlini CR, Ligabue-Braun R (eds) *Plant Toxins*. Springer Netherlands, pp 3-24
- Mizuuchi, Y., Shi, SP., Wanibuchi, K., Kojima, A., Morita, H., Noguchi, H. y Abe, I. (2009). Novel type III polyketide synthases from *Aloe arborescens*. *FEBS Journal*, 276(8): 2391-2401. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06971.x
- Monroy, YM., Rodrigues, RAF., Sartoratto, A. y Cabral, FA. (2016). Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol, and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107: 250-259. doi: 10.1016/j.supflu.2015.09.020
- Morales-Martínez, TK., Medina-Morales, MA., Ortíz-Cruz, AL., Rodríguez-De la Garza, JA., Moreno-Dávila, M., López-Badillo, CM. y Ríos-González, L. (2020). Consolidated bioprocessing of hydrogen production from agave biomass by *Clostridium acetobutylicum* and bovine ruminal fluid. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(26): 13707-13716. doi: 10.1016/j.ijhydene.2019.11.089
- Morales-Martínez, TK., Rios-González, LJ., Rodríguez-de la Garza, JA., Garza García, Y. y Castillo-Quiroz, D. (2014). Potencial de *Agave lechuguilla* como cultivo bioenergético den México. *CienciAcierta Universidad Autónoma de Coahuila*, 40: 13-15. doi: <http://www.cienciacierta.uadec.mx/articulos/cc40/CC40.pdf>
- Murias, MS., del Valle, JM. y Núñez, GA. (2017). Mathematical simulation of heat and mass transfer during controlled depressurization of supercritical CO₂ in extraction vessels. *The Journal of Supercritical Fluids*, 122: 43-51. doi: 10.1016/j.supflu.2016.11.009
- Nadar, SS., Rao, P. y Rathod, VK. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108(March): 309-330. doi: 10.1016/j.foodres.2018.03.006
- Nakayama, T., Takahashi, S. y Waki, T. (2019). Formation of flavonoid metabolons: Functional significance of protein-protein interactions and impact on flavonoid chemodiversity. *Frontiers in Plant Science*, 10(July). doi: 10.3389/fpls.2019.00821
- Narcia Velasco, M., Castillo Quiroz, D., Vázquez Ramos, JA. y Berlanga Reyes, CA. (2012). Turno técnico de la Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en el Noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(9): 81-88. doi: 10.29298/rmcf.v3i9.531
- Naturalista. (2021). Maguey Lechuguilla. <https://www.naturalista.mx/taxa/83105-Agave-lechuguilla>. [Consulta: 5 Septiembre 2021]

- Nava-Cruz, NY., Medina-Morales, MA., Martinez, JL., Rodriguez, R. y Aguilar, CN. (2015). Agave biotechnology: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4): 546-559. doi: 10.3109/07388551.2014.923813
- Negrier, C., Shima, M. y Hoffman, M. (2019). The central role of thrombin in bleeding disorders. *Blood Reviews*, 38: 100582. doi: 10.1016/j.blre.2019.05.006
- Nemzer, B., Vargas, L., Xia, X., Sintara, M. y Feng, H. (2018). Phytochemical and physical properties of blueberries, tart cherries, strawberries, and cranberries as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 262(April): 242-250. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.047
- Ning, K., Fermin, D. y Nesvizhskii, AI. (2012). Comparative analysis of different label-free mass spectrometry based protein abundance estimates and their correlation with RNA-Seq gene expression data. *Journal of Proteome Research*, 11(4): 2261-2271. doi: 10.1021/pr201052x
- Nobel, PS. (1998). *Los incomparables agaves y cactus*. Trillas, Mexico
- Nobel, PS. (2003). *Environmental Biology of Agaves and Cacti*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Nobel, PS. (1991). Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C3 and C4 plants. *New Phytologist*, 119(2): 183-205. doi: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb01022.x
- Nobel, PS. y Quero, E. (1986). Environmental Productivity Indices for a Chihuahuan Desert CAM Plant, *Agave Lechuguilla*. *Ecology*, 67(1): 1-11. doi: 10.2307/1938497
- Nobel, PS., Quero, E. y Linares, H. (1989). Root Versus Shoot Biomass: Responses to Water, Nitrogen, and Phosphorus Applications for *Agave lechuguilla*. *Botanical Gazette*, 150(4): 411-416. doi: <https://www.jstor.org/stable/2995441>
- Ockermann, P., Headley, L., Lizio, R. y Hansmann, J. (2021). A Review of the Properties of Anthocyanins and Their Influence on Factors Affecting Cardiometabolic and Cognitive Health. *Nutrients*, 13(8): 2831. doi: 10.3390/nu13082831
- Oliva-Rodríguez, AG., Quintero, J., Medina-Morales, MA., Morales-Martínez, TK., Rodríguez-De la Garza, JA., Moreno-Dávila, M., Aroca, G. y Rios González, LJ. (2019). *Clostridium* strain selection for co-culture with *Bacillus subtilis* for butanol production from agave hydrolysates. *Bioresource Technology*, 275(1): 410-415. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.085
- Olvera-García, V., Granado-Serrano, AB., Jové, M., Cassanyé, A., Cardador-Martínez, A., Portero-Otin, M. y Serrano, JC. (2017). Characterization of antioxidant properties and metabolite profile of *Agave atrovirens* extracts. *bioRxiv*, : 1-18. doi: 10.1101/184226
- Ontiveros-Guerra, J., Cerna-Chávez, E., Ochoa-Fuentes, Y., Landeros-Flores, J. y Hernández-Juárez, A. (2020). Insecticidal activity of plant extracts against whitefly nymphs *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in laboratory. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(1): 595-599. Disponible en: <https://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue1/PartI/8-1-33-821.pdf> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Ortiz-Estrada, ÁM., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, LR. y Martínez-Porchas, M. (2019).

- Predictive functional profiles using metagenomic 16S rRNA data: a novel approach to understanding the microbial ecology of aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 11(1): 234-245. doi: 10.1111/raq.12237
- Ortíz-Méndez, OH., Morales-Martínez, TK., Rios-González, LJ., Rodríguez-de la Garza, JA., Quintero, J. y Aroca, G. (2017). Bioethanol production from *Agave lechuguilla* biomass pretreated by autolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2): 467-476. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62052087013.pdf> [Consulta: 22 Febrero 2021].
- Osorio-Tobón, JF. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12): 4299-4315. doi: 10.1007/s13197-020-04433-2
- Paes, J., Dotta, R., Barbero, GF. y Martínez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *Journal of Supercritical Fluids*, 95: 8-16. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.025
- Palomo-Briones, R., López-Gutiérrez, I., Islas-Lugo, F., Galindo-Hernández, KL., Munguía-Aguilar, D., Rincón-Pérez, JA., Cortés-Carmona, MÁ., Alatraste-Mondragón, F. y Razo-Flores, E. (2018). Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7): 1423-1441. doi: 10.1007/s10098-017-1421-2
- Pando-Moreno, M., Eufrazio, O., Jurado, E. y Estrada, E. (2004). Post-harvest growth of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr., agavaceae) in northeastern Mexico. *Economic Botany*, 58(1): 78-82. doi: 10.1663/0013-0001(2004)058[0078:PGOLAL]2.0.CO;2
- Pando-Moreno, M., Pulido, R., Castillo, D., Jurado, E. y Jiménez, J. (2008). Estimating fiber for lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr., Agavaceae), a traditional non-timber forest product in Mexico. *Forest Ecology and Management*, 255(11): 3686-3690. doi: 10.1016/j.foreco.2008.02.053
- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L. y Napolitano, A. (2020). Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7(May): 1-27. doi: 10.3389/fnut.2020.00060
- Papoutsis, K., Pristijono, P., Golding, JB., Stathopoulos, CE., Bowyer, MC., Scarlett, CJ. y Vuong, Q V. (2017). Effect of vacuum-drying, hot air-drying and freeze-drying on polyphenols and antioxidant capacity of lemon (*Citrus limon*) pomace aqueous extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(4): 880-887. doi: 10.1111/ijfs.13351
- Pardo-Castaño, C., Velásquez, M. y Bolaños, G. (2015). Simple models for supercritical extraction of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 97: 165-173. doi: 10.1016/j.supflu.2014.09.044
- Park, CH., Yeo, HJ., Park, YE., Baek, S-A., Kim, JK. y Park, SU. (2019). Transcriptome analysis and metabolic profiling of *Lycoris radiata*. *Biology*, 8(3): 63. doi: 10.3390/biology8030063
- Peña-Rodríguez, A., Pelletier-Morreeuw, Z., García-Luján, J., Rodríguez-Jaramillo, MDC.,

