



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

## **CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL, UNIDAD DURANGO**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ANTIMICROBIANA DE CUATRO RESIDUOS VERDES**

### **T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL**

**PRESENTA:**

**SILVIA ARELI AGUIRRE DE LA SERNA**

**COMITÉ TUTORIAL:**

**DRA. MARTHA ROSALES CASTRO**

**M. C. MARÍA PIOQUINTA GONZÁLEZ CASTILLO**

**M. C. MARÍA GUADALUPE REYES NAVARRETE**

**M. C. MARICELA ESTEBAN MÉNDEZ**

**Victoria de Durango, Dgo., Julio 2018**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 14:00 horas del día 05 del mes de junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de cuatro residuos verdes

Presentada por el alumno:

**AGUIRRE**

**DE LA SERNA**

**SILVIA ARELI**

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro: 

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 1 | 6 | 0 | 6 | 8 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL**

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

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Martha Rosales Castro

M. en C. María Pioquinta González Castillo

M. en C. María Guadalupe Reyes Navarrete

M. en C. Marcela Esteban Méndez

Dr. Ignacio Villanueva Fierro

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 22 de septiembre del 2017

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión Ordinaria No. 11 celebrada el día 02 del mes de diciembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

**AGUIRRE**

**DE LA SERNA**

**SILVIA ARELI**

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro: 

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 1 | 6 | 0 | 6 | 8 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
**Evaluación microbiana y antioxidante de cuatro residuos verdes**

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dra. Martha Rosales Castro y la M. en C. María Pioquinta González Castillo

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:  
**El CIIDIR-IPN Unidad Durango**  
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Martha Rosales Castro

Aspirante

Silvia Aguirre

Ing. Silvia Areli Aguirre de la Serna

M. en C. María Pioquinta González  
Castillo

Presidente del Colegio

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD DURANGO  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Durango, Dgo., el día **04** del mes de **junio de 2018** del año **2018**, la que suscribe **Silvia Areli Aguirre de la Serna** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental**, con número de registro **B160684**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Rosales Castro** y de la **M. en C. María Pioquinta González Castillo** y cede los derechos del trabajo titulado **“Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de cuatro residuos verdes”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [saas\\_01@hotmail.com](mailto:saas_01@hotmail.com), [mrciidirdgo@yahoo.com](mailto:mrciidirdgo@yahoo.com) y [gcmay01@hotmail.com](mailto:gcmay01@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

*Silvia Aguirre*

---

**SILVIA ARELI AGUIRRE DE LA SERNA**

**LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE LLEVÓ A CABO EN EL CENTRO  
INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO  
INTEGRAL REGIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, UNIDAD  
DURANGO. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA MARTHA ROSALES  
CASTRO Y LA MAESTRA EN CIENCIAS MARÍA PIOQUINTA GONZÁLEZ  
CASTILLO.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, especialmente a mis padres, que siempre me han apoyado para que siempre logre mis metas y en este caso mi crecimiento profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para poder realizar mis estudios de maestría.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR IPN Unidad Durango) por la calidad de la formación académica que me proporcionaron, así como la atención y amabilidad de todo el personal durante los dos años que participé como alumna.

A mi comité tutorial principalmente a la Dra. Martha Rosales Castro y M.C. María Pioquinta Gonzáles Castillo por todo el apoyo y paciencia que me brindaron, así como todo el conocimiento que compartieron conmigo durante todo el desarrollo de mi trabajo de investigación. De igual manera a las M.C. Maricela Esteban Méndez y María Guadalupe Reyes Navarrete por las grandes aportaciones que realizaron a mi tesis.

A mis compañeros de maestría, por ser parte de esta gran aventura y por todas las experiencias que vivimos juntos dejándonos grandes anécdotas. En especial a José Manuel Molina Amaya, Katia Gacía Casas y Pablo Zaruma Arias por su sincera amistad y por alegrarme tanto mis

