

Microwave-assisted extraction of flavonoids from lechuguilla guishe

Extracción asistida por microondas de flavonoides a partir de guishe de lechuguilla

Vianey de J. Cervantes-Güicho¹; Leopoldo J. Ríos-González¹;
Ana G. Reyes-Alvarado²; Thelma K. Morales-Martínez^{1*}

¹Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza, Saltillo, Coahuila, C. P. 25280, MÉXICO.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste - Instituto Politécnico Nacional. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, Baja California Sur, C. P. 23096, MÉXICO.

*Corresponding author: thelma_morales@uadec.edu.mx, tel. 844 213 17 16.

Abstract

Introduction: Guishe is a plant residue generated during the carving of *Agave lechuguilla* leaves for fiber extraction. The current burning and accumulation of guishe in open fields represents an ecological problem. Therefore, its use as a raw material for the extraction of phytochemicals is a promising strategy for its valorization.

Objective: To evaluate the effect of different parameters in microwave-assisted extraction on the flavonoid content in *Agave lechuguilla* guishe biomass.

Methodology: The effects of different time, temperature, mass:volume ratio and solvent concentration (ethanol) conditions on the flavonoid extraction process were evaluated using a single-factor experimental design. Subsequently, the extract obtained under the best conditions was characterized.

Results: The experimental design indicated that the optimal conditions to obtain a higher flavonoid extraction ($15.34 \pm 0.03 \text{ mg}_{\text{QE}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dm}$) are: irradiation time of 10 min, temperature of 45 °C, mass:volume ratio of 1:25 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and ethanol concentration of 70 %.

Limitations of the study: Raising the temperature and irradiation time in the microwave-assisted extraction process could reduce the concentration of flavonoids due to the possible thermal degradation of these compounds.

Originality: Microwave-assisted extraction was shown to be superior to other methods for extracting flavonoids from guishe.

Conclusions: Microwave-assisted extraction of flavonoids is an alternative for valorizing guishe and decreasing the environmental impact associated with this agricultural waste.

Keywords: valorization, unconventional extraction, guishe, phytochemicals, antioxidants, green chemistry.

Resumen

Introducción: El guishe es un residuo vegetal generado durante el tallado de las hojas de *Agave lechuguilla* para la extracción de fibras. Actualmente, su quema y acumulación en campo abierto representa un problema ecológico. Por lo tanto, su uso como materia prima para la extracción de fitoquímicos es una estrategia prometedora para su valorización.

Objetivo: Evaluar el efecto de diferentes parámetros en la extracción asistida por microondas sobre el contenido de flavonoides en biomasa de guishe de *Agave lechuguilla*.

Metodología: Se evaluaron los efectos de diferentes condiciones de tiempo, temperatura, relación masa:volumen y concentración de solvente (etanol) en el proceso de extracción de flavonoides mediante un diseño experimental de un solo factor. Posteriormente, se caracterizó el extracto obtenido con las mejores condiciones.

Resultados: El diseño experimental indicó que las condiciones óptimas para obtener una mayor extracción de flavonoides ($15.34 \pm 0.03 \text{ mg}_{\text{EQ}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ms}$) son: tiempo de irradiación de 10 min, temperatura de 45 °C, relación masa:volumen de 1:25 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) y concentración de etanol del 70 %.

Limitaciones del estudio: Elevar la temperatura y el tiempo de irradiación en el proceso de extracción asistida por microondas podría reducir la concentración de flavonoides debido a la posible degradación térmica de estos compuestos.

Originalidad: Se demostró que la extracción asistida por microondas es superior a otros métodos de extracción de flavonoides a partir de guishe.

Conclusiones: La extracción de flavonoides asistida por microondas es una alternativa para la valorización del guishe y para disminuir el impacto ambiental asociado con este residuo agrícola.

Palabras clave: valorización, extracción no convencional, guishe, fitoquímicos, antioxidantes, química verde.

Please cite this article as follows (APA 7): Cervantes-Güicho, V. J., Ríos-González, L. J., Reyes-Alvarado, A. G., & Morales-Martínez, T. K. (2024). Microwave-assisted extraction of flavonoids from lechuguilla guishe. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 16(2) 39-53. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2024.08.030>



Ingeniería Agrícola
y Biosistemas

<https://revistas.chapingo.mx/inagbi/>

Introduction

In recent years, there has been increasing interest in the extraction of phytochemicals from plant residues in the primary sector, due to the potential health benefits of these compounds (Kussmann et al., 2023). Among the most relevant phytochemicals are flavonoids, which are bioactive compounds present in plants derived from secondary metabolism (Nagula & Wairkar, 2019). Structurally, flavonoids consist of a C₆-C₃-C₆ ring with several substitutes that create the different subclasses: flavones, flavanol, flavonol, isoflavones, and anthocyanins (Wang et al., 2018).

Flavonoids have mainly antioxidant (Alara et al., 2020), anti-inflammatory (Dong et al., 2019), antimicrobial (Saleem & Saeed, 2020), anticancer (Thamrongwatwongsa et al., 2024), photoprotective and anti-aging (Landa-Cansigno et al., 2023) properties. Numerous studies have analyzed the flavonoid profiles of plant materials from agro-industrial by-products (León-Roque et al., 2023), which are considered a viable alternative for the extraction of these compounds due to their abundance, low cost and easy accessibility (Oleszek et al., 2023). The search for new sources of bioactive compounds has gained interest due to their potential application in the cosmetic, pharmaceutical and agricultural industries.

The exploitation of *Agave lechuguilla* Torr. generates large amounts of waste from fiber extraction. This wild plant, common in the arid and semi-arid regions of the southern United States and northeastern Mexico, covers more than 20 million hectares in the latter country, corresponding to 10 % of the national territory. Its distribution is centered in the states of Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas and Zacatecas (Castillo et al., 2011). The extraction of *A. lechuguilla* fiber is a livelihood activity for families in rural communities (Castillo et al., 2011). However, fiber represents only 15 % of the part of the plant that is used, while bagasse, or guishe, represents 85 % (Morreeuw et al., 2021b), which generates about 150 000 t·year⁻¹ nationally (Díaz-Jiménez et al., 2019).

Currently, there is no adequate and commercially valuable final disposal method for guishe, which contributes to environmental problems. For this reason, its valorization has been proposed through the extraction of phytochemicals, such as flavonoids, which have bioactive properties of interest to various industries (Sánchez-Robles et al., 2023). Recent studies have identified the presence of flavonoids in the leaves (Anguiano-Sevilla et al., 2018) and guishe of *A. lechuguilla* (Morreeuw et al., 2021a). However, the complexity of the guishe plant material is an important factor for

Introducción

En los últimos años, ha incrementado el interés sobre la extracción de fitoquímicos a partir de residuos vegetales del sector primario debido a los beneficios potenciales de estos compuestos para la salud (Kussmann et al., 2023). Entre los fitoquímicos de mayor relevancia se encuentran los flavonoides, los cuales son compuestos bioactivos presentes en las plantas derivados del metabolismo secundario (Nagula & Wairkar, 2019). Estructuralmente, los flavonoides constan de un anillo C₆-C₃-C₆ con varios sustitutos que crean las diferentes subclases: flavonas, flavanol, flavonol, isoflavonas y antocianinas (Wang et al., 2018).

Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes (Alara et al., 2020), antiinflamatorias (Dong et al., 2019), antimicrobianas (Saleem & Saeed, 2020), anticancerígenas (Thamrongwatwongsa et al., 2024), fotoprotectoras y antienvjecimiento (Landa-Cansigno et al., 2023), principalmente. Numerosos estudios han analizado los perfiles de flavonoides de materiales vegetales provenientes de subproductos agroindustriales (León-Roque et al., 2023), los cuales se consideran una alternativa viable para la extracción de estos compuestos debido a su abundancia, bajo costo y fácil accesibilidad (Oleszek et al., 2023). La búsqueda de nuevas fuentes de compuestos bioactivos ha ganado interés por su potencial aplicación en la industria cosmética, farmacéutica y agrícola.

La explotación del *Agave lechuguilla* Torr. genera grandes cantidades de residuos derivados de la extracción de la fibra. Esta planta silvestre, común en las regiones áridas y semiáridas del sur de Estados Unidos y noreste de México, abarca más de 20 millones de hectáreas, que corresponden al 10 % del territorio mexicano. Su distribución se centra en los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (Castillo et al., 2011). La extracción de fibra de *A. lechuguilla* es una actividad de sustento para las familias de comunidades rurales (Castillo et al., 2011). No obstante, la fibra representa solo el 15 % de la parte que se aprovecha de la planta, mientras que el bagazo, o guishe, corresponde al 85 % (Morreeuw et al., 2021b), lo cual genera cerca de 150 000 t·año⁻¹ a nivel nacional (Díaz-Jiménez et al., 2019).