- Guzmán-Villanueva, L., Escobedo-Fregoso, C., Tovar-Ramírez, D. y Reyes, AG. (2020). Evaluation of *Agave lechuguilla* by-product crude extract as a feed additive for juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 51(4). doi: 10.1111/are.14497
- Pereira, C., Barros, L. y Ferreira, IC. (2016a). Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4): 1068-1084. doi: 10.1002/jsfa.7446
- Pereira, P., Cebola, MJ., Oliveira, MC. y Bernardo-Gil, MG. (2016b). Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. *Journal of Supercritical Fluids*, 113: 1-9. doi: 10.1016/j.supflu.2015.09.006
- Perez-Vizcaino, F. y Fraga, CG. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 646(March): 107-112. doi: 10.1016/j.abb.2018.03.022
- Périno, S., Pierson, JT., Ruiz, K., Cravotto, G. y Chemat, F. (2016). Laboratory to pilot scale: Microwave extraction for polyphenols lettuce. *Food Chemistry*, 204: 108-114. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.088
- Petersen, TN., Brunak, S., Von Heijne, G. y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10): 785-786. doi: 10.1038/nmeth.1701
- Peukert, M., Weise, S., Röder, MS. y Matthies, IE. (2013). Development of SNP markers for genes of the phenylpropanoid pathway and their association to kernel and malting traits in barley. *BMC Genetics*, 14(1): 97. doi: 10.1186/1471-2156-14-97
- Pham, TN., Nguyen, VT., Toan, TQ., Cang, MH., Bach, LG. y Van Muoi, N. (2020). Effects of Various Processing Parameters on Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Activities of *Codonopsis javanica* Root Extract. *Natural Product Communications*, 15(9). doi: 10.1177/1934578X20953276
- Picaso, CS. y Blnacas, J. (2018). Etnobotánica De Wirikuta : Uso De Recursos Vegetales. 16(3): 54-77. Disponible en: <https://revistaetnobiologia.mx/index.php/etno/article/view/121/120> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Pieck, CA., Crampon, C., Charton, F. y Badens, E. (2015). Multi-scale experimental study and modeling of the supercritical fractionation process. *Journal of Supercritical Fluids*, 105: 158-169. doi: 10.1016/j.supflu.2015.01.021
- Pistelli, L. y Giorgi, I. (2012). Antimicrobial Properties of Flavonoids. En: Patra AK (ed) *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 33-91
- Pollastri, S. y Tattini, M. (2011). Flavonols: Old compounds for old roles. *Annals of Botany*, 108(7): 1225-1233. doi: 10.1093/aob/mcr234
- Portella, G., Passaro, C. y Chieffi, P. (2011). Aurora B: A New Prognostic Marker and Therapeutic Target in Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 18(4): 482-496. doi: 10.2174/092986711794480203
- Powell, S., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A., Kuhn, M., Muller, J., Arnold, R., Rattei, T., Letunic, I., Doerks, T., Jensen, LJ., Von Mering, C. y Bork, P. (2012). eggNOG v3.0: Orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. *Nucleic*

Acids Research, 40(D1): 284-289. doi: 10.1093/nar/gkr1060

- Prakash, S., Elavarasan, N., Subashini, K., Kanaga, S., Dhandapani, R., Sivanandam, M., Kumaradhas, P., Thirunavukkarasu, C. y Sujatha, V. (2020). Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via *in vitro* and *in silico* molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 1207: 127751. doi: 10.1016/j.molstruc.2020.127751
- Pucelik, B., Barzowska, A., Dąbrowski, JM. y Czarna, A. (2021). Diabetic kinome inhibitors—a new opportunity for β -cells restoration. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). doi: 10.3390/ijms22169083
- Puente-Garza, CA., Espinosa-Leal, CA. y García-Lara, S. (2018). Steroidal Saponin and Flavonol Content and Antioxidant Activity during Sporophyte Development of Maguey (*Agave salmiana*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(4): 287-294. doi: 10.1007/s11130-018-0684-z
- Puente-Garza, CA., García-Lara, S. y Gutiérrez-Uribe, JA. (2017a). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops and Products*, 105(December 2016): 225-230. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.014
- Puente-Garza, CA., Meza-Miranda, C., Ochoa-Martínez, D. y García-Lara, S. (2017b). Effect of *in vitro* drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115: 400-407. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.04.012
- Puri, M., Sharma, D. y Barrow, CJ. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1): 37-44. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014
- Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A. y Aranda, M. (2018). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant capacity of maqui (*Aristotelia chilensis*) berries and their relationships to drying methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11): 4168-4176. doi: 10.1002/jsfa.8938
- Rahmani, H. y Toumi Benali, F. (2016). Phenolic quantification and antioxidant activity of *Agave americana* leaves depending on solvent and geoclimatic area. *Advances in Environmental Biology*, 10(9): 194-200. Disponible en: <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/aeb/aeb/2016/September/194-200.pdf> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Rai, A., Saito, K. y Yamazaki, M. (2017). Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants. *Plant Journal*, 90(4): 764-787. doi: 10.1111/tpj.13485
- Rajkumar, AP., Qvist, P., Lazarus, R., Lescai, F., Ju, J., Nyegaard, M., Mors, O., Børglum, AD., Li, Q. y Christensen, JH. (2015). Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. *BMC Genomics*, 16(1): 1-8. doi: 10.1186/s12864-015-1767-y
- Ramakrishna, A. y Ravishankar, GA. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11): 1720-1731. doi: 10.4161/psb.6.11.17613
- Rameshkumar, MR., Indu, P., Arunagirinathan, N., Venkatadri, B., El-Serehy, HA. y Ahmad, A.

- (2021). Computational selection of flavonoid compounds as inhibitors against SARS-CoV-2 main protease, RNA-dependent RNA polymerase and spike proteins: A molecular docking study. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1): 448-458. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.028
- Ramírez-Cavazos, LI., Junghanns, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, DL., Hernández-Luna, C., Demarche, P., Enaud, E., García-Morales, R., Agathos, SN. y Parra, R. (2014). Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108: 32-42. doi: 10.1016/j.molcatb.2014.06.006
- Ramírez-Cortina, CR., Alonso-Gutiérrez, MS. y Rigal, L. (2012). Valorización de residuos agroindustriales del Tequila para alimentación de rumiantes. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XVIII(3): 449-457. doi: 10.5154/r.rchscfa.2011.08.059
- Raulf, M., Sander, I., Brüning, T. y König, S. (2019). Occupational asthma due to tampico fiber bystander exposure in a brush production company—case report and literature review. *Allergo Journal International*, 28(3): 73-77. doi: 10.1007/s40629-018-0085-8
- Reyes-Agüero, JA., Aguirre-Rivera, JR. y Peña-Valdivia, CB. (2000). Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. *Botanical Sciences*, 88(67): 75. doi: 10.17129/botsci.1626
- Reyes, A., Rivera-Peérez, C., Sáenz-Galindo, A., Fuentes-Avilés, JJ., Salinas-Salazar, C. y Parra-Saldívar, R. (2022). Merging Green Chemistry and Biorefinery: Consolidating Processes. En: Ríos-González LJ, Rodríguez-de la Garza JA, Medina-Morales MA, Aguilera CN (eds) *Handbook of Research on Bioenergy and Biomaterials Consolidated and Green Processes*. Taylor & Francis, pp 3-38
- Ríos-González, LJ., Medina-Morales, MA., Rodríguez-De la Garza, JA., Romero-Galarza, A., Medina, DD. y Morales-Martínez, TK. (2021). Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 319(September 2020): 124099. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124099
- Rios-González, LJ., Morales-Martínez, TK., Hernández-Enríquez, GG., De la Garza, JAR. y Moreno-Dávila, M. (2018). Hydrogen Production by Anaerobic Digestion from *Agave lechuguilla* Hydrolysates. *BioResources*, 13(4): 7766-7779. doi: 10.15376/BIORES.13.4.7766-7779
- Rios-González, LJ., Morales-Martínez, TK., Rodríguez-Flores, MF., Rodríguez-De la Garza, JA., Castillo-Quiroz, D., Castro-Montoya, AJ. y Martínez, A. (2017). Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse. *Bioresource Technology*, 242: 184-190. doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.039
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, MA., Verde-Star, MJ., Morales-Rubio, ME., Espinosa-Leal, C. y Garza-Padrón, RA. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience. pp. 46
- Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M. y de Feo, V. (2012). Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5): 6440-6451. doi: 10.3390/ijms13056440