## ÍNDICE GENERAL

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE ACRÓNIMOS.....                               | I    |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                           | II   |
| RELACIÓN DE FIGURAS.....                              | III  |
| RELACIÓN DE CUADROS.....                              | V    |
| RESUMEN.....  | VII  |
| ABSTRACT .....  | VIII |
| I. INTRODUCCIÓN.....                                  | 1    |
| II. ANTECEDENTES.....                                 | 3    |
| 2.1 Residuos Verdes (RV) .....                        | 3    |
| 2.1.1 Generalidades .....                             | 3    |
| 2.1.2 Problemática de manejo de RV .....              | 3    |
| 2.1.3 Ventajas y desventajas del empleo de RV.....    | 4    |
| 2.2 Residuos de alimentos.....                        | 5    |
| 2.2.1 Generalidades.....                              | 5    |
| 2.2.2 Fuentes de los residuos de alimentos.....       | 5    |
| 2.2.3 Causas principales de su generación .....       | 6    |
| 2.2.4 Principales usos de residuos de alimentos ..... | 7    |
| 2.3 Residuos agroindustriales.....                    | 8    |
| 2.3.1 Generalidades .....                             | 8    |
| 2.4 Residuos agroforestales .....                     | 9    |
| 2.4.1 Generalidades .....                             | 9    |
| 2.5 Plantas a emplear para esta investigación.....    | 10   |
| 2.5.1 Orégano ( <i>Lippia</i> sp.) .....              | 10   |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.5.2 | Aguacate ( <i>Persea americana</i> Mill.) .....                          | 13 |
| 2.5.3 | Nuez pecanera ( <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) C. Koch).....         | 16 |
| 2.5.4 | Café ( <i>Coffea</i> sp.).....   | 18 |
| 2.6   | Radicales libres y actividad antioxidante en plantas .....               | 21 |
| 2.6.1 | Radicales libres.....  | 21 |
| 2.6.2 | Antioxidantes .....  | 23 |
| 2.7   | Antimicrobianos.....   | 25 |
| 2.7.1 | Sustancias con actividad antimicrobiana procedentes de plantas .....     | 25 |
| 2.8   | Metabolitos secundarios (MS) en plantas .....                            | 26 |
| 2.8.1 | Generalidades .....  | 26 |
| 2.8.2 | Función de los MS en las plantas .....                                   | 26 |
| 2.8.3 | Síntesis en plantas de MS .....  | 27 |
| 2.8.4 | Clasificación de MS .....  | 27 |
| 2.8.5 | Importancia económica de los metabolitos secundarios.....                | 35 |
| 2.8.6 | Métodos para aislar MS .....   | 36 |
| 2.8.7 | Usos y aplicaciones de metabolitos secundarios.....                      | 37 |
| 2.9   | Características de fitopatógenos en estudio .....                        | 39 |
| 2.9.1 | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Smith ..... | 39 |
| 2.9.2 | <i>Xanthomonas vesicatoria</i> (Doidge) Dowson .....                     | 40 |
| 2.9.3 | <i>Phytophthora capsici</i> Leonian.....                                 | 41 |
| 2.9.4 | <i>Nalanthamala vermoesenii</i> (Biourge) Schroers .....                 | 42 |
| III.  | JUSTIFICACIÓN .....  | 44 |
| IV.   | OBJETIVOS.....   | 44 |
| 4.1   | Objetivo General .....   | 44 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2   | Objetivos específicos .....   | 44 |
| V.    | HIPÓTESIS .....   | 45 |
| VI.   | MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 45 |
| 6.1   | Obtención de residuos .....   | 45 |
| 6.2   | Obtención de extractos hidroalcohólicos (etanólicos) y acuosos. ....      | 46 |
| 6.3   | Evaluación rendimiento en sólidos (% w/w). ....                           | 47 |
| 6.4   | Evaluación de concentración de fenoles totales .....                      | 47 |
| 6.5   | Evaluación de flavonoides totales .....                                   | 48 |
| 6.6   | Evaluación efecto antioxidante <i>in vitro</i> .....                      | 48 |
| 6.6.1 | Radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3- etilbenzotiazolin-6 sulfónico).....  | 48 |
| 6.6.2 | Radical DPPH (ácido 2,2'-azinobis-3- etilbenzotiazolin-6 sulfónico).....  | 49 |
| 6.7   | Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos vegetales de RV .....   | 50 |
| 6.7.1 | Actividad antibacterial .....   | 50 |
| 6.7.2 | Actividad antifúngica .....   | 51 |
| 6.8   | Análisis estadístico.....   | 52 |
| 6.9   | Identificación de compuestos químicos mayoritarios en los extractos ..... | 53 |
| VII.  | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 53 |
| 7.1   | Evaluación rendimiento en sólidos (% w/w). ....                           | 53 |
| 7.2   | Evaluación de concentraciones totales de fenoles y flavonoides.....       | 56 |
| 7.3   | Evaluación de la actividad antioxidante .....                             | 59 |
| 7.3.1 | Radical ABTS .....  | 59 |
| 7.3.2 | Radical DPPH.....   | 63 |
| 7.4   | Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos vegetales de RV .....   | 66 |
| 7.4.1 | Actividad antibacterial.....  | 66 |
| 7.4.2 | Actividad antifúngica .....   | 74 |

|   |     |
|---|-----|
| 7.5 Análisis estadístico.....   | 86  |
| 7.5 Identificación de compuestos químicos mayoritarios en los extractos ..... | 95  |
| VIII. CONCLUSIONES .....  | 99  |
| IX. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS .....                                       | 100 |
| X. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....   | 101 |
| ANEXOS.....   | 123 |

## LISTA DE ACRÓNIMOS

|                  |   |
|------------------|---|
| APT              | Agua peptonada tamponada                                    |
| CE <sub>50</sub> | Concentración efectiva cincuenta                            |
| CMI              | Concentración mínima inhibitoria                            |
| <i>Cmm</i>       | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> |
| ES               | Extracto seco   |
| MS               | Metabolitos secundarios                                     |
| PDA              | Agar papa dextrosa  |
| RL               | Radical libre   |
| RV               | Residuos verdes   |
| SRF              | Solución reguladora de fosfatos                             |
| Xv               | <i>Xanthomonas vesicatoria</i>                              |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| %             | Porcentaje  |
| °C            | Grados centígrados  |
| µg/mL         | Microgramo por mililitro  |
| µL            | Microlitros   |
| µM Trolox/g   | Micromol de Trolox por gramo  |
| g             | Gramos  |
| M             | Molar   |
| mg EAG/g ES   | Miligramo de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco  |
| mg ECA/g ES   | Miligramo de equivalentes de catequina por gramo de extracto seco     |
| mg ECA/g ES   | Miligramos de equivalente de catequina por gramo de extracto seco     |
| mg EGA/g ES   | Miligramos de equivalente de ácido gálico por gramos de extracto seco |
| mL            | Mililitros  |
| Mm            | Milimolar   |
| Mmol Trolox/g | Milimol de Trolox por gramos  |
| nm            | Nanometros  |
| ppm           | Partes por millón   |