Actualmente, el guishe no cuenta con una disposición final adecuada y de valor comercial, por lo que contribuye a los problemas ambientales. Por esta razón, se ha propuesto su valorización mediante la extracción de fitoquímicos, como los flavonoides, los cuales poseen propiedades bioactivas de interés para diversas industrias (Sánchez-Robles et al., 2023). Estudios recientes han identificado la presencia de

the extraction of these compounds; therefore, the extraction process is key to their recovery (Bachtler & Bart, 2021; Rifna et al., 2023).

There are various techniques for the extraction of bioactive compounds; among the most commonly used are the Soxhlet method (continuous extraction with a hot solvent [Azwanida, 2015]), maceration (extraction by submersion in solvent [Nugrahani et al., 2024]), decoction (extraction by boiling the material in water [Perera et al., 2017]) and infusion (extraction using solvents at temperatures no higher than 100 °C [Soto-Maldonado et al., 2022]). However, these techniques require long times, high temperatures and large amounts of solvents, which increases production costs and may lead to the degradation of active compounds (Bachtler & Bart, 2021).

Recently, unconventional techniques have gained interest, such as extraction assisted by ultrasound (extraction by cavitation [Deng et al., 2017]), microwaves (extraction by microwave heating of the solvent [Rodsamrana & Sothornvita, 2019]), enzymes (extraction by addition of enzymes [Panja, 2018]) and supercritical fluids (extraction by solvents up to their critical temperature [Hu et al., 2023]). These techniques require less extraction time (Sonar & Rathod, 2020), reduce solvent and energy consumption (Feki et al., 2021), are environmentally friendly (Deng et al., 2017), are easy to use (Abbas et al., 202) and generate high extraction yields of compounds (Setyaningsih et al., 2019).

Among these techniques, microwave-assisted extraction stands out for its efficiency, generating higher yields in less time, with less solvent use and good final product quality (Pinela et al., 2016; Tapia-Quirós et al., 2023). Considering the above, the aim of the present research was to evaluate the effect of different parameters (time, temperature, mass:volume ratio and solvent concentration) in microwave-assisted extraction on the flavonoid content in *Agave lechuguilla* guishe biomass.

Materials and methods

Collection of *Agave lechuguilla* bagasse (guishe)

The *A. lechuguilla* guishe was obtained in February 2022 in the community of Cosme, belonging to the municipality of Ramos Arizpe, Coahuila, Mexico (25° 51' 44" N and 101° 20' 39" W), after carving to obtain the fiber. The guishe was dehydrated in a hot air oven (KL-10, Koleff, Mexico) at 50 °C for 24 h; subsequently, it was passed through a cutting mill (SM100 Industrial Mill, Retsch, Germany) to obtain 2-mm particles.

flavonoides en las hojas (Anguiano-Sevilla et al., 2018) y en el guishe de *A. lechuguilla* (Morreeuw et al., 2021a). Sin embargo, la complejidad del material vegetal del guishe es un factor importante para la extracción de estos compuestos; por ello, el proceso de extracción es clave para su recuperación (Bachtler & Bart, 2021; Rifna et al., 2023).

Existen diversas técnicas para la extracción de compuestos bioactivos, entre las más utilizadas son el método de Soxhlet (extracción continua con un solvente caliente [Azwanida, 2015]), maceración (extracción por sumersión en solvente [Nugrahani et al., 2024]), decocción (extracción por medio de ebullición del material en agua [Perera et al., 2017]) e infusión (extracción mediante solventes a temperatura no mayor a 100 °C [Soto-Maldonado et al., 2022]). Sin embargo, estas técnicas requieren tiempos prolongados, altas temperaturas y grandes cantidades de solventes, lo cual incrementa los costos de producción y puede provocar la degradación de los compuestos activos (Bachtler & Bart, 2021).

Recientemente, han cobrado interés las técnicas no convencionales, como la extracción asistida por ultrasonido (extracción mediante cavitación [Deng et al., 2017]), microondas (extracción por calentamiento del solvente mediante microondas [Rodsamrana & Sothornvita, 2019]), enzimas (extracción mediante la adición de enzimas [Panja, 2018]) y fluidos supercríticos (extracción por solventes hasta su temperatura crítica [Hu et al., 2023]). Estas técnicas requieren menor tiempo de extracción (Sonar & Rathod, 2020), reducen el consumo de solvente y energía (Feki et al., 2021), son amigables con el medio ambiente (Deng et al., 2017), son fáciles de utilizar (Abbas et al., 202) y generan altos rendimientos de extracción de compuestos (Setyaningsih et al., 2019).

Entre dichas técnicas, la extracción asistida por microondas destaca por su eficiencia, al generar mayores rendimientos en menor tiempo, con menor uso de solventes y buena calidad del producto final (Pinela et al., 2016; Tapia-Quirós et al., 2023). Considerando lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de diferentes parámetros (tiempo, temperatura, relación masa:volumen y concentración de solvente) en la extracción asistida por microondas sobre el contenido de flavonoides en biomasa de guishe de *Agave lechuguilla*.

Materiales y métodos

Recolección del bagazo (guishe) de *Agave lechuguilla*

El guishe del *A. lechuguilla* se obtuvo en febrero de 2022 en la comunidad de Cosme, perteneciente al municipio de Ramos Arizpe, Coahuila, México (25° 51'

Microwave-assisted flavonoid extraction

The extraction was performed in a microwave oven (Ethos CFR, Milestone, Italy) with a 170 mL reactor, a 100-rpm stirring system, 50 Hz frequency and 2500 W power. Different time (10, 15, 20, 25 and 30 min), temperature (35, 40, 45, 50 and 55 °C), mass:volume ratio (1:10, 1:15, 1:20, 1:25 and 1:30 g·mL⁻¹) and solvent concentration (40, 50, 60, 70 and 80 % ethanol, v:v) conditions were evaluated. The extracts obtained were filtered, concentrated in a rotary evaporator (IKA, Willmington, USA) to dryness at 50 °C and recovered with 10 mL of distilled water. Finally, they were dried in a hot air dehydrator (Hamilton Beach, USA) at 40 °C until constant weight. The response variable was total flavonoid content. All the analysis was performed in triplicate. The extraction yield was calculated using the following equation:

$$\text{Extraction yield} = \left(\frac{\text{Extract weight (g)}}{\text{Weight of sample (g)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Chemical characterization

Total flavonoid content

Total flavonoid content (TFC) was determined by the aluminum chloride method described by Morreeuw et al. (2021b), with some modifications. First, 200 µL of extract dilution (10 mg·mL⁻¹), 75 µL of NaNO₂ (5 %), 375 µL of AlCl₃ solution (2 %), 500 µL of NaOH (4 %) and 500 µL of distilled water were placed in a test tube, with homogenization between each reagent added and 5 min incubation in the dark. Quantification was performed from the calibration curve ($y = 0.0008x + 0.0111$, $R^2 = 0.9923$) obtained with quercetin as standard (0 - 1000 mg·L⁻¹). Samples were measured against an ethanol blank in a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50, Varian, USA) at 510 nm. TFC was calculated based on Equation 2 and expressed in milligrams of quercetin equivalent per gram of dry sample (mg_{QE}·g⁻¹ ds).

$$\text{TFC} = \frac{\text{Sample concentration (mg}_{QE} \cdot L^{-1}) \times \text{Solvent volume (L)}}{\text{Sample weight (g)}} \quad (2)$$

Where the sample concentration was determined from the calibration curve, and the solvent volume and sample weight correspond to the amount used in the extraction process.

Total polyphenol content

Total polyphenol content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method described by Morreeuw et al. (2021a), with some modifications. Twenty µL of extract dilution (10 mg·mL⁻¹), 800 µL of distilled water and 60 µL of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich®, USA) were placed in a test tube. The mixture was shaken and incubated for 5 min in the dark at room temperature.

44° N y 101° 20' 39" W), después del tallado realizado para la obtención de la fibra. El guishe se deshidrató en un horno de aire caliente (KL-10, Koleff, México) a 50 °C durante 24 h; posteriormente, se pasó por un molino de corte (SM100 Industrial Mill, Retsch, Alemania) para obtener partículas de 2 mm.