- Rizza, S., Muniyappa, R., Iantorno, M., Kim, J.A., Chen, H., Pullikotil, P., Senese, N., Tesauro, M., Lauro, D., Cardillo, C. y Quon, M.J. (2011). Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(5): 782-792. doi: 10.1210/jc.2010-2879
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. y Smyth, G.K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1): 139-140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Rodríguez, K., Ah-Hen, K.S., Vega-Gálvez, A., Vásquez, V., Quispe-Fuentes, I., Rojas, P. y Lemus-Mondaca, R. (2016). Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT - Food Science and Technology*, 65: 537-542. doi: 10.1016/j.lwt.2015.08.050
- Rubluo, A., Palomino, G., Dolezel, J. y Mèndez, I. (2003). Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia*, 56(1): 37-46. doi: 10.1080/00087114.2003.10589305
- SAGARPA. (2009). Estudio orientado a identificar los mercados y canales de comercialización internacionales para la oferta de productos de Ixtle con valor agregado
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. y Kanazawa, K. (2003). Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 571-581
- Sánchez-Camargo, A del P., Ibáñez, E., Cifuentes, A. y Herrero, M. (2017). Bioactives Obtained From Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 76: 27-51. doi: 10.1016/bs.coac.2017.01.001
- Santana-Jiménez, A.Z., Quintero-Ramos, A., Sánchez-Madriral, M.A., Meléndez-Pizarro, C.O., Valdez-Cárdenas, M del C., Orizaga-Heredia, M del R., Méndez-Zamora, G. y Talamás-Abbud, R. (2020). Effects of UV-C irradiation and thermal processing on the microbial and physicochemical properties of agave tequilana Weber var. azul extracts at various pH values. *Processes*, 8(7): 841. doi: 10.3390/pr8070841
- Santos-Zea, L., Gutierrez-Uribe, J.A. y Benedito, J. (2021). Effect of Solvent Composition on Ultrasound-Generated Intensity and Its Influence on the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactives from Agave Bagasse (*Agave salmiana*). *Food Engineering Reviews*, 13(3): 713-725. doi: 10.1007/s12393-020-09260-x
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A., Cortes-Ceballos, E. y Gutierrez-Uribe, J. (2012). Agave (*Agave* spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8(3): 218-231. doi: 10.2174/157340712802762410
- Santos-Zea, L., Rosas-Pérez, A.M., Leal-Díaz, A.M. y Gutiérrez-Uribe, J.A. (2016). Variability in Saponin Content, Cancer Antiproliferative Activity and Physicochemical Properties of Concentrated Agave Sap. *Journal of Food Science*, 81(8): 2069-2075. doi: 10.1111/1750-3841.13376
- Santos, ÊRM., Oliveira, HNM., Oliveira, E.J., Azevedo, SHG., Jesus, AA., Medeiros, AM., Dariva, C. y Sousa, EMBD. (2017). Supercritical fluid extraction of *Rumex acetosa* L. roots: Yield,

- composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *Journal of Supercritical Fluids*, 122: 1-9. doi: 10.1016/j.supflu.2016.11.019
- Santos, J., Vieira, I., Braz-Filho, R. y Branco, A. (2015). Chemicals from *Agave sisalana* Biomass: Isolation and Identification. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 8761-8771. doi: 10.3390/ijms16048761
- Sato, M., Kondo, M., Goto, M., Kodama, A. y Hirose, T. (1998). Fractionation of citrus oil by supercritical countercurrent extractor with side-stream withdrawal. *Journal of Supercritical Fluids*, 13(1-3): 311-317. doi: 10.1016/S0896-8446(98)00065-5
- Scheinvar, E. (2018). Filogeografía de *Agave lechuguilla* y patrones de distribución de *Agave* en México. Universidad Autónoma de México
- Schilke, RM., Blackburn, CMR., Bamgbose, TT. y Woolard, MD. (2020). Interface of phospholipase activity, immune cell function, and atherosclerosis. *Biomolecules*, 10(10): 1-18. doi: 10.3390/biom10101449
- Secretaría de Economía. (2009). Norma mexicana NMX-FF-113-SCFI-2009. Productos de origen vegetal-fibra (ixtle) 100% de agave de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.)—especificaciones. *Diario Oficial de la Federación*. Disponible en: <https://doi.org/https://docplayer.es/201215208-Norma-mexicana-nmx-ff-113-scfi-2009.html> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- SEMARNAT. (2003). Norma Oficial Mexicana Nom-008-Semarnat-1996. *Diario Oficial de la Federación*. Disponible en: <https://doi.org/http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3310/1/nom-008-semarnat-1996.pdf> [Consulta: 15 Noviembre 2021]
- Shah, GN., Bonapace, G., Hu, PY., Strisciuglio, P. y Sly, WS. (2004). Carbonic anhydrase II deficiency syndrome (osteopetrosis with renal tubular acidosis and brain calcification): Novel mutations in CA2 identified by direct sequencing expand the opportunity for genotype-phenotype correlation. *Human Mutation*, 24(3): 272-272. doi: 10.1002/humu.9266
- Shakeel, SN., Aman, S., Haq, NU., Heckathorn, SA. y Luthe, D. (2013). Proteomic and Transcriptomic Analyses of *Agave americana* in Response to Heat Stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(4): 840-851. doi: 10.1007/s11105-013-0555-6
- Shan, B., Xie, JH., Zhu, JH. y Peng, Y. (2012). Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3): 579-587. doi: 10.1016/j.fbp.2011.09.004
- Sheldon, S. (1980). Ethnobotany of *Agave lechuguilla* and *Yucca carnerosana* in Mexico's Zona ixtlera. *Economic Botany*, 34(4): 376-390. doi: 10.1007/BF02858314
- Shen, J., Shao, W., Du, Z., Lu, H. y Li, J. (2020). Integrated metabolomic and transcriptomic analyses reveal differences in the biosynthetic pathway of anthocyanins in *Fragaria nilgerrensis* and *Fragaria pentaphylla*. *Scientia Horticulturae*, 271(May): 109476. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109476
- Shoeva, OY., Mock, HP., Kukoeva, T V., Börner, A. y Khlestkina, EK. (2016). Regulation of the flavonoid biosynthesis pathway genes in purple and black grains of *Hordeum vulgare*. *PLoS ONE*, 11(10): 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0163782

- Silva-Montellano, A. y Eguiarte, LE. (2003). Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. *American Journal of Botany*, 90(3): 377-387. doi: 10.3732/ajb.90.3.377
- Simpson, J., Martínez Hernández, A., Jazmín Abraham Juárez, M., Delgado Sandoval, S., Sánchez Villarreal, A. y Cortés Romero, C. (2011). Genomic resources and transcriptome mining in *Agave tequilana*. *GCB Bioenergy*, 3(1): 25-36. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01079.x
- Singleton, VL. y Rossi, JA. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, (16): 144-158
- Sisa, M., Bonnet, SL., Ferreira, D. y Van Der Westhuizen, JH. (2010). Photochemistry of flavonoids. *Molecules*, 15(8): 5196-5245. doi: 10.3390/molecules15085196
- Stefova, M., Stafilov, T. y Kulevanova, S. (2003). HPLC Analysis of Flavonoids. En: Cazes J (ed) *Encyclopedia of Chromatography*, 2004 Update Supplement. Taylor & Francis, pp 183-195
- Stewart, JR. (2015). Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. *Frontiers in Plant Science*, 6(September). doi: 10.3389/fpls.2015.00684
- Sun, J., Liu, JN., Fan, B., Chen, XN., Pang, DR., Zheng, J., Zhang, Q., Zhao, YF., Xiao, W., Tu, PF., Song, YL. y Li, J. (2019). Phenolic constituents, pharmacological activities, quality control, and metabolism of *Dracaena* species: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 244(August): 112138. doi: 10.1016/j.jep.2019.112138
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N. y Šmuc, T. (2011). Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7). doi: 10.1371/journal.pone.0021800
- Suzuki, N. y Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126(1): 45-51. doi: 10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2003). *Plant physiology*, 3rd ed. Sunderland, MA, US
- Takino, T., Koshikawa, N., Miyamori, H., Tanaka, M., Sasaki, T., Okada, Y., Seiki, M. y Sato, H. (2003). Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastatin by matrix metalloproteinases. *Oncogene*, 22(30): 4617-4626. doi: 10.1038/sj.onc.1206542
- Tang, H., Huang, L., Sun, C. y Zhao, D. (2020). Exploring the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and α -glucosidase based on experimental analysis and molecular docking studies. *Food and Function*, 11(4): 3332-3350. doi: 10.1039/c9fo02806d
- Taylor, NT., Davis, KM., Abad, H., McClung, MR. y Moran, MD. (2017). Ecosystem services of the Big Bend region of the Chihuahuan Desert. *Ecosystem Services*, 27: 48-57. doi: 10.1016/j.ecoser.2017.07.017
- Teles, YCF., Souza, MSR. y De Souza, M de FV. (2018). Sulphated flavonoids: Biosynthesis, structures, and biological activities. *Molecules*, 23(2): 1-11. doi: 10.3390/molecules23020480