## RELACIÓN DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Vías de síntesis de los metabolitos secundarios principales.....   | 28 |
| Figura 2. Estructura genérica de un flavonoides .....  | 30 |
| Figura 3. Comparación de rendimiento en sólidos de cada extracto obtenido con los distintos solventes orgánicos.....   | 54 |
| Figura 4. Concentraciones de fenoles totales y flavonoides en los extractos acuosos.....   | 56 |
| Figura 5. Concentraciones de fenoles totales y flavonoides en los extractos etanólicos .....   | 57 |
| Figura 6. Porcentaje de inhibición de los extractos acuosos.....   | 61 |
| Figura 7. Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos .....   | 62 |
| Figura 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH obtenido en los extractos acuosos.....   | 63 |
| Figura 9. Porcentaje de inhibición del radical DPPH obtenido en los extractos etanólicos .....   | 64 |
| Figura 10. Gráficas comparativas de rendimiento de los dos solventes empleados con los residuos de aguacate, café, orégano y ruezno .....  | 87 |
| Figura 11. Diferencias de medias de los solventes con respecto al rendimiento obtenido .....   | 88 |
| Figura 12. Diferencias de medias de los residuos con respecto al rendimiento que se obtuvo a partir de sus extractos.....  | 88 |
| Figura 13. Comparación de contenido de fenoles totales en relación al solvente y residuos (aguacate, café, orégano y ruezno) de los cuales se obtuvieron los extractos acuosos y etanólicos..... | 89 |
| Figura 14. Comparación entre el contenido de flavonoides de los extractos (etanol y agua) obtenidos de los residuos de aguacate, café, orégano y ruezno.....                                     | 90 |
| Figura 15. Comparación de los resultados de actividad antioxidante con respecto al racial ABTS expresado según el estándar comercial Trolox .....  | 91 |
| Figura 16. Comparativo de resultados de actividad antioxidante contra el radical ABTS en relación a los residuos de aguacate, café, orégano y ruezno .....                                       | 92 |

Figura 17. Resultados de actividad antioxidante contra DPPH, en relación a los extractos de aguacate, café, orégano y ruezno..... 93

Figura 18. Comparativo de la inhibición que presentaron los extractos de los residuos a distintas concentraciones con respecto a cuatro microorganismos fitopatógenos..... 94

Figura 19. Comparativo de la inhibición de los extractos de aguacate, café, orégano y ruezno a distintas concentraciones ..... 95

Figura 20. Cromatograma total de lones de los extractos de semilla de aguacate, café, orégano y ruezno obtenido por espectrometría de masas..... 96

## RELACIÓN DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Reporte de contenido de polifenoles en residuos.....  | 32 |
| Cuadro 2. Rendimiento en sólido de cada extracto en cada planta a experimentar<br>.....   | 54 |
| Cuadro 3. Valores medios de fenoles totales y flavonoides de cada residuo con su<br>respectivo solvente.....  | 58 |
| Cuadro 4. Actividad antioxidante de extractos con respecto al radical ABTS<br>expresados en % de inhibición y TEAC .....  | 60 |
| Cuadro 5. Actividad antioxidante de extractos con respecto al radical DPPH<br>expresados en CE <sub>50</sub> .....  | 65 |
| Cuadro 6. Respuesta de las diferentes concentraciones sobre actividad<br>antimicrobiana contra la bacteria fitopatógena <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp.<br><i>michiganensis</i> ..... | 67 |
| Cuadro 7. Concentración mínima inhibitoria de extractos de residuos vegetales<br>contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....                                    | 69 |
| Cuadro 8. Respuesta de las diferentes concentraciones de extractos contra<br>bacteria la fitopatógena <i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....  | 69 |
| Cuadro 9. Pruebas con concentraciones menores de extractos para determinar<br>CMI.....  | 71 |
| Cuadro 10. Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas contra <i>Xanthomonas</i><br><i>vesicatoria</i> .....   | 72 |
| Cuadro 11. Actividad antimicrobiana contra hongo fitopatógeno <i>Phytophthora</i><br><i>capsici</i> .....   | 75 |
| Cuadro 12. Resultados finales contra <i>Phytophthora capsici</i> .....  | 77 |
| Cuadro 13. Respuesta de la actividad antimicrobiana contra hongo fitopatógeno<br><i>Nalanthamala vermoesenii</i> .....  | 77 |
| Cuadro 14. Concentraciones de extractos de aguacate y orégano a 3000 y 4000<br>ppm contra <i>Nalanthamala vermoesenii</i> .....   | 79 |
| Cuadro 15. Respuesta de los extractos de cuatro residuos verdes contra<br><i>Nalanthamala vermoesenii</i> .....   | 81 |
| Cuadro 16. Resultados finales obtenidos.....  | 84 |

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 17. Resultados de ANOVA con respecto al rendimiento de los extractos de aguacate, café, orégano y ruezno .....                            | 86 |
| Cuadro 18. Resultados obtenidos de la ANOVA para los resultados obtenidos de la concentración de fenoles totales en los distintos extractos..... | 89 |
| Cuadro 19. Datos obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) respecto a los resultados de flavonoides.....  | 90 |
| Cuadro 20. Resultados de análisis de ANOVA respecto a lo obtenido en la inhibición del radical ABTS a distintas concentraciones.....             | 91 |
| Cuadro 21. Resultados de análisis de ANOVA respecto a lo obtenido en la inhibición del radical DPPH a distintas concentraciones .....            | 92 |
| Cuadro 22. Resultados del análisis ANOVA en relación a la inhición microbiana de los extractos .....   | 93 |
| Cuadro 23. Análisis de los espectros de masas de los extractos para la identificación de los compuestos mayoritarios. ....                       | 97 |

## RESUMEN

### Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de cuatro residuos verdes