Extracción de flavonoides asistida por microondas

La extracción se realizó en un microondas (Ethos CFR, Milestone, Italia) con un reactor de 170 mL, sistema de agitación de 100 rpm, 50 Hz de frecuencia y 2500 W de potencia. Se evaluaron diferentes condiciones de tiempo (10, 15, 20, 25 y 30 min), temperatura (35, 40, 45, 50 y 55 °C), relación masa:volumen (1:10, 1:15, 1:20, 1:25 y 1:30 g·mL⁻¹) y concentración de solvente (40, 50, 60, 70 y 80 % de etanol, v:v). Los extractos obtenidos se filtraron, se concentraron en un rotaevaporador (IKA, Willmington, EUA) hasta sequedad a 50 °C y se recuperaron con 10 mL de agua destilada. Finalmente, se secaron en un deshidratador de aire caliente (Hamilton Beach, EUA) a 40 °C hasta peso constante. La variable de respuesta fue el contenido de flavonoides totales. Todo el análisis se realizó por triplicado. El rendimiento de extracción se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de extracción} = \left(\frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Caracterización química

Contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales (CFT) se determinó por el método de cloruro de aluminio descrito por Morreeuw et al. (2021b), con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se colocaron 200 µL de dilución del extracto (10 mg·mL⁻¹), 75 µL de NaNO₂ (5 %), 375 µL de solución de AlCl₃ (2 %), 500 µL de NaOH (4 %) y 500 µL de agua destilada, con homogenización entre cada reactivo adicionado e incubación de 5 min en oscuridad. La cuantificación se realizó a partir de la curva de calibración ($y = 0.0008x + 0.0111$, $R^2 = 0.9923$) obtenida con quercetina como estándar (0 - 1000 mg·L⁻¹). Las muestras se midieron frente a un blanco de etanol en un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50, Varian, EUA) a 510 nm. El CFT se calculó con base en la Ecuación 2 y se expresó en miligramos equivalente de quercetina por gramo de muestra seca (mg_{EQ}·g⁻¹ ms).

$$\text{CFT} = \frac{\text{Concentración de la muestra (mg}_{EQ} \cdot L^{-1}) \times \text{Volumen del solvente (L)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \quad (2)$$

Donde la concentración de la muestra se determinó a partir de la curva de calibración, y el volumen del solvente y el peso de la muestra corresponden a la cantidad utilizada en el proceso de extracción.

Subsequently, 160 μL of Na_2CO_3 (20 %) was added and incubated at room temperature for 2 h in the dark. Absorbance was measured at 765 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50, Varian, USA).

Quantification was performed from the calibration curve ($y = 0.0023x - 0.0286$, $R^2 = 0.9998$) obtained with gallic acid (GA) used as standard (0 - 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Samples were measured against an ethanol blank in a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50, Varian, USA) at 765 nm. TPC was calculated based on Equation 3 and expressed in milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry sample ($\text{mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{g}^{-1}$ ds).

$$TPC = \frac{\text{Sample concentration (mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{L}^{-1}) \times \text{Solvent volume (L)}}{\text{Sample weight (g)}} \quad (3)$$

Where the sample concentration was determined from the calibration curve, and the solvent volume and sample weight correspond to the amount used in the extraction process.

Antioxidant activity

Free radical scavenging activity by DPPH

Free radical scavenging activity was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}), according to the protocol described by Akbari et al. (2019). First, a 20 μL dilution of the extract (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added to a 96-well microplate, followed by 180 μL of DPPH^{*} ethanolic solution (25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Sigma-Aldrich[®], USA). Absorbance of the mixture was measured at 540 nm in a plate reader (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific, USA) after incubation in the dark for 30 min at room temperature. Ethanol was used as blank, DPPH^{*} ethanolic solution as a control, and trolox as a standard (1 000 ppm). The percentage of inhibition of the DPPH^{*} radical was determined from the following equation:

$$\text{Inhibition of DPPH}^* \text{ radical (\%)} = \frac{A_o - A_m}{A_o} \times 100 \quad (4)$$

where A_o is the absorbance of the control and A_m is the absorbance of the sample.

Free radical scavenging activity by ABTS^{**}

Free radical scavenging activity was determined using 2,2'-azino-bis-3(ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{**}), according to the protocol described by Akbari et al. (2019). The stock solutions of ABTS^{**} (7 mM) and potassium persulfate (2.45 mM) were prepared separately. To obtain the working solution, the stock solutions were mixed at a 1:1 ratio and incubated for 12 h in the dark at room temperature. Subsequently,

Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales (CPT) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Morreueu et al. (2021a), con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se colocaron 20 μL de dilución del extracto (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 800 μL de agua destilada y 60 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich[®], EUA). La mezcla se agitó e incubó durante 5 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 160 μL de Na_2CO_3 (20 %) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h en oscuridad. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50, Varian, EUA).

La cuantificación se realizó a partir de la curva de calibración ($y = 0.0023x - 0.0286$, $R^2 = 0.9998$) obtenida con ácido gálico (AG) utilizado como estándar (0 - 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Las muestras se midieron frente a un blanco de etanol en un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50, Varian, EUA) a 765 nm. El CPT se calculó con base en la Ecuación 3 y se expresó en miligramos equivalente de ácido gálico por gramo de muestra seca ($\text{mg}_{\text{EAG}}\cdot\text{g}^{-1}$ ms).

$$CPT = \frac{\text{Concentración de la muestra (mg}_{\text{EAG}}\cdot\text{L}^{-1}) \times \text{Volumen del solvente (L)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \quad (3)$$

Donde la concentración de la muestra se determinó a partir de la curva de calibración, y el volumen del solvente y el peso de la muestra corresponden a la cantidad utilizada en el proceso de extracción.

Actividad antioxidante

Actividad eliminadora de radicales libres por DPPH

La actividad eliminadora de radicales libres se determinó utilizando el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}), de acuerdo con el protocolo descrito por Akbari et al. (2019). Se añadieron 20 μL de dilución del extracto (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a una microplaca de 96 pocillos, seguidos de 180 μL de solución etanólica de DPPH^{*} (25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Sigma-Aldrich[®], EUA). La absorbancia de la mezcla se midió a 540 nm en un lector de placa (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific, EUA) después de la incubación en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Se utilizó etanol como blanco, solución etanólica de DPPH^{*} como control y trolox como estándar (1 000 ppm). El porcentaje de inhibición del radical DPPH^{*} se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del radical DPPH}^* (\%) = \frac{A_o - A_m}{A_o} \times 100 \quad (4)$$

donde A_o es la absorbancia del control y A_m es la absorbancia de la muestra.

1 mL of the working solution was mixed with ethanol until obtaining an absorbance of 0.7 (\pm 0.02) at a wavelength of 734 nm.

For sample analysis, 10 μ L of the extract dilution (10 mg·mL⁻¹) was placed in a 96-well microplate followed by 190 μ L of ABTS^{••} ethanolic solution. The absorbance of the mixture was measured at 734 nm on a plate reader (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific, USA). Ethanol was used as blank, ABTS^{••} ethanolic solution as a control and trolox as a standard (1000 ppm). The percentage of inhibition of ABTS^{••} was obtained with the following equation:

$$\text{Inhibition of ABTS}^{\bullet\bullet} \text{ radical (\%)} = \frac{A_o - A_m}{A_o} \times 100 \quad (5)$$

where A_o is the absorbance of the control and A_m is the absorbance of the sample.

Qualitative tests

Colorimetric tests for flavonoid determination

Qualitative identification of flavonoids was performed by colorimetric tests, based on the sodium hydroxide and sulfuric acid methodology described by Chauhan et al. (2018).

Sodium hydroxide (NaOH) test. First, 150 μ L of extract solubilized in distilled water (10 mg·mL⁻¹) was placed in a 96-well microplate; subsequently, drops of NaOH were added. The color change of the extracts from blue to violet indicates the presence of anthocyanins, whereas a yellow to orange hue suggests the presence of flavonones, and a yellow coloration indicates the presence of flavones.

Concentrated sulfuric acid (H₂SO₄) test. First, 150 μ L of extract solubilized in distilled water (10 mg·mL⁻¹) was placed in a 96-well microplate; subsequently, drops of H₂SO₄ were added. The color change of the extracts between yellow to orange indicates the presence of anthocyanins, and orange to red suggests the presence of flavones.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis

The FTIR spectrum of the extract was obtained in an infrared spectrophotometer (Cary 630, Agilent, USA) to identify the functional groups present in the *A. lechuguilla* guishe extract.

Statistical analysis

A single-factor design was used to evaluate the flavonoid extraction process. Statistical analysis of the results (standard deviation and Tukey's comparison

Actividad eliminadora de radicales libres por ABTS^{••}

La actividad eliminadora de radicales libres se determinó utilizando el 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{••}), de acuerdo con el protocolo descrito por Akbari et al. (2019). La solución madre de ABTS^{••} (7 mM) y el persulfato de potasio (2.45 mM) se prepararon por separado. Para obtener la solución de trabajo, se mezclaron las soluciones madre en relación 1:1 y se incubaron durante 12 h en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló 1 mL de la solución de trabajo con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 (\pm 0.02) a una longitud de onda de 734 nm.

Para el análisis de las muestras, se colocaron 10 μ L de la dilución del extracto (10 mg·mL⁻¹) en una microplaca de 96 pocillos seguidos de 190 μ L de solución etanólica de ABTS^{••}. La absorbancia de la mezcla se midió a 734 nm en un lector de placa (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific, EUA). Se utilizó etanol como blanco, solución etanólica de ABTS^{••} como control y trolox como estándar (1000 ppm). El porcentaje de inhibición de ABTS^{••} se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del radical ABTS}^{\bullet\bullet} \text{ (\%)} = \frac{A_o - A_m}{A_o} \times 100 \quad (5)$$

donde A_o es la absorbancia del control y A_m es la absorbancia de la muestra.