- Torres, PHM., Sodero, ACR., Jofily, P. y Silva-Jr, FP. (2019). Key topics in molecular docking for drug design. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18): 1-29. doi: 10.3390/ijms20184574
- Tropicos. (2018). Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>. [Consulta: 4 Diciembre 2018]
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G. y Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3): 593-606. doi: 10.3390/12030593
- Tsouko, E., Maina, S., Ladakis, D., Kookos, IK. y Koutinas, A. (2020). Integrated biorefinery development for the extraction of value-added components and bacterial cellulose production from orange peel waste streams. *Renewable Energy*, 160: 944-954. doi: 10.1016/j.renene.2020.05.108
- Tugizimana, F., Steenkamp, PA., Piater, LA. y Dubery, IA. (2018). Mass spectrometry in untargeted liquid chromatography/mass spectrometry metabolomics: Electrospray ionisation parameters and global coverage of the metabolome. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(2): 121-132. doi: 10.1002/rcm.8010
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A. y Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3): 93. doi: 10.3390/medicines5030093
- Valdez-Vazquez, I., Alatraste-Mondragón, F., Arreola-Vargas, J., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., León-Becerril, E., Mendez-Acosta, HO., Ortíz, I. y Weber, B. (2020). A comparison of biological, enzymatic, chemical and hydrothermal pretreatments for producing biomethane from Agave bagasse. *Industrial Crops and Products*, 145(October 2019): 112160. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112160
- Valenzuela-Avenidaño, JP., Estrada Mota, IA., Gabriel Lizama, UC., Perera, RS., Valenzuela-Soto, EM. y Zúñiga Aguilar, JJ. (2005). Use of a simple method to isolate intact RNA from partially hydrated *Selaginella lepidophylla* plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23(2): 199-200. doi: 10.1007/BF02772713
- Velásquez-Martínez, A., Díaz-Díaz, A., Hernández-Escobar, CA. y Zaragoza-Contreras, EA. (2011). Agave lechuguilla Torrey fiber as reinforcement of polyester resin. *Polymer Composites*, 32(10): 1601-1606. doi: 10.1002/pc.21202
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science*, 296(5573): 1635-1636. doi: 10.1126/science.1071553
- Wajant, H. y Siegmund, D. (2019). TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(May): 1-14. doi: 10.3389/fcell.2019.00091
- Wang, M., Wang, J., Zhou, Y., Zhang, M., Xia, Q., Bi, W. y Chen, DDY. (2017a). Ecofriendly Mechanochemical Extraction of Bioactive Compounds from Plants with Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(7): 6297-6303. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b01378
- Wang, P., Liu, Y., Zhang, L., Wang, W., Hou, H., Zhao, Y., Jiang, X., Yu, J., Tan, H., Wang, Y., Xie, DY., Gao, L. y Xia, T. (2020a). Functional demonstration of plant flavonoid

- carbocations proposed to be involved in the biosynthesis of proanthocyanidins. *Plant Journal*, 101(1): 18-36. doi: 10.1111/tpj.14515
- Wang, T yang., Li, Q. y Bi, K shun. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1): 12-23. doi: 10.1016/j.ajps.2017.08.004
- Wang, X., Li, C., Zhou, C., Li, J. y Zhang, Y. (2017b). Molecular characterization of the C-glucosylation for puerarin biosynthesis in *Pueraria lobata*. *Plant Journal*, 90(3): 535-546. doi: 10.1111/tpj.13510
- Wang, X., Yang, Z., Su, F., Li, J., Boadi, EO., Chang, Y xu. y Wang, H. (2020b). Study on structure activity relationship of natural flavonoids against thrombin by molecular docking virtual screening combined with activity evaluation *in vitro*. *Molecules*, 25(2). doi: 10.3390/molecules25020422
- Warren, A., Chen, Y., Jones, A., Shibue, T., Hahn, WC., Boehm, JS., Vazquez, F., Tsherniak, A. y McFarland, JM. (2021). Global computational alignment of tumor and cell line transcriptional profiles. *Nature Communications*, 12(1): 1-12. doi: 10.1038/s41467-020-20294-x
- Wickham, H. (2011). Ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(2): 180-185. doi: 10.1002/wics.147
- Wong Paz, JE., Muñiz Márquez, DB., Martínez Ávila, GCG., Belmares Cerda, RE. y Aguilar, CN. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 474-481. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.06.001
- Wu, S., Tohge, T., Cuadros-Inostroza, Á., Tong, H., Tenenboim, H., Kooke, R., Méret, M., Keurentjes, JB., Nikoloski, Z., Fernie, AR., Willmitzer, L. y Brotman, Y. (2018). Mapping the Arabidopsis Metabolic Landscape by Untargeted Metabolomics at Different Environmental Conditions. *Molecular Plant*, 11(1): 118-134. doi: 10.1016/j.molp.2017.08.012
- Xu, L., He, W., Lu, M., Yuan, B., Zeng, M., Tao, G., Qin, F., Chen, J., Guan, Y. y He, Z. (2018). Enzyme-assisted ultrasonic-microwave synergistic extraction and UPLC-QTOF-MS analysis of flavonoids from Chinese water chestnut peels. *Industrial Crops and Products*, 117(March): 179-186. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.012
- Xu, W., Dubos, C. y Lepiniec, L. (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends in Plant Science*, 20(3): 176-185. doi: 10.1016/j.tplants.2014.12.001
- Xu, X., Yin, Z., Chen, J., Wang, X., Peng, D. y Shangguan, X. (2016). *De novo* transcriptome assembly and annotation of the leaves and callus of *Cyclocarya paliurus* (Bata1) Iljinskaja. *PLoS ONE*, 11(8): 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0160279
- Yang, Z., Alvarez, B V., Chakarova, C., Jiang, L., Karan, G., Frederick, JM., Zhao, Y., Sauvé, Y., Li, X., Zrenner, E., Wissinger, B., Den Hollander, Al., Katz, B., Baehr, W., Cremers, FP., Casey, JR., Bhattacharya, SS. y Zhang, K. (2005). Mutant carbonic anhydrase 4 impairs pH regulation and causes retinal photoreceptor degeneration. *Human Molecular Genetics*, 14(2): 255-265. doi: 10.1093/hmg/ddi023
- Yonekura-Sakakibara, K., Higashi, Y. y Nakabayashi, R. (2019). The Origin and Evolution of

- Plant Flavonoid Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10(August): 1-16. doi: 10.3389/fpls.2019.00943
- Young, MD., Wakefield, MJ., Smyth, GK. y Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11(2). doi: 10.1186/gb-2010-11-2-r14
- Zahedi, SM., Karimi, M. y Venditti, A. (2019). Plants adapted to arid areas: specialized metabolites. *Natural Product Research*, 35(19): 3314-3331. doi: 10.1080/14786419.2019.1689500
- Zhang, X., Wang, X., Wang, M., Cao, J., Xiao, J. y Wang, Q. (2018). Effects of different pretreatments on flavonoids and antioxidant activity of *Dryopteris erythrosora* leave. *bioRxiv*, 1-17. doi: 10.1101/353839
- Zhao, QY., Wang, Y., Kong, YM., Luo, D., Li, X. y Hao, P. (2011). Optimizing de novo transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study. *BMC bioinformatics*, 12. doi: 10.1186/1471-2105-12-S14-S2
- Zhou, P., Li, Q., Liu, G., Xu, N., Yang, Y., Zeng, W., Chen, A. y Wang, S. (2019). Integrated analysis of transcriptomic and metabolomic data reveals critical metabolic pathways involved in polyphenol biosynthesis in *Nicotiana tabacum* under chilling stress. *Functional Plant Biology*, 46(1): 30-43. doi: 10.1071/FP18099
- Zhou, W., Huang, Q., Wu, X., Zhou, Z., Ding, M., Shi, M., Huang, F., Li, S., Wang, Y. y Kai, G. (2017). Comprehensive transcriptome profiling of *Salvia miltiorrhiza* for discovery of genes associated with the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids. *Scientific Reports*, 7(1): 1-12. doi: 10.1038/s41598-017-10215-2
- Zhu, J., Xu, Q., Zhao, S., Xia, X., Yan, X., An, Y., Mi, X., Guo, L., Samarina, L. y Wei, C. (2020). Comprehensive co-expression analysis provides novel insights into temporal variation of flavonoids in fresh leaves of the tea plant (*Camellia sinensis*). *Plant Science*, 290: 110306. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110306
- Zhuang, B., Bi, ZM., Wang, ZY., Duan, L., Lai, CJS. y Liu, EH. (2018). Chemical profiling and quantitation of bioactive compounds in *Platycladi cacumen* by UPLC-Q-TOF-MS/MS and UPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154: 207-215. doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.005
- Zígolo, MA., Goytia, MR., Poma, HR., Rajal, VB. y Irazusta, VP. (2021). Virtual screening of plant-derived compounds against SARS-CoV-2 viral proteins using computational tools. *Science of the Total Environment*, 781: 146400. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146400
- Zoete, V., Daina, A., Bovigny, C. y Michielin, O. (2016). SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(8): 1399-1404. doi: 10.1021/acs.jcim.6b00174
- Zosel, K. (1981). Process for the decaffeination of coffee. United States. US4260639A

11 ANEXOS

Anexo A – Calidad de las librerías de RNA-Seq

A pesar de la buena calidad de las secuencias estimado por el valor de phred > 35 (Fig. A. 1), los adaptadores encontrados incluso en medio de las secuencias (Anexo A. 2) se tuvieron que eliminar por lo que se descartó el 0.55% de las lecturas. Por eso se pidió una resecuenciación de una librería para obtener la cantidad de datos suficiente para generar un transcriptoma de buena calidad.