**Palabras clave:** residuos verdes, antioxidantes, antimicrobianos

Los residuos verdes están constituidos por residuos de alimentos, agroindustriales y agroforestales y su volumen se ha ido incrementando generando problemas de contaminación ambiental y en la salud humana. Tales residuos son una fuente potencial de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, los cuales además de ser antioxidantes, poseen actividad antimicrobiana y antifúngica. Por lo que se probaron extractos (acuosos y etanol 70%) de residuos de semilla de aguacate (*Persea americana*), orégano (*Lippia* sp.), café (*Coffea* sp.) y ruezno (*Carya illinoensis illinoensis*). De tales extractos se determinó que el extracto de orégano con etanol fue el que presentó el mayor rendimiento con 22.71%, de igual tuvo una mayor concentración de fenoles totales (268.75 mg EAG/g ES) y de flavonoides (121 ECA/g ES). Tal extracto también tuvo la mayor actividad antioxidante respecto a los radicales ABTS ( $CE_{50}$  248.91) y DPPH ( $CE_{50}$  573.14). Las pruebas de actividad antimicrobiana de todos los extractos se realizaron a concentraciones de 500, 1000 y 2000 ppm, contra cuatro microorganismos fitopatógenos, presentándose inhibición por parte de los extractos etanólicos de semilla de aguacate y orégano, principalmente contra las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* y *Xanthomonas vesicatoria*, nula inhibición respecto al hongo *Phytophthora capsisi*, así como una moderada inhibición contra *Nalanthamala vermoesenii*. Los residuos de orégano y semilla de aguacate resultaron ser eficaces contra patógenos que causan enfermedades en plantas de importancia económica. Se recomienda análisis posteriores a nivel invernadero para determinar la toxicidad de los extractos con potencial antimicrobiano.

## ABSTRACT

### Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of four green waste

**Key words:** green waste, antioxidants, antimicrobial

Green waste is made up of food, agro-industrial and agroforestry residues and its volume has increased, generating problems of environmental pollution and human health. Such residues are a potential source of bioactive compounds, such as phenolic compounds, which in addition to being antioxidants, possess antimicrobial and antifungal activity. Extracts (aqueous and 70% ethanol) of avocado seed waste (*Persea americana*), oregano (*Lippia* sp.), spent coffee (*Coffea* sp.) and ruezno (*Carya illinoensis illinoensis*). From these extracts was discovered that the ethanolic extract from oregano presented the highest yield with 22.71%, as the higher concentration of total phenols (268.75 mg EAG / g ES) and flavonoids (121 ECA / g ES). Such extract also had the highest antioxidant activity against the ABTS radical (EC<sub>50</sub> 248.91) and DPPH radical (EC<sub>50</sub> 573.14). The antimicrobial activity tests of all the extracts were carried out at concentrations of 500, 1000 and 2000 ppm, against four phytopathogenic microorganisms, showing inhibition the ethanolic extracts of avocado seed and oregano, mainly against the bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria*, no inhibition regarding the fungus *Phytophthora capsici*, as well as a moderate inhibition against *Nalanthamala vermoesenii*. The residues of oregano and avocado seed turned out to be effective against pathogens that cause diseases in plants of economic importance. Further analysis at the greenhouse level is recommended to determine the toxicity of extracts with antimicrobial potential

## I. INTRODUCCIÓN

Lo que actualmente se conoce como residuos verdes, son aquellos que están constituidos principalmente por residuos de alimentos, residuos agroindustriales y agroforestales (Kuppusamy *et al.*, 2015), los cuales se han incrementado debido a la creciente industrialización y consumismo, generando contaminación ambiental e impactos en la salud humana debido a la incorrecta gestión de tales residuos (Cortinas, 2002)

Sin embargo, estos residuos pueden ser aprovechados por sus componentes bioactivos, es por esto que se eligieron para esta investigación los residuos de orégano (*Lippia* sp.) que se generan después de la extracción de aceite esencial, semilla de aguacate (*Persea americana* Mill.), residuos de café (*Coffea* sp.) que se obtienen al preparar la bebida que lleva el mismo nombre y residuos de ruezno de nuez pecanera (*Carya illinoensis illinoensis* (Wangenh) C. Koch). Residuos a los cuales comúnmente no se les da un uso alternativo y terminan como basura, se queman a cielo abierto o se dejan en el campo como en el caso del ruezno, generando problemas de contaminación.

Existe evidencia de que estos residuos poseen compuesto fenólicos los cuales no sólo proporcionan actividad antioxidante sino también otros mecanismos preventivos como actividad antibacteriana y antifúngica (Dueñas *et al.*, 2009).

Esto aunado a que en México y el mundo, dentro de las principales causas en las pérdidas de productividad de los agroecosistemas se debe a enfermedades ocasionadas por hongos, virus y bacterias (Ferrar-Cerrato y Alarcón, 2010), tales como las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* y hongos como *Phytophthora capsici* y *Nalanthamala vermoesenii*. Enfermedades que generan grandes pérdidas económicas para los productores y que comúnmente se contrarrestan con plaguicidas sintéticos los cuales generan envenenamiento en agricultores y consumidores, contaminación ambiental, así

como resistencia a las plagas y enfermedades que atacan tales cultivos. Estas sustancias químicas son ampliamente usadas debido a que existe poca divulgación respecto a la aplicación y funcionalidad de los plaguicidas botánicos (Barrera-Necha *et al.*, 2008; Pérez, 2012).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar la actividad tanto antioxidante y antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de los residuos de semilla de aguacate, café, orégano y ruezno, para sugerir un uso alternativo viable y por lo tanto un posible valor agregado a tales residuos. Siempre con el objetivo de disminuir el impacto ambiental que están generando actualmente dichos residuos.

## II. ANTECEDENTES

Las frutas, verduras y especias son parte importante de una buena alimentación, estos generan residuos en grandes cantidades, lo que representa un grave problema para el medio ambiente. Dentro de esta investigación se considera que los residuos son cualquier material, producto, insumo, subproducto que se genere durante el procesamiento de estos alimentos, los que se desechan. Y se han incrementado debido a la creciente industrialización y consumismo, generando contaminación ambiental debido a la incorrecta gestión de tales residuos (Cortinas, 2002). Sin embargo, estos residuos pueden ser aprovechados por sus componentes bioactivos, por lo que se han realizado esfuerzos para reutilizarlos (Duda-Chodak y Tarko, 2007).

### 2.1 Residuos Verdes (RV)

#### 2.1.1 Generalidades

Lo que actualmente se conoce como residuos verdes, son aquellos que están constituidos principalmente por residuos de alimentos, residuos agroindustriales y agroforestales (Kuppusamy *et al.*, 2015).