Pruebas cualitativas

Pruebas colorimétricas para la determinación de flavonoides

La identificación cualitativa de flavonoides se realizó mediante pruebas colorimétricas, a partir de la metodología de hidróxido de sodio y ácido sulfúrico descrita por Chauhan et al. (2018).

Prueba de hidróxido de sodio (NaOH). Se colocaron 150 μ L de extracto solubilizado en agua destilada (10 mg·mL⁻¹) en una microplaca de 96 pocillos; posteriormente, se añadieron gotas de NaOH. El cambio de color de los extractos de azul a violeta indica la presencia de antocianinas, mientras que una tonalidad entre amarilla y anaranjada sugiere la presencia de flavononas, y una coloración amarilla indica la presencia de flavonas.

Prueba con ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). Se colocaron 150 μ L de extracto solubilizado en agua destilada (10 mg·mL⁻¹) en una microplaca de 96 pocillos; posteriormente, se añadieron gotas de H₂SO₄. El cambio de color de los extractos entre amarillo y anaranjado indica la presencia de antocianinas, y el color anaranjado a rojo sugiere la presencia de flavonas.

of means) was performed using Minitab software (ver. 19), with a confidence level of 95 % ($P \leq 0.05$). All analyses were performed in triplicate.

Results and discussion

Flavonoid extraction parameters

Irradiation time

Time is a fundamental parameter in the extraction process, as it directly influences the yield, quality, energy consumption and cost of the process (Vinatoru et al., 2017). Therefore, it is crucial to optimize the microwave irradiation time from the beginning of the process. To determine the effect of irradiation time on flavonoid extraction, 12 g of *A. lechuguilla* guishe and 120 mL of 70 % ethanol were used. The irradiation time varied from 10 to 30 min at a constant temperature of 40 °C. Figure 1a shows that the maximum extraction of total flavonoids (7.62 ± 0.05 mg QE·g⁻¹ ds) was reached at 10 min of irradiation, which is attributed to the increase in molecular motions and the heat generated, factors influenced by the ionic condition and dielectric properties of the solvent (Sonar & Rathod, 2020).

Análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro FTIR del extracto se obtuvo en un espectrofotómetro de infrarrojo (Cary 630, Agilent, EUA) para identificar los grupos funcionales presentes en el extracto de guishe de *A. lechuguilla*.

Análisis estadístico

Se empleó el diseño de un solo factor para evaluar el proceso de extracción de flavonoides. El análisis estadístico de los resultados (desviación estándar y comparación de medias de Tukey) se realizó con el programa Minitab (ver. 19), con un nivel de confianza de 95 % ($P \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Parámetros de la extracción de flavonoides

Tiempo de irradiación

El tiempo es un parámetro fundamental en el proceso de extracción, ya que influye directamente en el

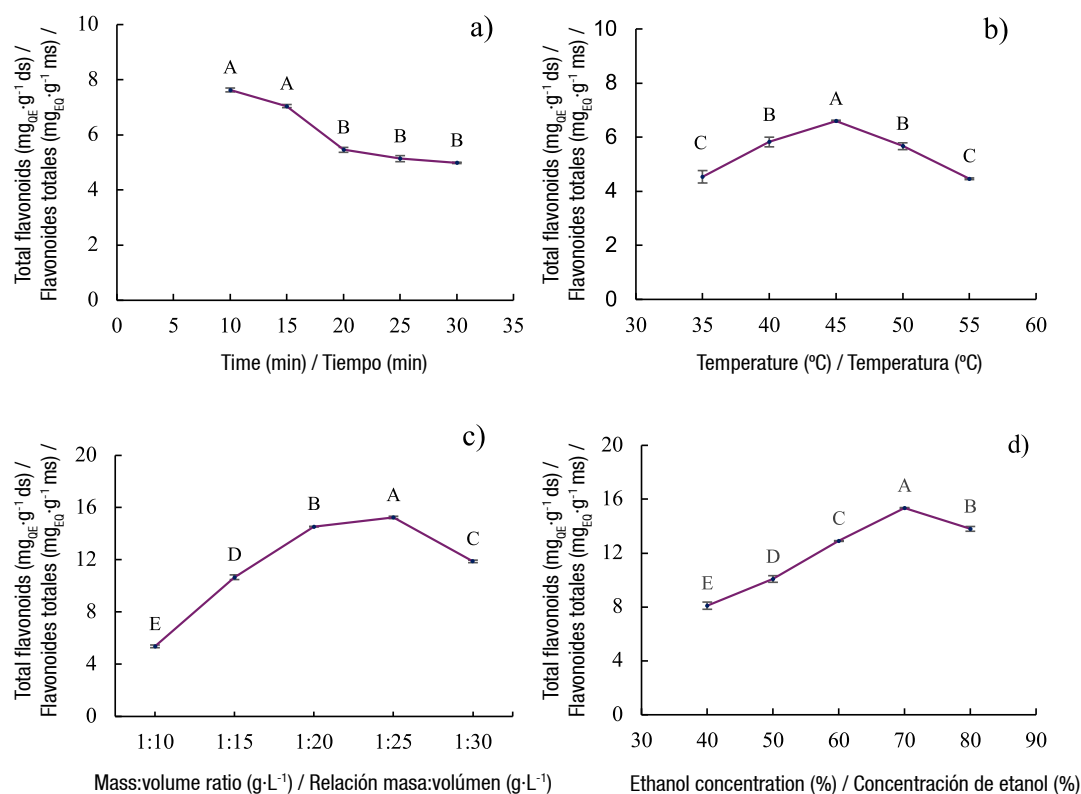


Figure 1. Effects of the flavonoid extraction process on *Agave lechuguilla* guishe biomass: a) time, b) temperature, c) mass:volume ratio and d) solvent concentration. Values with the same letters within each graph do not differ statistically (Tukey, $P < 0.05$).

Figura 1. Efectos del proceso de extracción de flavonoides en biomasa de guishe de *Agave lechuguilla*: a) tiempo, b) temperatura, c) relación masa:volumen y d) concentración de disolvente. Valores con letras iguales dentro de cada gráfica no difieren estadísticamente (Tukey, $P < 0.05$).

The energy generated during the irradiation process causes a build-up of heat in the solvent due to the absorption of microwave energy, which is efficiently transferred to the plant material through molecular interactions. This process facilitates the extraction of flavonoids (Jha & Kumar, 2021). Subsequently, a gradual decrease in the amount of flavonoids extracted was observed after 10 min of irradiation, probably due to the degradation of the compounds by prolonged exposure to microwaves (Alara et al., 2018; Antony & Farid, 2022; Gil-Martín et al., 2022). The comparison of means (Figure 1a) showed a significant difference ($P < 0.05$) between the evaluated times ($R^2 = 98.57\%$). Therefore, for studies additional to the single-factor design, 10 min of irradiation was used for the extraction process.

Temperature

Temperature is a critical factor in the microwave-assisted extraction process in a closed vessel, as it contributes to a higher recovery of phytochemicals. To determine its effect on flavonoid extraction, the temperature was varied from 35 to 55 °C, with an irradiation time of 10 min. Figure 1b shows how flavonoid extraction increases as the temperature rises from 35 to 45 °C, which is attributed to intermolecular interactions in the solvent, which intensify at higher temperatures. This increases molecular motion and the solubility of the compounds within the reactor (Sonar & Rathod, 2020).

Increased temperature creates pressure on the cell wall, which facilitates the permeability and rupture of plant cells due to tissue softening and expansion, thus releasing bioactive compounds into the solvent (Arruda et al., 2017; Seremet et al., 2021). Furthermore, the elevated temperature reduces solvent viscosity and surface tension, which favors solvent diffusion through cells, improves mass transfer, and increases the solvent's ability to solubilize analytes from plant material (Vinatoru et al., 2017).

When experiments were carried out at a temperature above 45 °C, flavonoid extraction decreased, probably due to the degradation of thermolabile bioactive compounds under elevated temperature conditions (Alara et al., 2018; Lovrić et al., 2017; Seremet et al., 2021). The comparison of means (Figure 1b) showed a significant difference ($P < 0.05$) in flavonoid concentration in relation to the temperature conditions used ($R^2 = 98.47\%$). Therefore, for further studies of the single-factor design, 45 °C was used for the extraction process, as it resulted in the highest TFC ($6.59 \pm 0.03 \text{ mg}_{\text{QE}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ds}$).

rendimiento, la calidad, el consumo de energía y el costo del proceso (Vinatoru et al., 2017). Por ello, es crucial optimizar el tiempo de irradiación con microondas desde el inicio del proceso. Para determinar el efecto del tiempo de irradiación en la extracción de flavonoides, se utilizaron 12 g de guishe de *A. lechuguilla* y 120 mL de etanol al 70 %. El tiempo de irradiación varió de 10 a 30 min a una temperatura constante de 40 °C. La Figura 1a muestra que la extracción máxima de flavonoides totales ($7.62 \pm 0.05 \text{ mg EQ} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ms}$) se alcanzó a los 10 min de irradiación, lo cual se atribuye al aumento de los movimientos moleculares y al calor generado, factores influenciados por la condición iónica y las propiedades dieléctricas del disolvente (Sonar & Rathod, 2020).