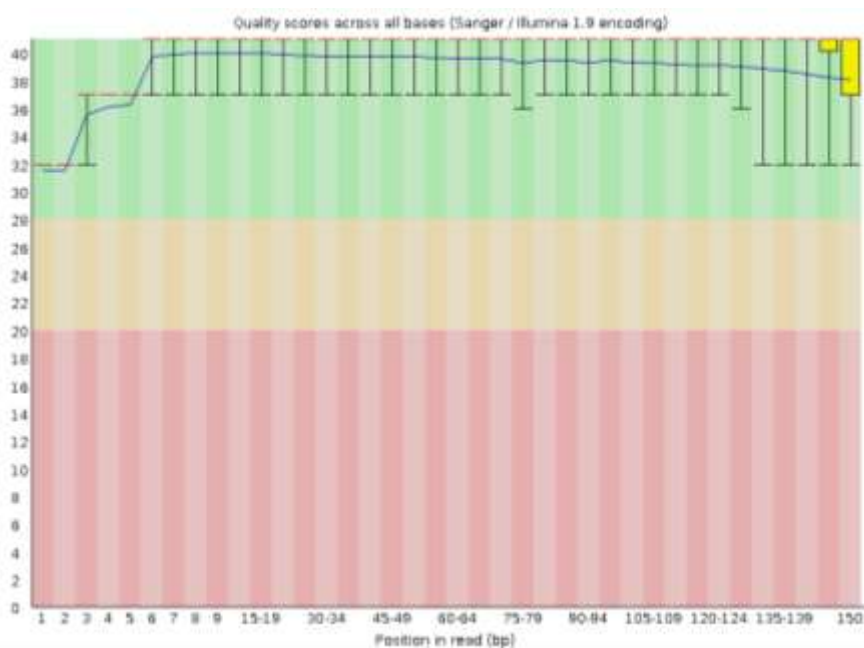


Figura A. 1. Representación gráfica de los valores de phred de las lecturas generadas por secuenciación en plataforma Illumina® HiSeq de una librería de *guishe* (FastQC).

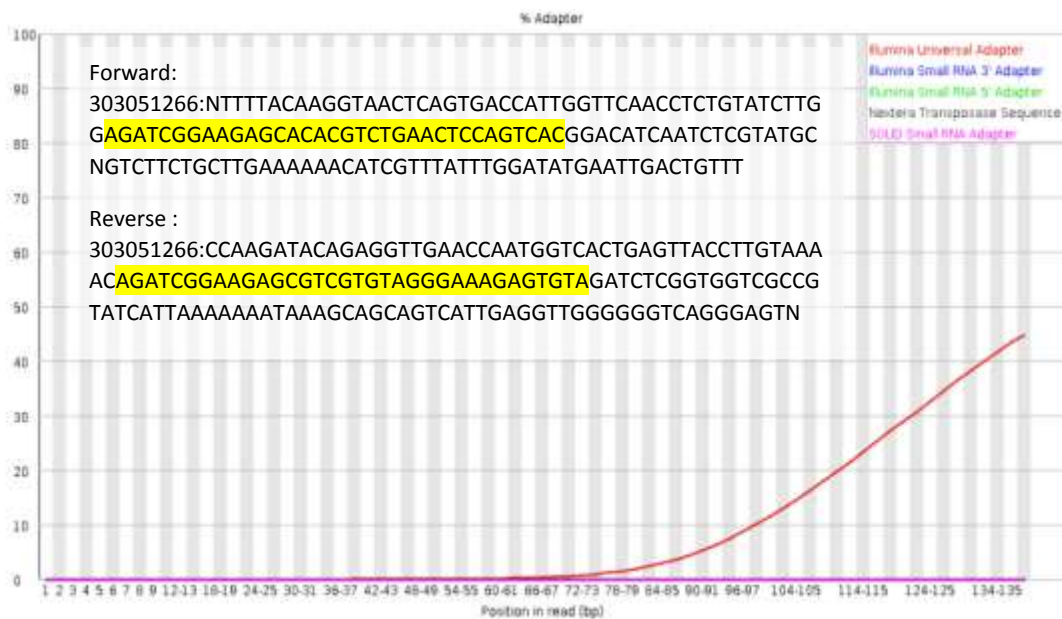


Figura A. 2. Contenido en adaptadores en las librerías de hoja y *gushe* y localización en las lecturas (FastQC).

Anexo B – Curvas estándares de los flavonoides

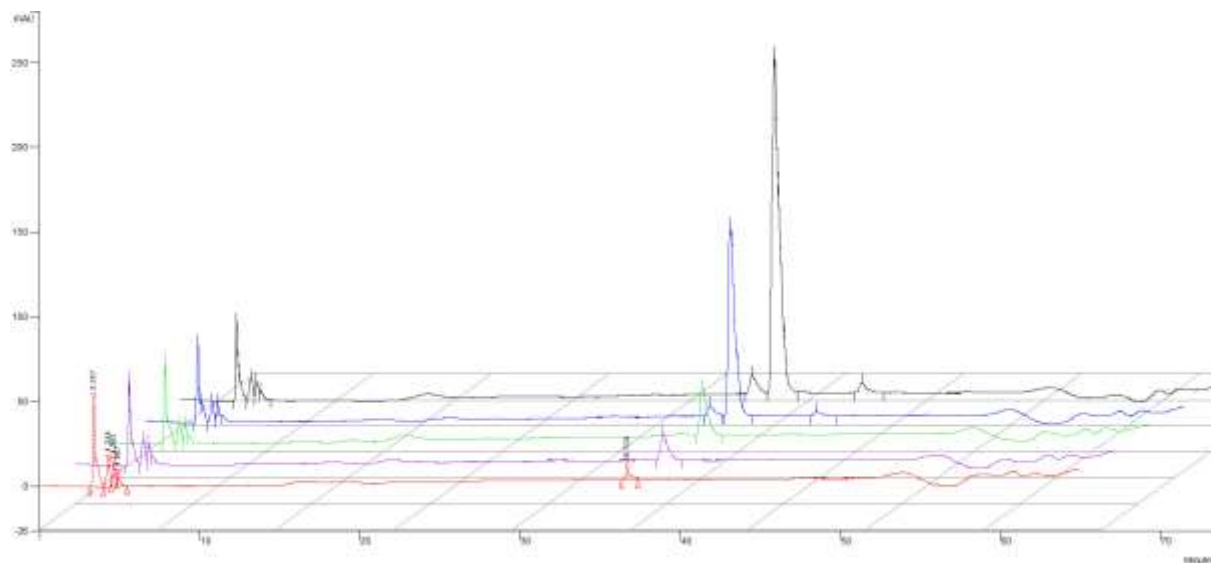


Figura B. 1. Espectros de la curva estándar de la delphinidina.

Tabla B. 1. Datos de las ecuaciones de regresión lineal de las curvas estándares de flavonoides y tiempo de retención característicos (RT).

Compuesto	RT (min)	Pendiente	Intersección	R ²
Apigenina	46.8	58519.0	2,00E+06	0.9930
Catequina	23.1	135631.0	8,00E+06	0.9733
Cianidina	30.3	77916.0	-2,00E+06	0.9918
Delphinidina	34.1	53501.0	9,91E+05	0.9651
Flavanona	14.7	21028.0	2,60E+05	0.9950
Hesperidina	37.1	31761.0	7,57E+05	0.9991
Isorhamnetina	16.2	7740.3	1,75E+05	0.9994
Kaempferol	48.3	114332.0	5,00E+06	0.9824
Naringenina	51.5	321808.0	2,00E+06	0.9867
Quercetina	44.2	232633.0	3,00E+06	0.9970

Anexo C – Predicción *in silico* de las proteínas blanco

Tabla C. 1. Predicción *in silico* de acoplamiento de los flavonoides del *guishe* con proteínas de las bases de datos PDB (human) y ChEMBL.

Target Class	Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID
Cytochrome P450	Cytochrome P450 19A1	CYP19A1	P11511	CHEMBL1978
Cytochrome P450	Cytochrome P450 1B1	CYP1B1	Q16678	CHEMBL4878
Cytochrome P450	Cytochrome P450 2C9	CYP2C9	P11712	CHEMBL3397
Cytochrome P450	Cytochrome P450 3A4	CYP3A4	P08684	CHEMBL340
Cytochrome P450	Thromboxane-A synthase	TBXAS1	P24557	CHEMBL1835
Electrochemical transporter	Equilibrative nucleoside transporter 1	SLC29A1	Q99808	CHEMBL1997
Electrochemical transporter	Low affinity sodium-glucose cotransporter	SLC5A4	Q9NY91	CHEMBL1770047
Electrochemical transporter	Sodium/glucose cotransporter 1	SLC5A1	P13866	CHEMBL4979
Electrochemical transporter	Sodium/glucose cotransporter 2	SLC5A2	P31639	CHEMBL3884
Electrochemical transporter	Solute carrier family 22 member 12	SLC22A12	Q96S37	CHEMBL6120
Electrochemical transporter	Solute carrier family 28 member 3	SLC28A3	Q9HAS3	CHEMBL5707
Enzyme	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14	HSD17B14	Q9BPX1	CHEMBL3712868
Enzyme	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	PFKFB3	Q16875	CHEMBL2331053
Enzyme	6-phosphogluconate dehydrogenase	PGD	P52209	CHEMBL3404
Enzyme	Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase	CES1	P23141	CHEMBL2265
Enzyme	Aldehyde reductase (by homology)	AKR1A1	P14550	CHEMBL2246
Enzyme	Aldo-keto reductase family 1 member B10	AKR1B10	O60218	CHEMBL5983
Enzyme	Aldo-keto reductase family 1 member C1 (by homology)	AKR1C1	Q04828	CHEMBL5905
Enzyme	Aldo-keto reductase family 1 member C2 (by homology)	AKR1C2	P52895	CHEMBL5847
Enzyme	Aldo-keto reductase family 1 member C4 (by homology)	AKR1C4	P17516	CHEMBL4999
Enzyme	Aldo-keto-reductase family 1 member C3	AKR1C3	P42330	CHEMBL4681
Enzyme	Aldose reductase	AKR1B1	P15121	CHEMBL1900
Enzyme	AMY1C	AMY1A	P04745	CHEMBL2478
Enzyme	Arachidonate 12-lipoxygenase	ALOX12	P18054	CHEMBL3687
Enzyme	Arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15	P16050	CHEMBL2903
Enzyme	Arginase-1 (by homology)	ARG1	P05089	CHEMBL1075097
Enzyme	Beta-glucuronidase	GUSB	P08236	CHEMBL2728
Enzyme	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	P16152	CHEMBL5586
Enzyme	Carboxylesterase 2	CES2	O00748	CHEMBL3180
Enzyme	DNA polymerase beta (by homology)	POLB	P06746	CHEMBL2392
Enzyme	DNA-(apurinic or apyrimidinic site)	APEX1	P27695	CHEMBL5619