De acuerdo con Pinto y Zilberman (2014), la agricultura genera gran cantidad de este tipo de residuos verdes, se estima que produce 140 billones de toneladas métricas a nivel mundial de biomasa. Como fuente de residuos verdes provenientes de la agricultura tenemos las ramas caídas, hojas y flores de árboles, recortes de césped, los residuos generados por la poda de árboles y arbustos, malas hierbas y residuos de jardinería, todos estos considerados como basura.

#### 2.1.2 Problemática de manejo de RV

Según Pinto y Zilberman (2014), queda de manifiesto que el aumento en el volumen y el tipo de residuos verdes que se produce a nivel mundial representa un problema para la gestión y minimización de residuos. Dichos problemas se han generado principalmente por el manejo inapropiado que se les da a los residuos y su acumulación, lo cual solo ha contribuido a la

contaminación del suelo, aire y agua. Estos problemas se ven aún más afectados por los efectos negativos que está ocasionando el cambio climático. Por lo tanto resulta perjudicial la acumulación de tales residuos verdes, en base a esto se ha generado una necesidad para poder hacer desarrollos tecnológicos, siempre y cuando estos sean respetuosos con el medio ambiente con el fin de poder llegar a lograr la disminución de tales residuos. La jerarquía que suele emplearse dentro de la política para su manejo es en primer lugar está la reducción de los residuos, después reutilizarlos, reciclarlos, incinerarlos y recuperar el calor generado y por último colocarlos en rellenos sanitarios.

De las actividades agroindustriales se obtienen residuos verdes principalmente como cáscaras, pulpas, como cáscaras de nueces o semillas, paja, entre otros (Kuppusamy *et al.*, 2015).

En México se considera que se generan cerca de 120 millones de basura al año, lo cual conlleva a una generación de 1.2 kg per cápita. De esos millones de basura cerca del 50% son residuos de alimentos y de jardín, es decir residuos orgánicos 100% biodegradables. Si se llegara realmente a dar un aprovechamiento a todos esos residuos orgánicos solo se generarían 17% de la basura que en la actualidad se está produciendo (Aguilar, 2008). Incluso para el 2012 en la Ciudad de México se estimó que se generaban cerca de 12 mil toneladas diarias de basura, cantidad con la cual se podría llenar el Estadio Azteca en aproximadamente tres meses, y de igual manera se determinó que cerca del 40% de estos residuos eran orgánicos (Cadena *et al.*, 2012).

### **2.1.3 Ventajas y desventajas del empleo de RV**

Kuppusamy *et al.* (2015) mencionan ventajas y desventajas que se tienen al emplear residuos verdes para remediación:

- **Ventajas:** Estas van desde lo monetario que conllevan que sería algo económico. Sería renovable y accesible.  
Se considera seguro desde un punto de vista ecológico, lo cual a su vez conlleva a un proceso de limpieza natural y por tanto comenzar una

restauración del ambiente para intentar lograr que llegue a sus condiciones originales. Con el manejo de este tipo de residuos verdes se puede minimizar su desperdicio y por lo tanto la generación de toxinas.

- Desventajas: Existe un espacio falto de conocimiento sobre el posible proceso de recuperación de los ecosistemas. De igual manera existe una incertidumbre respecto a la interacción que los residuos verdes puedan tener con otros microorganismos o contaminantes.

De acuerdo al uso y manejo de los residuos verdes, estos se dividen en residuos de los alimentos, residuos agroindustriales, agroforestales, principalmente.

## **2.2 Residuos de alimentos**

### **2.2.1 Generalidades**

Según la literatura y como definición se puede encontrar que los residuos de alimentos se consideran aquellas pérdidas de alimentos que se producen al final de la cadena alimenticia y que se encuentran relacionados con el comportamiento del consumidor.

Dentro de la clasificación de los residuos de alimentos existen tres categorías:

- a. Pérdidas de alimentos: aquellos residuos que se generan durante la producción.
- b. Residuos inevitables de alimentos: son los que se generan durante el consumo (cáscaras, centros de frutas, entre otros).

Residuos evitables de alimento: se generan a partir de aquellos alimentos que pudieron ser consumidos, pero que al final terminan perdiéndose durante la etapa de consumo (Thi *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Fuentes de los residuos de alimentos**

Thi *et al.* (2015) mencionan que los residuos de alimentos provienen principalmente de las siguientes fuentes:

1. Producción agrícola
2. Manejo de pos cosecha y almacenamiento
3. Procesamiento
4. Distribución

Realizando una revisión general sobre la generación de residuos de alimentos, se puede considerar que en los países en vías de desarrollo los residuos de alimentos constituyen de 50-55% del total de residuos sólidos. En países como Brasil, Malasia, México e India la relación de residuos de alimentos en relación a los residuos sólidos totales es de 54.9%, 55%, 52% y 51% respectivamente. De estos residuos un gran parte de ellos está constituido por residuos orgánicos. Se estima que la cantidad de generación de residuos de alimentos en las zonas urbanas a nivel global incrementará un 44% entre los años de 2005 y 2025.

### **2.2.3 Causas principales de su generación**

Como lo mencionan Giroto *et al.* (2015), en los países con ingresos bajos las causas principales de las pérdidas de alimentos y residuos que se generan es debido a limitaciones financieras, técnicas y administrativas, de igual manera debido a las pocas facilidades de refrigeración y almacenamiento bajo difíciles condiciones climáticas, de infraestructura, así como los sistemas de comercialización y envasado.