La energía generada durante el proceso de irradiación provoca una acumulación de calor en el solvente debido a la absorción de energía de las microondas, la cual se transfiere eficientemente al material vegetal a través de interacciones moleculares. Este proceso facilita la extracción de flavonoides (Jha & Kumar, 2021). Posteriormente, se observó una disminución gradual en la cantidad de flavonoides extraídos después de 10 min de irradiación, probablemente debido a la degradación de los compuestos por la exposición prolongada a las microondas (Alara et al., 2018; Antony & Farid, 2022; Gil-Martín et al., 2022). La comparación de medias (Figura 1a) mostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tiempos evaluados ($R^2 = 98.57\%$). Por lo tanto, para estudios adicionales al diseño de un solo factor, se utilizaron 10 min de irradiación para el proceso de extracción.

Temperatura

La temperatura es un factor crítico en el proceso de extracción asistida por microondas en un recipiente cerrado, ya que contribuye a una mayor recuperación de fitoquímicos. Para determinar su efecto en la extracción de flavonoides, se varió la temperatura de 35 a 55 °C, con un tiempo de irradiación de 10 min. La Figura 1b muestra cómo la extracción de flavonoides aumenta conforme la temperatura se eleva de 35 a 45 °C, lo cual se atribuye a las interacciones intermoleculares en el solvente, que se intensifican a mayores temperaturas. Esto incrementa el movimiento molecular y la solubilidad de los compuestos dentro del reactor (Sonar & Rathod, 2020).

El aumento de la temperatura genera presión sobre la pared celular, lo cual facilita la permeabilidad y ruptura de las células vegetales debido al ablandamiento y expansión de los tejidos, liberando así los compuestos bioactivos en el solvente (Arruda et al., 2017; Seremet et al., 2021). Además, la temperatura elevada reduce la

Mass:volume ratio

The mass:volume ratio is another important parameter in microwave-assisted extraction, as it influences the recovery efficiency of compounds (Sai-Ut et al., 2023). The optimal value of this ratio varies in each extraction system, so it must be established experimentally (Alara et al., 2018). In this study, the ratio was adjusted from 1:10 to 1:30 (g·mL⁻¹), and the irradiation time (10 min), temperature (45 °C), and ethanol concentration (70 %) were kept constant.

Figure 1c shows an increase in total flavonoid extraction up to a mass:volume ratio of 1:25 g·mL⁻¹ (15.24 ± 0.09 mg_{QE}·g⁻¹ ds), which is attributed to an improvement in mass transfer during the process (Krishnan & Rajan, 2017), because the analytes tend to migrate from the plant material to the solvent by dissolution and diffusion (Latif et al., 2024). However, as the ratio increased, flavonoid extraction decreased, possibly due to reduced microwave penetration into the solvent, since excess solvent absorbs energy at the periphery and limits its effective penetration (Sonar & Rathod, 2020). The comparison of means (Figure 1c) confirmed the existence of significant differences ($P < 0.05$) between the ratios evaluated ($R^2 = 99.95\%$). Therefore, the ratio of 1:25 g·mL⁻¹ was established as optimal for further studies, as it resulted in the highest concentration of flavonoids in the extract obtained.

Solvent concentration

Ethanol is a widely used solvent in the extraction of plant compounds, and is considered a “green solvent” due to its low toxicity and its ability to be mixed with water in any proportion (Alara et al., 2018). The use of a binary solvent, such as a mixture of ethanol and water, improves extraction efficiency compared to the use of a monosolvent (Kaderides et al., 2019). Ethanol was evaluated at different concentrations (40, 50, 60, 70 and 80 %, v:v), and the irradiation time (10 min), temperature (45 °C) and mass:volume ratio (1:25 g·mL⁻¹) were kept constant.

An increase in flavonoid extraction was observed as the amount of ethanol increased, with significant differences ($P < 0.05$) between the different solvent concentrations ($R^2 = 99.76\%$). Concentrations higher than 70% decreased flavonoid content (Figure 1d); therefore, 70 % was established as the optimal ethanol concentration. This increase is attributed to the increase in ethanol polarity when adding water, which enhances mass transfer and, consequently, extraction efficiency (Alara et al., 2018; Vetal et al., 2014). Additionally, water, due to its dielectric constant and loss factor, absorbs microwave energy better than ethanol, which favors cell expansion of plant material

viscosidad del solvente y la tensión superficial, lo cual favorece la difusión del solvente a través de las células, mejora la transferencia de masa y aumenta la capacidad del disolvente para solubilizar los analitos del material vegetal (Vinatoru et al., 2017).

Cuando los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura superior a 45 °C, disminuyó la extracción de flavonoides, probablemente debido a la degradación de compuestos bioactivos termolábiles en condiciones de temperatura elevada (Alara et al., 2018; Lovrić et al., 2017; Seremet et al., 2021). La comparación de medias (Figura 1b) mostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la concentración de flavonoides en relación con las condiciones de temperatura utilizadas ($R^2 = 98.47\%$). Por lo tanto, para estudios posteriores al diseño de un solo factor, se utilizaron 45 °C para el proceso de extracción, ya que resultó en el mayor CFT (6.59 ± 0.03 mg_{EQ}·g⁻¹ ms).

Relación de masa:volumen

La relación masa:volumen es otro parámetro importante en la extracción asistida por microondas, debido a que influye en la eficiencia de recuperación de los compuestos (Sai-Ut et al., 2023). El valor óptimo de esta relación varía en cada sistema de extracción, por lo que se debe establecer experimentalmente (Alara et al., 2018). En este estudio, la relación se ajustó de 1:10 a 1:30 (g·mL⁻¹), y se mantuvieron constantes el tiempo de irradiación (10 min), la temperatura (45 °C) y la concentración de etanol (70 %).

La Figura 1c muestra un incremento en la extracción de flavonoides totales hasta una relación masa:volumen de 1:25 g·mL⁻¹ (15.24 ± 0.09 mg_{EQ}·g⁻¹ ms), lo cual se atribuye a una mejora en la transferencia de masa durante el proceso (Krishnan & Rajan, 2017), debido a que los analitos tienden a migrar del material vegetal al solvente mediante disolución y difusión (Latif et al., 2024). No obstante, al aumentar la proporción, la extracción de flavonoides disminuyó, posiblemente debido a la reducción de la penetración de microondas en el solvente, ya que el exceso de solvente absorbe la energía en la periferia y limita su penetración efectiva (Sonar & Rathod, 2020). La comparación de medias (Figura 1c) confirmó la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las proporciones evaluadas ($R^2 = 99.95\%$). Por ello, se estableció la relación de 1:25 g·mL⁻¹ como óptima para estudios posteriores, ya que resultó en la mayor concentración de flavonoides en el extracto obtenido.

Concentración de solvente

El etanol es un solvente ampliamente utilizado en la extracción de compuestos vegetales, y es considerado un “solvente verde” por su baja toxicidad y su capacidad para mezclarse con agua en cualquier

and the release of phytochemicals into the extraction solvent (Sonar & Rathod, 2020).

In summary, the optimal extraction parameters were: 10 min of irradiation, temperature of 45 °C, mass:volume ratio of 1:25 g·mL⁻¹ and an ethanol concentration of 70 %. These conditions yielded a TFC of 15.34 ± 0.03 mg_{QE}·g⁻¹ ds and an extraction yield of 21.33 %. Finally, the extract obtained under these conditions was characterized.

Chemical characterization

The chemical characterization of the extract showed a concentration of 8.24 ± 0.35 mg_{GAE}·g⁻¹ ds of hydrolyzable polyphenols, 15.34 ± 0.03 mg_{QE}·g⁻¹ ds of total flavonoids and an antioxidant activity with a free radical scavenging capacity of 72.488 ± 0.90 % in the DPPH^{*} assay and of 86.20 ± 0.09 % with ABTS^{**}, compared to the trolox control, which presented a free radical scavenging of 85.30 ± 0.38 and 100 ± 0.00 % with DPPH^{*} and ABTS^{**}, respectively.

The results obtained were superior to those reported by Morreeuw et al. (2021a), Morreeuw et al. (2021c) and Quiroz-Guzmán et al. (2023) in *A. lechuguilla* guishe extracts obtained by enzymatic, ultrasound, supercritical fluid and Soxhlet extraction, as well as in hydrolyzed and fractionated extracts from *A. lechuguilla* leaves reported by Anguiano-Sevilla et al. (2018). The higher flavonoid content is attributed to the use of microwaves, which allows significantly improving the extraction efficiency by providing high yields in less time. This is due to the heating of the mixture, which causes the expansion of the plant cells and the rupture of their walls, facilitating the release of the active components (Sonar & Rathod, 2020). However, the values obtained were lower than the results reported by Anguiano-Sevilla et al. (2018) in *A. lechuguilla* leaf extracts using ultrasound, possibly due to variations in the sampling location and time, environmental factors that can affect the content of bioactive compounds in plants (Morreeuw et al., 2021a).