	lyase			
Enzyme	DNA-3-methyladenine glycosylase	MPG	P29372	CHEMBL3396943
Enzyme	Dynamin-1	DNM1	Q05193	CHEMBL4958
Enzyme	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 1	HSD17B1	P14061	CHEMBL3181
Enzyme	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 2	HSD17B2	P37059	CHEMBL2789
Enzyme	Fucosyltransferase 4	FUT4	P22083	CHEMBL4996
Enzyme	Glyoxalase I	GLO1	Q04760	CHEMBL2424
Enzyme	Group X secretory phospholipase A2	PLA2G10	O15496	CHEMBL4342
Enzyme	Leucyl-tRNA synthetase	LARS	Q9P2J5	CHEMBL3258
Enzyme	Liver glycogen phosphorylase	PYGL	P06737	CHEMBL2568
Enzyme	Lymphocyte differentiation antigen CD38	CD38	P28907	CHEMBL4660
Enzyme	Myeloperoxidase	MPO	P05164	CHEMBL2439
Enzyme	NADPH oxidase 4	NOX4	Q9NPH5	CHEMBL1250375
Enzyme	Phospholipase A2 group 1B	PLA2G1B	P04054	CHEMBL4426
Enzyme	Phospholipase A2 group IIA	PLA2G2A	P14555	CHEMBL3474
Enzyme	Phospholipase A2 group V	PLA2G5	P39877	CHEMBL4323
Enzyme	PI3-kinase p110-alpha subunit	PIK3CA	P42336	CHEMBL4005
Enzyme	PI3-kinase p110-gamma subunit	PIK3CG	P48736	CHEMBL3267
Enzyme	PI3-kinase p85-alpha subunit	PIK3R1	P27986	CHEMBL2506
Enzyme	Poly [ADP-ribose] polymerase-1	PARP1	P09874	CHEMBL3105
Enzyme	Quinone reductase 2	NQO2	P16083	CHEMBL3959
Enzyme	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1	ERN1	O75460	CHEMBL1163101
Enzyme	Squalene monooxygenase (by homology)	SQLE	Q14534	CHEMBL3592
Enzyme	Tankyrase-1	TNKS	O95271	CHEMBL6164
Enzyme	Tankyrase-2	TNKS2	Q9H2K2	CHEMBL6154
Enzyme	Telomerase reverse transcriptase	TERT	O14746	CHEMBL2916
Enzyme	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	TDP1	Q9NUW8	CHEMBL1075138
Enzyme	Valyl-tRNA synthetase 2	VAR5	P26640	CHEMBL2612
Eraser	Lysine-specific demethylase 4D-like	KDM4E	B2RXH2	CHEMBL1293226
Eraser	NAD-dependent deacetylase sirtuin 1	SIRT1	Q96EB6	CHEMBL4506
Eraser	NAD-dependent deacetylase sirtuin 2	SIRT2	Q8IXJ6	CHEMBL4462
Family A G protein-coupled receptor	Adenosine A1 receptor	ADORA1	P30542	CHEMBL226
Family A G protein-coupled receptor	Adenosine A2a receptor	ADORA2A	P29274	CHEMBL251
Family A G protein-coupled receptor	Adenosine A2b receptor	ADORA2B	P29275	CHEMBL255
Family A G protein-coupled receptor	Adenosine A3 receptor	ADORA3	P0DMS8	CHEMBL256
Family A G protein-coupled receptor	Adrenergic receptor alpha-2	ADRA2C	P18825	CHEMBL1916
Family A G protein-coupled receptor	Alpha-2a adrenergic receptor	ADRA2A	P08913	CHEMBL1867
Family A G protein-coupled receptor	Dopamine D4 receptor	DRD4	P21917	CHEMBL219
Family A G protein-coupled receptor	Endothelin receptor ET-A	EDNRA	P25101	CHEMBL252
Family A G protein-coupled receptor	Free fatty acid receptor 1	FFAR1	O14842	CHEMBL4422

coupled receptor				
Family A G protein-coupled receptor	G-protein coupled receptor 35	GPR35	Q9HC97	CHEMBL1293267
Family A G protein-coupled receptor	Interleukin-8 receptor A	CXCR1	P25024	CHEMBL4029
Family A G protein-coupled receptor	Mu opioid receptor (by homology)	OPRM1	P35372	CHEMBL233
Family A G protein-coupled receptor	Neuromedin-U receptor 2	NMUR2	Q9GZQ4	CHEMBL1075144
Family A G protein-coupled receptor	Prostanoid EP1 receptor	PTGER1	P34995	CHEMBL1811
Family A G protein-coupled receptor	Prostanoid EP2 receptor	PTGER2	P43116	CHEMBL1881
Family A G protein-coupled receptor	Prostanoid EP3 receptor	PTGER3	P43115	CHEMBL3710
Family A G protein-coupled receptor	Serotonin 2c (5-HT2c) receptor	HTR2C	P28335	CHEMBL225
Family A G protein-coupled receptor	Vasopressin V2 receptor	AVPR2	P30518	CHEMBL1790
Family C G protein-coupled receptor	Metabotropic glutamate receptor 2 (by homology)	GRM2	Q14416	CHEMBL5137
Family C G protein-coupled receptor	Metabotropic glutamate receptor 5	GRM5	P41594	CHEMBL3227
Hydrolase	Acetylcholinesterase	ACHE	P22303	CHEMBL220
Hydrolase	Butyrylcholinesterase	BCHE	P06276	CHEMBL1914
Hydrolase	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	P60842	CHEMBL2052028
Hydrolase	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA	P10253	CHEMBL2608
Hydrolase	Pancreatic alpha-amylase	AMY2A	P04746	CHEMBL2045
Isomerase	DNA topoisomerase I	TOP1	P11387	CHEMBL1781
Isomerase	DNA topoisomerase II alpha	TOP2A	P11388	CHEMBL1806
Kinase	ALK tyrosine kinase receptor	ALK	Q9UM73	CHEMBL4247
Kinase	CaM kinase II beta	CAMK2B	Q13554	CHEMBL4121
Kinase	Casein kinase II alpha	CSNK2A1	P68400	CHEMBL3629
Kinase	CDK3/Cyclin E	CCNE1	P24864	CHEMBL3038471
		CDK3	Q00526	
Kinase	Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	P06493	CHEMBL308
Kinase	Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	P24941	CHEMBL301
Kinase	Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E1	CCNE1	P24864	CHEMBL1907605
		CDK2	P24941	
Kinase	Cyclin-dependent kinase 4	CDK4	P11802	CHEMBL331
Kinase	Cyclin-dependent kinase 5/CDK5 activator 1	CDK5R1	Q15078	CHEMBL1907600
		CDK5	Q00535	
Kinase	Cyclin-dependent kinase 6	CDK6	Q00534	CHEMBL2508
Kinase	Death-associated protein kinase 1	DAPK1	P53355	CHEMBL2558
Kinase	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B	DYRK1B	Q9Y463	CHEMBL5543
Kinase	Dual specificity protein kinase CLK1	CLK1	P49759	CHEMBL4224
Kinase	Dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A	DYRK1A	Q13627	CHEMBL2292
Kinase	Epidermal growth factor receptor erbB1	EGFR	P00533	CHEMBL203
Kinase	Fibroblast growth factor receptor 1	FGFR1	P11362	CHEMBL3650
Kinase	Focal adhesion kinase 1	PTK2	Q05397	CHEMBL2695