En relación a los países con ingresos medios y altos las pérdidas aquí se presentan principalmente por el comportamiento que tiene el consumidor. Por otro lado los acuerdos que se realizan entre el agricultor y el comprador pueden llegar a contribuir al aumento de desperdicios de cultivos agrícolas. Ya en el nivel de consumo, el planeo inadecuado del “consumase antes de” genera gran cantidad de residuos, esto combinado con actitud de indiferencia que presentan los consumidores

#### 2.2.4 Principales usos de residuos de alimentos

Actualmente de acuerdo con Thi *et al.* (2015), los usos que principalmente se le están dando a este tipo de residuos de alimentos se describen a continuación:

- a) Alimentación de animales: se emplea en aquellos países donde la demanda de alimento de ganado es muy elevada, teniendo como ejemplo a Japón, Corea del Sur y Taiwán. En contraste, en países en vías de desarrollo este tipo de usos no puede ser aplicado aún, debido a que todo tipo de residuos sólidos se mezclan y por lo tanto se vuelve muy complicado emplearse para alimentación de ganado.
- b) Digestión anaeróbica: es un tipo de aplicación que se lleva a cabo principalmente en países desarrollados como la Unión Europea y Asia. Los principales problemas a enfrentar con los digestores anaeróbicos son las fallas técnicas que se generan, su operación inadecuada y las regulaciones de su manejo.
- c) Compostaje: este tipo de aplicaciones es considerado como un método eficiente principalmente para países en vías de desarrollo. Uno de los problemas que se tiene en este ámbito es que el mercado de las compostas tiene mucha competencia principalmente con los fertilizantes químicos.
- d) Incineración: es un método que podría ser considerado como una manera eficiente de disminuir el volumen de desperdicios que se acumulan en los vertederos. Sin embargo su costo sería muy elevado, desde la operación técnica hasta el control de residuos de las emisiones de gas.
- e) Vertederos: cerca del 90% del total de los residuos de alimentos termina en vertederos. Se considera que esta es la disposición final que más comúnmente se les da a los residuos de alimentos en los países en vías de desarrollo. Uno de los principales problemas que se distinguen en los vertederos es la generación de vectores de enfermedades, añadiendo que el depósito de residuos de alimentos en vertederos puede aumentar las emisiones de gas invernadero a una tasa de 8%.

- f) Producción de biocombustibles y bioenergía. Girotto *et al.* (2015) menciona que el origen de los residuos de alimentos se encuentra directamente relacionado con su composición química, teniendo una variabilidad en el contenido de lípidos, proteínas, carbohidratos, entre otros. Debido a estas modificaciones existe la producción de distintos biocombustibles, empleándose principalmente bioprocesos o procesos termoquímicos como:
- a. Transesterificación de aceites y grasas para producir biodiesel
  - b. Fermentación de carbohidratos para producir bioetanol o biobutanol
  - c. Digestión anaeróbica para producir biogás (gas rico en metano)
  - d. Fermentación oscura para producir hidrógeno
  - e. Pirolisis y gasificación
  - f. Carbonización hidrotérmica
  - g. Incineración.

## **2.3 Residuos agroindustriales**

### **2.3.1 Generalidades**

Los residuos agroindustriales están constituidos por cáscaras, vainas, tallos, y pulpa los cuales no se pretenden usar (Vojvodić *et al.*, 2016).

Según Chapla *et al.* (2010), actualmente los problemas de contaminación se encuentran relacionados con estos residuos agroindustriales debido a la falta de lugares para su disposición final así como la falta de opciones de tratamiento, esto ha forzado a realizar una bio conversión de este tipo de residuos a productos de alto valor. El reciclaje es una actividad económica viable que se encuentra en aumento como solución a algunos de los problemas más serios de la humanidad.

Por lo tanto se considera que las grandes cantidades de residuos de biomasa de plantas las cuales son consideradas como un deshecho tienen el potencial para ser empleados para obtener productos de alto valor como biocombustibles, alimento para animales, productos químicos y enzimas.

De igual manera se han determinado otras aplicaciones para residuos agroindustriales como para la elaboración de bloques ecológicos de construcción (Fuentes *et al.*, 2015), para la producción de metano (González-Sánchez *et al.*, 2015) y Cury *et al.* (2017) menciona distintas aplicaciones para estos residuos como son en obtención de hongos comestibles, en la industria láctea (lactosuero), producción de biohidrógeno, elaboración de compost, entre otras muchas más posibles aplicaciones.

## **2.4 Residuos agroforestales**

### **2.4.1 Generalidades**

Los residuos agroforestales son aquellos que se generaran como consecuencia del mantenimiento y mejoras forestales tales como la poda, limpiezas, etc., también se pueden generar estos residuos al cortar árboles para elaborar productos. Todo esto genera residuos los cuales no puedes simplemente quedarse en el lugar donde se generan ya que pueden incrementar el riesgo de plagas e incendios (Ochoa, 2014).

Dentro de las investigaciones realizadas para lograr dar aplicaciones a estos residuos se encuentra la fermentación en estado sólido para la producción de hongo Shiitake (Romero-Arenas *et al.*, 2015), obtención de bioenergía (Suárez y Martín, 2010), como biofertilizantes (Luna *et al.*, 2013), para la obtención de carbón activado (Lotfy *et al.*, 2012), para la adsorción selectiva de metales (Rosales *et al.*, 2015), entre otras.

Como se mencionó anteriormente, los residuos pueden aprovecharse por sus componentes bioactivos, dentro de los restos de alimentos, agroindustriales y agroforestales, se encuentran el orégano, aguacate, nuez pecana y café, por lo que se mencionará algunas características de estas plantas.

## **2.5 Plantas a emplear para esta investigación**

### **2.5.1 Orégano (*Lippia* sp.)**

#### **2.5.1.1 Generalidades**

De acuerdo con Huerta (1997), el nombre de orégano se le da a más de 40 especies de plantas mexicanas, las cuales pertenecen a las familias botánicas Compuestas, Labiadas, Leguminosas y Verbenáceas.

Sin embargo comúnmente al orégano mexicano se le denomina con los nombres científicos de *Lippia graveolens* H.B.K. y *Lippia berlandieri* Schauer, empleándose de forma más común este último. Siendo así que *Lippia* L. es un género conformado por casi 200 especies, de las cuales en México se reconocen 31 de ellas (González *et al.*, 2011).