The antioxidant activity by DPPH^{*} is similar to that reported by Carmona et al. (2017) in ethanolic extracts of buds (central part of the plant) of *A. lechuguilla*, and higher than that obtained by Morreeuw et al. (2021c) in guishe extracts. The increase in antioxidant activity is attributed to the higher content of flavonoids in the extracts and the ability of ethanol to improve the solubility of phenolic compounds (Kaur et al., 2019) in microwave-assisted extraction (Sonar & Rathod, 2020), as it enhances the antioxidant activity due to the hydroxyl groups present in the structures of the bioactive compounds (Huang et al., 2023).

proporción (Alara et al., 2018). El uso de un solvente binario, como la mezcla de etanol y agua, mejora la eficiencia de extracción en comparación con el uso de un monosolvente (Kaderides et al., 2019). El etanol se evaluó en diferentes concentraciones (40, 50, 60, 70 y 80 %, v:v), y se mantuvieron constantes el tiempo de irradiación (10 min), la temperatura de (45 °C) y la relación masa:volumen (1:25 g·mL⁻¹).

Se observó un incremento en la extracción de flavonoides conforme aumentó la cantidad de etanol, con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las diferentes cantidades de solvente ($R^2 = 99.76$ %). Concentraciones superiores a 70 % disminuyeron el contenido de flavonoides (Figura 1d); por ello, se estableció el 70 % como la concentración óptima de etanol. Dicho aumento se atribuye al incremento de la polaridad del etanol al adicionar agua, lo cual potencia la transferencia de masa y, en consecuencia, la eficiencia de extracción (Alara et al., 2018; Vetel et al., 2014). Adicionalmente, el agua, debido a su constante dieléctrica y su factor de pérdida, absorbe mejor la energía de las microondas que el etanol, lo cual favorece la expansión celular del material vegetal y la liberación de fitoquímicos en el solvente de extracción (Sonar & Rathod, 2020).

En resumen, los parámetros óptimos de extracción fueron: 10 min de irradiación, temperatura de 45 °C, relación masa:volumen de 1:25 g·mL⁻¹ y una concentración de etanol de 70 %. Estas condiciones produjeron un CFT de 15.34 ± 0.03 mg_{EQ}·g⁻¹ ms y un rendimiento de extracción de 21.33 %. Finalmente, se caracterizó el extracto obtenido bajo estas condiciones.

Caracterización química

La caracterización química del extracto mostró una concentración de 8.24 ± 0.35 mg_{EAG}·g⁻¹ ms de polifenoles hidrolizables, 15.34 ± 0.03 mg_{EQ}·g⁻¹ ms de flavonoides totales y una actividad antioxidante con capacidad de eliminación de radicales libres de 72.488 ± 0.90 % en el ensayo DPPH^{*} y de 86.20 ± 0.09 % con ABTS^{**}, en comparación con el control de trolox, el cual presentó una eliminación de radicales libres de 85.30 ± 0.38 y 100 ± 0.00 % con DPPH^{*} y ABTS^{**}, respectivamente.

Los resultados obtenidos fueron superiores a los reportados por Morreeuw et al. (2021a), Morreeuw et al. (2021c) y Quiroz-Guzmán et al. (2023) en extractos de guishe de *A. lechuguilla* obtenidos mediante extracción enzimática, ultrasonido, fluidos supercríticos y Soxhlet, así como en extractos hidrolizados y fraccionados a partir de hojas de *A. lechuguilla* reportados por Anguiano-Sevilla et al. (2018). El mayor contenido de flavonoides es atribuido al uso de microondas, el

Qualitative characterization of guishe extract

Qualitative tests of the extract showed a yellow coloration upon addition of NaOH, which indicated the presence of flavanones and flavones, and an orange to red coloration upon addition of H₂SO₄, which also indicated the presence of flavones (Table 1). These flavonoids are known for their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer properties (Nagula & Wairkar, 2019). Morreeuw et al. (2021b) reported the presence of flavonoids by HPLC-MS/MS of *A. lechuguilla* guishe extracts obtained by ultrasound. In these ethanolic and methanolic extracts, they identified different flavones (such as apigenin, apigenin-7-O-glucoside and apigenin-7-O-rutinoside) and flavanones (such as naringenin, naringenin-7-O-rutinoside, naringenin O-rutinoside, hesperidin and hesperidin methylchalcone).

FTIR analysis

The FTIR spectrum of the guishe extract showed several characteristic bands (Figure 2). The band at 3281 cm⁻¹ (Figure 2) is associated with O–H stretching,

cual permite mejorar significativamente la eficiencia de la extracción, al proporcionar altos rendimientos en menor tiempo. Esto se debe al calentamiento de la mezcla, el cual provoca la expansión de las células vegetales y la ruptura de sus paredes, facilitando la liberación de los componentes activos (Sonar & Rathod, 2020). No obstante, los valores obtenidos fueron inferiores a los resultados reportados por Anguiano-Sevilla et al. (2018) en extractos de hojas de *A. lechuguilla* mediante ultrasonido, posiblemente debido a variaciones en el lugar y época de muestreo, factores ambientales que pueden afectar el contenido de compuestos bioactivos en las plantas (Morreeuw et al., 2021a).

La actividad antioxidante por DPPH* es similar a la reportada por Carmona et al. (2017) en extractos etanólicos de cogollos (parte central de la planta) de *A. lechuguilla*, y superior a la obtenida por Morreeuw et al. (2021c) en extractos de guishe. El aumento en la actividad antioxidante se atribuye al mayor contenido de flavonoides en los extractos y a la capacidad del etanol para mejorar la solubilidad de compuestos fenólicos (Kaur et al., 2019) en la extracción asistida con

Table 1. Qualitative characterization of *Agave lechuguilla* guishe extract.

Cuadro 1. Caracterización cualitativa del extracto de guishe de *Agave lechuguilla*.

Test/Prueba	Observation/Observación	Result/Resultado
Sodium hydroxide/Hidróxido de sodio	Yellow coloration/Coloración amarilla	+
Sulfuric acid/Ácido sulfúrico	Orange coloration/Coloración anaranjada	+

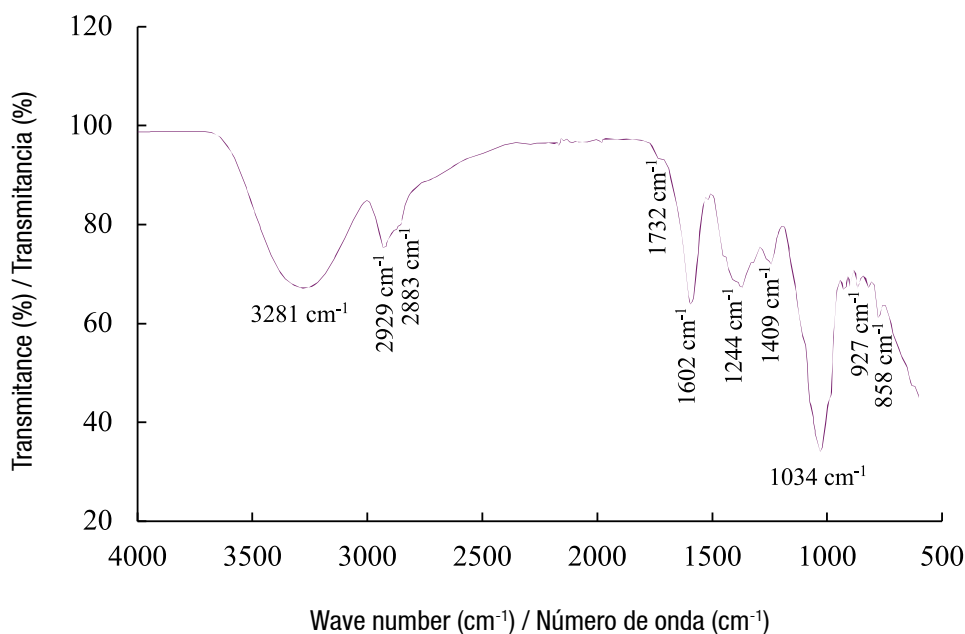


Figure 2. FTIR spectrum of *Agave lechuguilla* guishe extract.