Kinase	G protein-coupled receptor kinase 6	GRK6	P43250	CHEMBL6144
Kinase	Glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B	P49841	CHEMBL262
Kinase	Hepatocyte growth factor receptor	MET	P08581	CHEMBL3717
Kinase	Insulin receptor	INSR	P06213	CHEMBL1981
Kinase	Insulin-like growth factor I receptor	IGF1R	P08069	CHEMBL1957
Kinase	MAP kinase p38 alpha	MAPK14	Q16539	CHEMBL260
Kinase	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP4K4	O95819	CHEMBL6166
Kinase	Myosin light chain kinase, smooth muscle	MYLK	Q15746	CHEMBL2428
Kinase	Nerve growth factor receptor Trk-A	NTRK1	P04629	CHEMBL2815
Kinase	NUAK family SNF1-like kinase 1	NUAK1	O60285	CHEMBL5784
Kinase	Protein kinase N1	PKN1	Q16512	CHEMBL3384
Kinase	Ribosomal protein S6 kinase alpha 3	RPS6KA3	P51812	CHEMBL2345
Kinase	Serine/threonine-protein kinase AKT	AKT1	P31749	CHEMBL4282
Kinase	Serine/threonine-protein kinase Aurora-A	AURKA	O14965	CHEMBL4722
Kinase	Serine/threonine-protein kinase Aurora-B	AURKB	Q96GD4	CHEMBL2185
Kinase	Serine/threonine-protein kinase NEK2	NEK2	P51955	CHEMBL3835
Kinase	Serine/threonine-protein kinase NEK6	NEK6	Q9HC98	CHEMBL4309
Kinase	Serine/threonine-protein kinase PIM1	PIM1	P11309	CHEMBL2147
Kinase	Serine/threonine-protein kinase PIM2	PIM2	Q9P1W9	CHEMBL4523
Kinase	Serine/threonine-protein kinase PIM3	PIM3	Q86V86	CHEMBL5407
Kinase	Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	P53350	CHEMBL3024
Kinase	Serine/threonine-protein kinase WEE1	WEE1	P30291	CHEMBL5491
Kinase	Stem cell growth factor receptor	KIT	P10721	CHEMBL1936
Kinase	Tyrosine-protein kinase LCK	LCK	P06239	CHEMBL258
Kinase	Tyrosine-protein kinase receptor FLT3	FLT3	P36888	CHEMBL1974
Kinase	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	AXL	P30530	CHEMBL4895
Kinase	Tyrosine-protein kinase SRC	SRC	P12931	CHEMBL267
Kinase	Tyrosine-protein kinase SYK	SYK	P43405	CHEMBL2599
Kinase	Vascular endothelial growth factor receptor 2	KDR	P35968	CHEMBL279
Ligand-gated ion channel	GABA-A receptor; alpha-1/beta-2/gamma-2	GABRA1 GABRB2 GABRG2	P14867 P47870 P18507	CHEMBL2095172
Ligand-gated ion channel	Neuronal acetylcholine receptor protein alpha-7 subunit	CHRNA7	P36544	CHEMBL2492
Lyase	Carbonic anhydrase I	CA1	P00915	CHEMBL261
Lyase	Carbonic anhydrase II	CA2	P00918	CHEMBL205
Lyase	Carbonic anhydrase III	CA3	P07451	CHEMBL2885
Lyase	Carbonic anhydrase IV	CA4	P22748	CHEMBL3729
Lyase	Carbonic anhydrase IX	CA9	Q16790	CHEMBL3594

Lyase	Carbonic anhydrase VA	CA5A	P35218	CHEMBL4789
Lyase	Carbonic anhydrase VB	CA5B	Q9Y2D0	CHEMBL3969
Lyase	Carbonic anhydrase VI	CA6	P23280	CHEMBL3025
Lyase	Carbonic anhydrase VII	CA7	P43166	CHEMBL2326
Lyase	Carbonic anhydrase XII	CA12	O43570	CHEMBL3242
Lyase	Carbonic anhydrase XIII	CA13	Q8N1Q1	CHEMBL3912
Lyase	Carbonic anhydrase XIV	CA14	Q9ULX7	CHEMBL3510
Lyase	Ornithine decarboxylase	ODC1	P11926	CHEMBL1869
Membrane receptor	Beta amyloid A4 protein	APP	P05067	CHEMBL2487
Nuclear receptor	Androgen Receptor	AR	P10275	CHEMBL1871
Nuclear receptor	Estrogen receptor alpha	ESR1	P03372	CHEMBL206
Nuclear receptor	Estrogen receptor beta	ESR2	Q92731	CHEMBL242
Nuclear receptor	Estrogen-related receptor alpha	ESRRA	P11474	CHEMBL3429
Nuclear receptor	Estrogen-related receptor beta	ESRRB	O95718	CHEMBL3751
Nuclear receptor	LXR-alpha	NR1H3	Q13133	CHEMBL2808
Nuclear receptor	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	P37231	CHEMBL235
Nuclear receptor	Retinoid X receptor alpha	RXRA	P19793	CHEMBL2061
		CCNB3	Q8WWL7	
Other cytosolic protein	Cyclin-dependent kinase 1/cyclin B	CDK1	P06493	CHEMBL2094127
		CCNB1	P14635	
		CCNB2	O95067	
Other cytosolic protein	Cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1	CDK1	P06493	CHEMBL1907602
		CCNB1	P14635	
Other cytosolic protein	Cyclin-dependent kinase 2/cyclin A	CDK2	P24941	
		CCNA1	P78396	CHEMBL2094128
		CCNA2	P20248	
Other cytosolic protein	Galectin-3	LGALS3	P17931	CHEMBL4531
Other cytosolic protein	Galectin-4	LGALS4	P56470	CHEMBL1671608
Other cytosolic protein	Galectin-8	LGALS8	O00214	CHEMBL5475
Other cytosolic protein	Galectin-9	LGALS9	O00182	CHEMBL5474
Other cytosolic protein	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	MCL1	Q07820	CHEMBL4361
Other cytosolic protein	Transforming protein p21/H-Ras-1	HRAS	P01112	CHEMBL2167
Other ion channel	Apoptosis regulator Bcl-2	BCL2	P10415	CHEMBL4860
Other ion channel	Apoptosis regulator Bcl-X	BCL2L1	Q07817	CHEMBL4625
Other ion channel	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	CFTR	P13569	CHEMBL4051
Oxidoreductase	Aldehyde dehydrogenase	ALDH2	P05091	CHEMBL1935
Oxidoreductase	Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	P09917	CHEMBL215
Oxidoreductase	Cyclooxygenase-1	PTGS1	P23219	CHEMBL221
Oxidoreductase	Cyclooxygenase-2	PTGS2	P35354	CHEMBL230
Oxidoreductase	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	IMPDH1	P20839	CHEMBL1822
Oxidoreductase	Monoamine oxidase A	MAOA	P21397	CHEMBL1951
Oxidoreductase	Monoamine oxidase B	MAOB	P27338	CHEMBL2039
Oxidoreductase	Steroid 5-alpha-reductase 1	SRD5A1	P18405	CHEMBL1787

Oxidoreductase	Tyrosinase	TYR	P14679	CHEMBL1973
Oxidoreductase	Xanthine dehydrogenase	XDH	P47989	CHEMBL1929
Phosphatase	Dual specificity protein phosphatase 3	DUSP3	P51452	CHEMBL2635
Phosphatase	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	PTPRS	Q13332	CHEMBL2396508
Phosphodiesterase	Phosphodiesterase 4B	PDE4B	Q07343	CHEMBL275
Phosphodiesterase	Phosphodiesterase 4D	PDE4D	Q08499	CHEMBL288
Phosphodiesterase	Phosphodiesterase 5A	PDE5A	O76074	CHEMBL1827
Primary active transporter	ATP-binding cassette sub-family G member 2	ABCG2	Q9UNQ0	CHEMBL5393
Primary active transporter	Multidrug resistance-associated protein 1	ABCC1	P33527	CHEMBL3004
Primary active transporter	P-glycoprotein 1	ABCB1	P08183	CHEMBL4302
Primary active transporter	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	P55072	CHEMBL1075145
Protease	Beta-secretase 1	BACE1	P56817	CHEMBL4822
Protease	Cathepsin (B and K)	CTSB	P07858	CHEMBL4072
Protease	Epoxide hydratase	EPHX2	P34913	CHEMBL2409
Protease	Kallikrein 1	KLK1	P06870	CHEMBL2319
Protease	Kallikrein 2	KLK2	P20151	CHEMBL2442
Protease	Matrix metalloproteinase 1	MMP1	P03956	CHEMBL332
Protease	Matrix metalloproteinase 12	MMP12	P39900	CHEMBL4393
Protease	Matrix metalloproteinase 13	MMP13	P45452	CHEMBL280
Protease	Matrix metalloproteinase 14	MMP14	P50281	CHEMBL3869
Protease	Matrix metalloproteinase 2	MMP2	P08253	CHEMBL333
Protease	Matrix metalloproteinase 3	MMP3	P08254	CHEMBL283
Protease	Matrix metalloproteinase 7	MMP7	P09237	CHEMBL4073
Protease	Matrix metalloproteinase 8	MMP8	P22894	CHEMBL4588
Protease	Matrix metalloproteinase 9	MMP9	P14780	CHEMBL321
Protease	Plasminogen	PLG	P00747	CHEMBL1801
Protease	Thrombin	F2	P00734	CHEMBL204
Protease	Thrombin and coagulation factor X	F10	P00742	CHEMBL244
Secreted protein	Insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	P17936	CHEMBL3997
Secreted protein	Interleukin-2	IL2	P60568	CHEMBL5880
Secreted protein	Plasminogen activator inhibitor-1	SERPINE1	P05121	CHEMBL3475
Secreted protein	Testis-specific androgen-binding protein	SHBG	P04278	CHEMBL3305
Secreted protein	TNF-alpha	TNF	P01375	CHEMBL1825
Secreted protein	Transthyretin	TTR	P02766	CHEMBL3194
Secreted protein	Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	P15692	CHEMBL1783
Surface antigen	Coagulation factor VII/tissue factor	F3	P13726	CHEMBL4081
Taste family G protein-coupled receptor	Taste receptor type 2 member 31	TAS2R31	P59538	CHEMBL2034804
Transcription factor	Aryl hydrocarbon receptor	AHR	P35869	CHEMBL3201
Transcription factor	Hypoxia-inducible factor 1 alpha	HIF1A	Q16665	CHEMBL4261
Transcription factor	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	STAT1	P42224	CHEMBL6101
Transcription factor	Tumour suppressor p53/oncoprotein Mdm2	TP53	P04637	CHEMBL4096