#### **2.5.1.2 Producción mundial de orégano**

La producción mundial de orégano se encuentra distribuida entre países exportadores, donde México es el principal productor de orégano a nivel mundial con el 35-40% de la producción total mundial, del cual el 85% se exporta a Estados Unidos y 5% a Europa y Asia. En segundo lugar de producción mundial se encuentra Turquía con el 30% (*Origanum onites* L.) y Grecia en tercer lugar con una producción del 22.5% (*Origanum vulgare* ssp.) (Vivas *et al.*, 2017)

#### **2.5.1.3 Producción en México de orégano**

En México el orégano se considera como un producto forestal no maderable, la distribución de especies de orégano se presenta en casi todo México de forma silvestre, principalmente en zonas áridas y semiáridas. La mayor obtención de orégano se presenta en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas, incorporándose recientemente Chihuahua, Coahuila, Oaxaca, Puebla y Tamaulipas (López *et al.*, 2011). Empleándose para su comercialización sólo la hoja del arbusto, la cual representa el 40% de la planta (Rosales, 2015)

Dentro del estado de Durango los municipios con mayor producción de orégano se encuentran General Simón Bolívar, Nazas, Rodeo, Cuencamé, El

Mezquital y Mapimí. Reportándose que para el 2005 se obtuvieron 4,729,346 kilogramos de orégano en el Estado de Durango (López *et al.*, 2011).

#### 2.5.1.4 Principales usos del orégano

Algunos de los usos más comunes que se le da al orégano son los siguientes:

**Medicinales:** estudios demuestran que el aceite esencial de orégano posee actividad biológica contra hongos, bacterias, insectos y virus, como antioxidante y desinfectante, así como antiespasmódico lo cual ha incrementado su exportación (Corella-Bernal y Ortega-Nieblas, 2013). Algunos microorganismos patógenos contra los que ha sido probado el aceite esencial de orégano se encuentran *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. thyphi*, *P. aeruginosa* (Rivero-Cruz *et al.*, 2011), *Salmonella enterinditis*, *L. monocytogenes* (Reyes-Jurado *et al.*, 2016).

De igual manera es útil para tratar enfermedades respiratorias, sífilis, gonorrea, para infecciones cutáneas, desordenes hepáticos y desordenes menstruales (Rosales, 2015). Se ha demostrado que extractos de orégano presentan beneficios para la salud humana contra enfermedades crónico-degenerativas al tener actividad hipoglucémica, hipotensiva e hipolipidémica, y beneficios contra enfermedades neurodegenerativas empleando aceite esencial de orégano (García-Pérez *et al.*, 2012).

**Industrial:** el Timol y Carvacrol que se obtiene de las plantas de orégano, se extrae principalmente en empresas ubicadas en Europa y Estados Unidos, los cuales los comercializan para su uso en la industria alimentaria ya sea como antioxidante o como conservador de alimentos. De igual manera se ha llegado a utilizar para limpieza de piezas automotrices y para hacer veladoras (Orona *et al.*, 2017).

**Uso en perfumería:** se utiliza para fabricar jabones y cosméticos así como de igual manera forma parte de ciertos perfumes, empleándose como esencia (Rosales, 2015).

**Usos culinarios:** sus hojas principalmente se emplean como condimento para dar sabor y aroma a los alimentos (Rosales, 2015), así como para la elaboración de embutidos (Corella-Bernal y Ortega-Nieblas, 2013).

**Agroindustrial:** como aceite esencial de orégano se le emplea debido a su activada contra hongos, bacterias, insectos y nematodos (Rosales, 2015), debido a esto se emplea en granos almacenados lo cual podría sustituir el uso de agroquímicos en estos productos post cosecha y por lo tanto disminuir el impacto en el ambiente generado por los agroquímicos (Orona *et al.*, 2017). De igual manera el aceite esencia ha sido probado contra algunos microorganismos fitopatógenos como *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (González-Espíndola *et al.*, 2011) y *Alternaria alternata* (Rodríguez-García *et al.*, 2015)

**Obtención de aceite esencial de orégano:** como se menciona anteriormente la mayoría de las aplicaciones o usos del orégano es a partir de su aceite esencial el cual es uno de los productos principales que se obtiene a partir de la hoja, este producto en México se comercializa principalmente con Estados Unidos de América, Italia y Japón. Cuando se realiza el proceso de extracción del aceite esencial de las hojas de orégano, por el proceso que sea, se genera un residuo que se conoce como “bagazo” el cual es un residuo vegetal que constituye aproximadamente cerca del 90% en pesos seco de su peso al inicio (Rosales, 2015) y es este es uno de los residuos empleados en esta investigación.

Por otra parte cuando se obtiene dicho aceite esencial se obtiene un rendimiento que se encuentra entre 2% y 6%, esta variación se debe a la altitud del lugar de cultivo, época de recolección, entre otros (Acevedo *et al.*, 2013), otra razón por la cual se emplea ese residuo para su investigación.

#### **2.5.1.5 Usos del residuo de orégano**

De acuerdo con Meléndez *et al.* (2013) los residuos de orégano obtenidos después de la extracción de aceite esencial pueden ser empleados para fermentación en estado sólido. Mientras que Oumam *et al.* (2013) sugieren que

estos mismos residuos puede ser una buena opción para la obtención de carbón activado.

De igual manera se han realizado análisis para el compostaje de los residuos de orégano (Corral, 2011).

## **2.5.2 Aguacate (*Persea americana* Mill.)**

### **2.5.2.1 Generalidades**

*Persea americana* Mill. es una árbol que se puede encontrar principalmente en México, Guatemala y Antillas. Las variedades más comercializadas en el mercado internacional son las provenientes de Guatemala o Mexicana, particularmente Hass, Fuerte y Nabal, siendo reemplazada la variedad Fuerte por la Hass debido a su calidad, productividad y resistencia al manejo comercial. En Estados Unidos se tiene un mayor consumo de aguacate variedad Hass, mientras que en Europa las principales variedades que se consumen son Hass y Fuerte (Secretaría de Economía, 2012).