Figura 2. Espectro FTIR de extracto de guishe de *Agave lechuguilla*.

while the bands at 2929 and 2883 cm^{-1} correspond to C–H stretching. The band at 1732 cm^{-1} is probably related to the vibration of carboxyl groups (C=O stretching) present in flavonoids. A band at 1602 cm^{-1} attributed to the stretching of C=C groups, related to deformations of aromatic rings, was also observed. The band at 1409 cm^{-1} is related to CH_3 , CH_2 groups, flavonoids and aromatic rings, and reflects the C–H bending vibration (δ) and stretching of aromatic rings. The band at 1244 cm^{-1} is attributed to the vibration of the C–O group of hydroxyflavonoids. The band at 1034 cm^{-1} is related to secondary alcohols and C–O stretching of ester groups. Finally, bands at 927 and 858 cm^{-1} were found, corresponding to out-of-plane C–H bending vibrations, indicating substitutions in the aromatic ring (Carlota-da Silva et al., 2020; Krysa et al., 2022; Nunes et al., 2016).

Conclusions

Microwave-assisted extraction is a viable option for obtaining flavonoids from *Agave lechuguilla* guishe, as it achieves a higher concentration ($15.34 \pm 0.03 \text{ mg}_{\text{QE}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ds}$) than that reported with other techniques. The optimal conditions for extraction were irradiation time of 10 min, temperature of 45 °C, mass:volume ratio of 1:25 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and ethanol concentration of 70 %. The parameters studied showed their effect on flavonoid extraction efficiency; therefore, future research should focus on optimizing the process to maximize extraction yield. Finally, the valorization of guishe as a source of bioactive compounds adds value to this waste and contributes to mitigating the environmental impacts resulting from its disposal.

End of English version

References / Referencias

- Abbas, M. M., Ahmed, D. D., Tariq, Q. M., Hisan, S., & Noor, Z. I. (2021). Optimization of ultrasound-assisted, microwave-assisted and Soxhlet extraction of bioactive compounds from *Lagenaria siceraria*: A comparative analysis. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100746. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100746>
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Alara, O. R., & Abayomi, O. O. (2019). Extraction, characterization and antioxidant activity of fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum*) seed oil. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(2), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2018.12.001>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Olalere, O. A. (2020). Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *Journal of King Saud*

microondas (Sonar & Rathod, 2020), ya que potencia la actividad antioxidante debido a los grupos hidroxilo presentes en las estructuras de los compuestos bioactivos (Huang et al., 2023).

Caracterización cualitativa del extracto de guishe

Las pruebas cualitativas del extracto mostraron una coloración amarilla al añadir NaOH, lo cual indicó la presencia de flavanonas y flavonas, y una coloración anaranjada a roja al adicionar H_2SO_4 , lo que también indicó la presencia de flavonas (Cuadro 1). Estos flavonoides son conocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y anticancerígenas (Nagula & Wairkar, 2019). Morreeuw et al. (2021b) reportaron la presencia de flavonoides mediante HPLC-MS/MS de extractos de guishe de *A. lechuguilla* obtenidos por ultrasonido. En estos extractos etanólicos y metanólicos identificaron diferentes flavonas (como apigenina, apigenina-7-O-glucósido y apigenina-7-O-rutinosido) y flavanonas (como naringenina, naringenina-7-O-rutinosido, naringenina O-rutinosido, hesperidina y hesperidina metilchalcona).

Análisis FTIR

El espectro FTIR del extracto de guishe mostró diversas bandas características (Figura 2). La banda a 3281 cm^{-1} (Figura 2) se asocia con el estiramiento O–H, mientras que las bandas a 2929 y 2883 cm^{-1} corresponden al estiramiento C–H. La banda a 1732 cm^{-1} probablemente está relacionada con la vibración de grupos carboxilo (estiramiento de C=O) presentes en los flavonoides. También se observó una banda a 1602 cm^{-1} atribuida al estiramiento de los grupos C=C, relacionada con las deformaciones de los anillos aromáticos. La banda en 1409 cm^{-1} está relacionada con grupos CH_3 , CH_2 , flavonoides y anillos aromáticos, y refleja la vibración de flexión (δ) de C–H y el estiramiento de los anillos aromáticos. La banda en 1244 cm^{-1} se atribuye a la vibración del grupo C–O de hidroxiflavonoides. La banda a 1034 cm^{-1} está relacionada con alcoholes secundarios y con estiramiento C–O de grupos éster. Finalmente, se encontraron bandas a 927 y 858 cm^{-1} , correspondientes a vibraciones de flexión C–H fuera del plano, lo cual indica sustituciones en el anillo aromático (Carlota-da Silva et al., 2020; Krysa et al., 2022; Nunes et al., 2016).

Conclusiones

La extracción asistida por microondas es una opción viable para la obtención de flavonoides a partir de guishe de *Agave lechuguilla*, al alcanzar una mayor concentración ($15.34 \pm 0.03 \text{ mg}_{\text{EQ}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ms}$) a la reportada con otras técnicas. Las condiciones óptimas para la extracción fueron tiempo de irradiación de 10 min,

- University - Science, 32(1), 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.08.001>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I., & Azhari, N. H. (2018). *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. *Industrial Crops and Products*, 122, 533-544. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.034>
- Anguiano-Sevilla, L. A., Lugo-Cervantes, E., Ordaz-Pichardo, C., Rosas-Trigueros, J. L., & Jaramillo-Flores, M. E. (2018). Apoptosis induction of *Agave lechuguilla* torrey extract on human lung adenocarcinoma cells (SK-LU-1). *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3765. <https://doi.org/10.3390/ijms19123765>
- Antony, A., & Farid, M. (2022). Effect of temperatures on polyphenols during extraction. *Applied Sciences*, 12(4), 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., & Pastore, G. M. (2017). Optimization of extraction parameters of total phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) fruits using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 10, 100-110. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0554-y>
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 1000196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Bachtler, S., & Bar, H. J. (2021). Increase the yield of bioactive compounds from elder bark and annatto seeds using ultrasound and microwave assisted extraction technologies. *Food and Bioproducts Processing*, 125, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.009>
- Carlota-da Silva, H., Linkoln Alves-Borges, A. L., Macedo-de Oliveira, M., Medeiros-Barreto, H., Douglas-Melo, H., Silva-dos Santos, H., Pinheiro-Santiago, G. M., Sampaio-de Freitas, T., Campos-Lima, I. K., Rodrigues-Teixeira, A. M., & Sampaio-Nogueira, C. E. (2020). Structural characterization, antibacterial activity and NorA efflux pump inhibition of flavonoid fisetinidol. *South African Journal of Botany*, 132, 140-145. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.023>
- Carmona, J. E., Morales-Martínez, T. K., Mussatto, S. I., Castillo-Quiroz, D., & Ríos-González, L. J. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(42), 100-122. <https://scielo.org.mx/pdf/remcf/v8n42/2007-1132-remcf-8-42-00100-en.pdf>
- Castillo, Q. D., Mares, A. O., & Villavicencio, G. E. E. (2011). Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) planta suculenta de importancia económica y social de las zonas áridas y semiáridas de México. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*, 8(2), 6-9.
- Chauhan, S., Gulati, N., & Nagaich, U. (2018). Ácido glicirrónico: extracción, cribado y evaluación de la propiedad anti-inflamatoria. *Ars Pharmaceutica*, 59(2), 61-67. <http://dx.doi.org/10.30827/ars.v59i2.7513>
- temperatura de 45 °C, relación masa:volumen de 1:25 g·mL⁻¹ y concentración de etanol de 70 %. Los parámetros estudiados evidenciaron su efecto en la eficiencia de extracción de flavonoides; por lo cual, futuras investigaciones se deberían centrar en optimizar el proceso para maximizar el rendimiento de extracción. Finalmente, la valorización del guishe como fuente de compuestos bioactivos añade valor a este residuo y contribuye a mitigar los impactos ambientales derivados de su desecho.