Transferase	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 7	FUT7	Q11130	CHEMBL3596077
Transferase	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	ST6GAL1	P15907	CHEMBL3596075
Transferase	CMP-N-acetylneuraminase-beta-1,4-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase	ST3GAL3	Q11203	CHEMBL3596076
Unclassified protein	14-3-3 protein gamma	YWHAG	P61981	CHEMBL1293296
Unclassified protein	Alpha-synuclein	SNCA	P37840	CHEMBL6152
Unclassified protein	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha	HNF4A	P41235	CHEMBL5398
Unclassified protein	Microtubule-associated protein tau	MAPT	P10636	CHEMBL1293224
Unclassified protein	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	NAE1	Q13564	CHEMBL2016431
Unclassified protein	Placenta growth factor	PGF	P49763	CHEMBL1697671
Unclassified protein	Troponin, cardiac muscle	TNNC1 TNNT2 TNNI3	P63316 P45379 P19429	CHEMBL2095202
Voltage-gated ion channel	HERG	KCNH2	Q12809	CHEMBL240
Writer	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNMT1	P26358	CHEMBL1993
Writer	Protein-arginine N-methyltransferase 1	PRMT1	Q99873	CHEMBL5524

Anexo D – Taxonomía de las especies asociadas a la lechuguilla

Tabla D. 1. Especies vegetales asociadas a *A. lechuguilla* en la zona de muestreo. Identificación realizada por el Dr. David Castillo-Quiroz.

Matehuala (San Luis Potosí)		Cosme-Tuxtepec (Coahuila)	
Nombre científico	Familia	Nombre científico	Familia
<i>Hechtia texensis</i> S. Watson	Bromeliaceae	<i>Larrea tridentata</i> (DC.) Colville	Zygophyllaceae
<i>Karwinskia humboldtiana</i> (Schult.) Zucc.	Rhamnaceae	<i>Fouquieria splendens</i> Engelm.	Fouquieriaceae
<i>Yucca carnerosana</i> (Trel.) McKelvey	Asparagaceae	<i>Euphorbia antisyphilitica</i> Zucc.	Euphorbiaceae
<i>Echinocactus platyacanthus</i> Link and Otto	Cactaceae	<i>Hechtia texensis</i> S. Watson	Bromeliaceae
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv.	Euphorbiaceae	<i>Opuntia microdasys</i> (Lehm.) Pfeiff.	Cactaceae
<i>Leucophyllum laevigatum</i> Standl.	Scrophulariaceae	<i>Flourensia cernua</i> DC.	Asteraceae
<i>Viguiera stenoloba</i> S.F. Blake	Asteraceae	<i>Echinocereus stramineus</i> (Engelm.) Rümpler	Cactaceae
<i>Prosopis glandulosa</i> (DC.) F.M. Knuth	Fabaceae	<i>Cylindropuntia leptocaulis</i> (DC.) F.M. Knuth	Cactaceae
<i>Notholaena sinuata</i> (Lag. ex Sw.) Kaulf.	Pteridaceae	<i>Cylindropuntia kleiniae</i> (DC.) F.M. Knuth	Cactaceae
<i>Cylindropuntia kleiniae</i> (DC.) F.M. Knuth	Cactaceae	<i>Acacia berlandieri</i> Benth.	Fabaceae
<i>Larrea tridentata</i> (DC.) Coville	Zygophyllaceae	<i>Vachellia constricta</i> (Benth.) Seigler and Ebinger	Fabaceae
<i>Cylindropuntia imbricat</i> (Haw.) F.M. Knuth	Cactaceae	<i>Epithelantha micromeris</i> (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britton & Rose	Cactaceae
		<i>Agave striata</i> subsp. Falcata (Engelm.) Gentry	Asparagaceae
		<i>Echinocereus conglomeratus</i> C.F. Först.	Cactaceae
		<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv	Euphorbiaceae

ANEXO E – Predicción ADMET *in silico***Tabla E. 1.** Resultados de predicción *in silico* de las características físico-químicas y farmacodinámica de los flavonoides del *guishe* de *A. lechuguilla*.

	A	Ca	Cy	D	H	I	K	N	Q
Formula	C15H10 O5	C15H14 O6	C15H11 O6	C15H11 O7	C28H34 O15	C16H12 O7	C15H10 O6	C15H12 O5	C15H12 O5
MW	270.24	290.27	287.24	303.24	610.56	316.26	286.24	272.25	272.25
#Heavy atoms	20	21	21	22	43	23	21	20	20
#Aromatic heavy atoms	16	12	16	16	12	16	16	12	12
Fraction Csp3	0	0.2	0	0	0.54	0.06	0	0.13	0.13
#Rotatable bonds	1	1	1	1	7	2	1	1	1
#H-bond acceptors	5	6	6	7	15	7	6	5	5
#H-bond donors	3	5	5	6	8	4	4	3	3
MR	73.99	74.33	76.17	78.2	141.41	82.5	76.01	71.57	71.57
TPSA	90.9	110.38	114.29	134.52	234.29	120.36	111.13	86.99	86.99
iLOGP	1.89	1.47	-2.62	-2.79	1.72	2.35	1.7	1.75	1.75
XLOGP3	3.02	0.36	0.77	0.41	-0.14	1.87	1.9	2.52	2.52
WLOGP	2.58	1.22	2.91	2.61	-1.48	2.29	2.28	2.19	2.19
MLOGP	0.52	0.24	0.32	-0.22	-3.04	-0.31	-0.03	0.71	0.71
Silicos-IT Log P	2.52	0.98	0.24	-0.25	-1.55	2.06	2.03	2.05	2.05
Consensus Log P	2.11	0.85	0.32	-0.05	-0.9	1.65	1.58	1.84	1.84
ESOL Log S	-3.94	-2.22	-2.6	-2.45	-3.28	-3.36	-3.31	-3.49	-3.49
ESOL Solubility (mg/ml)	3.07E-02	1.74E+00	7.15E-01	1.07E+00	3.19E-01	1.38E-01	1.40E-01	8.74E-02	8.74E-02
ESOL Solubility (mol/l)	1.14E-04	5.98E-03	2.49E-03	3.54E-03	5.23E-04	4.35E-04	4.90E-04	3.21E-04	3.21E-04
ESOL Class	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Ali Log S	-4.59	-2.24	-2.75	-2.8	-4.33	-4.02	-3.86	-3.99	-3.99
Ali Solubility (mg/ml)	6.88E-03	1.66E+00	5.10E-01	4.79E-01	2.88E-02	3.03E-02	3.98E-02	2.77E-02	2.77E-02
Ali Solubility (mol/l)	2.55E-05	5.72E-03	1.78E-03	1.58E-03	4.72E-05	9.57E-05	1.39E-04	1.02E-04	1.02E-04
Ali Class	Moderately soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Moderately soluble	Moderately soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Silicos-IT LogSw	-4.4	-2.14	-2.66	-2.07	-0.58	-3.94	-3.82	-3.42	-3.42
Silicos-IT Solubility (mg/ml)	1.07E-02	2.09E+00	6.34E-01	2.56E+00	1.60E+02	3.65E-02	4.29E-02	1.04E-01	1.04E-01
Silicos-IT Solubility	3.94E-05	7.19E-03	2.21E-03	8.43E-03	2.62E-01	1.15E-04	1.50E-04	3.82E-04	3.82E-04

(mol/l)	Moderately soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Silicos-IT class									
GI absorption	High	High	High	High	Low	High	High	High	High
BBB permeant	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Pgp substrate	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
CYP1A2 inhibitor	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No
CYP3A4 inhibitor	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
log _{Kp} (cm/s)	-5.8	-7.82	-7.51	-7.86	-10.12	-6.9	-6.7	-6.17	-6.17
Lipinski #violations	0	0	0	1	3	0	0	0	0
Ghose #violations	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Veber #violations	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Egan #violations	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Muegge #violations	0	0	0	1	4	0	0	0	0
Bioavailability Score	0.55	0.55	0.55	0.55	0.17	0.55	0.55	0.55	0.55
PAINS #alerts	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Brenk #alerts	0	1	2	2	0	0	0	0	0
Leadlikeness #violations	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Synthetic Accessibility	2.96	3.5	3.15	3.18	6.34	3.26	3.14	3.01	3.01