Fin de la versión en español

- Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z., & Ding, C. (2017). Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 328-334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.023>
- Díaz-Jiménez, L., Hernandez, S. C., Jasso-de Rodríguez, D., & Rodríguez-García, R. (2019). Conceptualization of a biorefinery for guishe revalorization. *Industrial Crops and Products*, 138, 111441. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.06.004>
- Dong, X., Huang, Y., Wang, Y., & He, X. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant jasmonates and flavonoids from lychee seeds. *Journal of Functional Foods*, 54, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.040>
- Feki, F., Klisurova, D., Masmoudi, M. A., Choura, S., Denev, P., Trendafilova, A., Chamkha, M. & Sayadi, S. (2021). Optimization of microwave assisted extraction of simmondsins and polyphenols from Jojoba (*Simmondsia chinensis*) seed cake using Box-Behnken statistical design. *Food Chemistry*, 356, 129670. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129670>
- Gil-Martín, E., Forbes-Hernández, T., Romero, A., Cianciosi, D., Giampieri, F., & Battino, M., (2022). Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry*, 378, 131918 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131918>
- Hu, Y., Yang, L., Liang, Z., Chen, J., Zhao, M., & Tang, Q. (2023). Comparative analysis of flavonoids extracted from *Dendrobium chrysotoxum* flowers by supercritical fluid extraction and ultrasonic cold extraction. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 36, 101267. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101267>
- Huang, X., Chen, H., Wang, X., Lan, B., & Cai, J. (2023). Effect of irradiation treatment on the functional properties of flavonoid extracts. *Applied Food Research*, 3(1), 100277. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100277>
- Jha, A., & Kumar, B. (2021). Microwave assisted synthesis of organic compounds and nanomaterials. In Kumar B. (Ed.), *Nanofibers - Synthesis, Properties and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98224>

- Kaderides, K., Papaioikonomou, L., Serafim, M., & Goula, A. M. (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 137, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
- Kaur, P., Pandey, D. K., Gupta, R. C., & Dey, A. (2019). Simultaneous microwave assisted extraction and HPTLC quantification of mangiferin, amarogentin, and swertiamarin in *Swertia* species from Western Himalayas. *Industrial Crops and Products*, 132, 449-459. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.055>
- Krishnan, R. Y., & Rajan, K. S. (2017). Influence of microwave irradiation on kinetics and thermodynamics of extraction of flavonoids from *Phyllanthus emblica*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(3), 885-899. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150628>
- Krysa, M., Szymańska-Chargot, M., & Zdunek, A. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review. *Food Chemistry*, 393, 133430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133430>
- Kussmann, M., Abe, D. H., & Berciano, S. (2023). Bioactive compounds for human and planetary health. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1193848. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1193848>
- Landa-Cansigno, C., Serviere-Zaragoza, E., Morales-Martínez, T. K., Ascacio-Valdes, J. A., Morreeuw, Z. P., Gauyat, C., Stiger-Pouvreau, V., & Reyes, A. G. (2023). The antioxidant and anti-elastase activity of the brown seaweed *Sargassum horridum* (Fucales, Phaeophyceae) and their early phenolics and saponins profiling for green cosmetic applications. *Algal Research*, 75, 103271. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103271>
- Latif, A., Khan, M. I., Latif, A., Khan, U. M., Khaneghah, A. M., & Aadil, R. M. (2024). Enhancing polyphenol extraction from white button mushrooms using microwave-assisted extraction: A response surface methodology optimization approach. *Microchemical Journal*, 203, 110876. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110876>
- León-Roque, N., Romero-Guzmán, B. M., Oblitas, J., & Hidalgo-Chávez, D. W. (2023). Identification of flavonoids by HPLC-MS in fruit waste of Latin America: A systematic review. *Scientia Agropecuaria*, 14(1), 153-163. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.014>
- Lovrić, V., Putnik, P., Kovačević, D. B., Jukić, M., & Dragović-Uzelac, V. (2017). Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technology & Biotechnology*, 55(2), 243-250. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4687>
- Morreeuw, Z. P., Castillo-Quiroz, D., Ríos-González, L. J., Martínez-Rincón, R., Estrada, N., Melchor-Martínez, E. M., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldívar, R., & Reyes, A. G. (2021a). High throughput profiling of flavonoid abundance in *Agave lechuguilla* residue valorizing under explored Mexican plant. *Plants*, 10(4), 695. <https://doi.org/10.3390/plants10040695>
- Morreeuw, Z. P., Escobedo-Fregoso, C., Ríos-González, L. J., Castillo-Quiroz, D., & Reyes, A. G. (2021b). Transcriptome-based metabolic profiling of flavonoids in *Agave lechuguilla* waste biomass. *Plant Science*, 305, 110748. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110748>
- Morreeuw, Z. P., Ríos-González, L. J., Salinas-Salazar, C., Melchor-Martínez, E. M., Ascacio-Valdés, J. A., Parra-Saldívar, R., Hafiz, M. N., & Reyes, A. G. (2021c). Early optimization stages of *Agave lechuguilla* bagasse processing towards biorefinery: drying procedure and enzymatic hydrolysis for flavonoids extraction. *Molecules*, 26(23), 7292. <https://doi.org/10.3390/molecules26237292>
- Nagula, R. L., & Wairkar, S. (2019). Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. *Journal of Controlled Release*, 296, 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.029>
- Nugrahani, R. A., Hendrawati, T. Y., Hasyim, U. H., Sari, F., & Ramadhan, A. I. (2024). Kinetic parameter for scale-up and -oryzanol content of rice bran oil as antioxidant: Comparison of maceration, ultrasonication, pneumatic press extraction. *Heliyon*, 10(10), e30880. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30880>
- Nunes, O. R., Cordeiro, M. M., Cabral, S. O. F., Marques, P. T., Quilty, B., da Silva, M. T. R., & Brian, M. G. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria*, 21 (3), 767-779. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620160003.0072>
- Oleszek, M., Kowalska, I., Bertuzzi, T. & Oleszek, W. (2023). Phytochemicals derived from agricultural residues and their valuable properties and applications. *Molecules*, 28(1), 342. <https://doi.org/10.3390/molecules28010342>
- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- Perera, P. R. D., Ekanayake, S., & Ranaweera, K. D. S. (2017). Antidiabetic compounds in *Syzygium cumini* decoction and ready to serve herbal drink. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 1083589. <https://doi.org/10.1155/2017/1083589>
- Pinela, J., Prieto, M. A., Carvalho, A. M., Barreiro, M. F., Oliveira, M. B., Barros, L., & Ferreira, I. (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Separation and Purification Technology*, 164, 114-124. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.03.030>
- Quiroz-Guzmán, E., Morreeuw Z. P., Peña-Rodríguez, A., Barajas-Sandoval, D. R., Magallón-Servín, P., Mejía, A., & Reyes, A. G. (2023). Flavonoid-enriched extract of *Agave lechuguilla* bagasse as a feed supplement to

- prevent vibriosis in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 562, 738867. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738867>
- Rifna, E. J., Misra, N. N., & Dwivedi, M. (2023). Recent advances in extraction technologies for recovery of bioactive compounds derived from fruit and vegetable waste peels: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(6), 719-752. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1952923>
- Rodsamrana, P., & Sothornvita, R. (2019). Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*, 28, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.017>
- Sai-Ut, S., Kingwascharapong, P., Rahman M. A., & Rawdkuen, S. (2023). Optimization of polyphenolic compounds from *Gossampinus malabarica* flowers by microwave-assisted extraction technology. *Future Foods*, 8, 100271. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100271>
- Saleem, M., & Saeed, M. T. (2020). Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 805-810. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.013>
- Sánchez-Robles, J. H., Luna-Enríquez, C. F., Reyes, A. G., Cruz-Requena, M., Ríos-González, L. J., Morales-Martínez, T. K., Ascacio-Valdés, J. A., & Medina-Morales, M. A., (2023). Initial study of fungal bioconversion of guishe (*Agave lechuguilla* residue) juice for bioherbicide activity on model seeds. *Fermentación*, 9(5), 421. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050421>
- Seremet, D., Jokic, S., Krunoslav Aladic, K., Cebin, A. V., Bozac, N., Mandura, A., & Komes, D. (2021). Optimization of heat-, microwave-assisted and subcritical water extraction of phenolic compounds from ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25, 100346. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100346>
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Carrera, C. A., & Palma, M. (2019). Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. *Food Chemistry*, 288, 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.107>
- Sonar, M. P., & Rathod, V. K. (2020). Microwave assisted extraction (MAE) used as a tool for rapid extraction of Marmelosin from *Aegle marmelos* and evaluations of total phenolic and flavonoids content, antioxidant and anti-inflammatory activity. *Chemical Data Collections*, 30, 100545. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100545>
- Soto-Maldonado, C., Fernández-Araya, B., Saavedra-Sánchez, V., Santis-Bernal, J., Alcaíno-Fuentes, L., Arancibia-Díaz, A., & Zúñiga-Hansen, M. E. (2022). Antioxidant and antimicrobial capacity of *Maytenus boaria* leaves, recovery by infusion and solvent extraction. *Electronic Journal of Biotechnology*, 56, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.02.002>
- Tapia-Quirós, P., Granados, M., Sentellas, S., & Saurina, J. (2023). Microwave-assisted extraction with natural deep eutectic solvents for polyphenol recovery from agrifood waste: Mature for scaling-up?. *Science of the Total Environment*, 912, 168716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168716>
- Thamrongwatwongsa, J., Chusrisom, J., Katemala, K., Tantasirin, S., Jumnongjit, P., Nateerom, P., Sonjaroon, W., Tongkok, P., Pichaiyotinkul, P., Atchara Paemane, A., Nattanan Panjaworayan T. N., & Wannarat Phonphoem, W. (2024). Determination of flavonoid content in *Grammatophyllum speciosum* and *in vitro* evaluation of their anti-skin cancer and antibacterial activities. *Heliyon*, 10(13), e33330. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33330>
- Vetal, M. D., Chavan, R. S., & Rathod, V. K. (2014). Microwave assisted extraction of ursolic acid and oleanolic acid from *Ocimum sanctum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19, 720-726. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0798-y>
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 13, 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>