Lo que comúnmente se conoce como aguacates, son los frutos de esta planta, entre las características de este fruto es que tiene una cáscara de color verde olivo y una pulpa de color verde amarillo (Giffoni *et al.*, 2009)

En México se pueden encontrar distintas variedades de aguacate como lo son el Hass, Fuerte, Criollo, Bacón, Pinkerton, Gwen y Reed, los cuales se encuentran disponibles en distintas épocas del año (SAGARPA, 2011) y poseen características diferentes en cuanto a apariencia, tamaño y susceptibilidad al frío (Imafidon y Amaechina, 2010).

### **2.5.2.2 Producción mundial de aguacate**

En cuanto a la producción mundial México ocupa el primero lugar con un tercio de la producción global, seguido de países como Chile y República Dominicana (Ayala y Ledesma, 2014).

### 2.5.2.3 Producción en México de aguacate

Según lo reportado por SIAP (2017) los principales estados en México productores de aguacate son Michoacán, Jalisco y Estado de México. Teniéndose un promedio de producción entre el 2007 y el 2016 de 1,375 miles de toneladas de las cuales se exportaron más de un millón de toneladas. Esto convierte a México en el país con la mayor producción de aguacate a nivel mundial, teniendo como principales destinos de exportación de aguacate a Estados Unidos y Japón.

### 2.5.2.4 Usos del aguacate

**Industrialización del aguacate.** El aguacate sufre procesos en la industria principalmente para la obtención de aceite de aguacate debido a su calidad nutricional al contener entre 80-85% de ácidos grasos insaturados ayudando a disminuir el riesgo de padecer arterosclerosis. Por otro lado se industrializa el aguacate para la conservación de su pulpa, lo cual ocurre mediante su congelamiento, teniendo principalmente la presentación de guacamole debido a su gran aceptación en el mercado mundial (SAGARPA, 2011). De igual manera el aguacate se emplea como base para elaborar productos untables en canapés, papas fritas, y galletas (Olaeta, 2016).

**Cosméticos.** El aguacate procesado se puede emplear directo como aceite o emplearse en la elaboración de cremas corporales, cremas faciales, champús, jabones, rímel y lápiz labiales (Ornela y Yahia, 2002).

**Propiedades medicinales:** La infusión de las hojas de aguacate se emplean para contrarrestar padecimientos como la fiebre, calambres menstruales y migraña, cansancio, resfriados y tos. El aceite de aguacate se puede emplear para aliviar malestares ocasionados por reumatismo y gota, frotándolo directamente en el área afectada. Algunos otros malestares con los que coadyuva el aguacate son la mala digestión, flatulencias, problemas renales, y de la piel (Pérez *et al.*, 2015; Ornela y Yahia, 2002).

**Fuente de alimento:** La producción del aguacate se da debido principalmente a la demanda que existe debido a su consumo como alimento, ya que su pulpa es una buena fuente de energía, proteína y minerales (Pérez *et al.*, 2015).

Actualmente existe una tendencia global sobre el procesamiento de frutas, de tales procedimientos se obtienen subproductos como la semilla del aguacate la cual normalmente se desecha y por eso se plantea su análisis en esta investigación (Giffoni *et al.*, 2009), además de que la cáscara y semilla del aguacate representan cerca del 33% del peso total de esta fruta (Dreher y Davenport, 2013), y la semilla por si sola constituye del 13-18% del total del aguacate (Padilla-Camberos *et al.*, 2013) y esto último comúnmente termina en la basura.

Como ya se había mencionado estos subproductos pueden ocasionar problemas ecológicos lo cual a su vez traen como consecuencia que aumente el número de insectos y roedores (Giffoni *et al.*, 2009). Sin embargo este tipo de residuos puede ser de gran interés para la industria ya que puede ser usado para la obtención de componentes bioactivos (Dreher y Davenport, 2013).

#### **2.5.2.5 Usos de los residuos del aguacate**

Como se aprecia anteriormente el consumo que se tiene del aguacate es principalmente de su pulpa, por lo que comúnmente la cáscara y la semilla se desechan. Sin embargo se ha probado que estos residuos poseen actividad antioxidante, se ha evaluado la extracción de pigmentos, harinas y/o almidón. Así como ambos residuos pueden ser transformados en composta o como alimento para ganado, e incluso se han realizado pruebas para la obtención de biocombustibles (Muñoz y Rojas, 2016).

#### **2.5.2.6 Usos de la semilla de aguacate**

Dentro de los usos que se le dan a la semilla de aguacate, es empleado como una fuente de agentes fitoterapéuticos, los cuales comúnmente se han utilizado para tratar infecciones tanto micóticas como parasitarias. De igual

manera se conoce que las semillas del aguacate se emplean para disminuir el dolor muscular, es decir que tiene efectos anestésicos. Debido a que en las semillas de aguacate se ha logrado identificar fitoesteroles, triterpenos, ácidos grasos, dímeros de flavonoides, proantocianidinas y ácido abscísico. Algunos de los antes mencionados se encuentran relacionados con efectos larvicidas y actividad antifúngica (Giffoni *et al.*, 2009). En Nigeria se emplea el extracto acuoso de la semilla de aguacate para tratar los problemas de hipertensión (Imafidon y Amaechina, 2010).

Muños y Rojas, 2016 mencionan que incluso la semilla de aguacate ha sido probada para tratar agua con azul de metileno preparada en laboratorio, mediante su transformación a carbón activado, o convertir el residuo en compost.

Existen una gran variedad de investigaciones que demuestran que a partir de extractos obtenidos de la semilla de aguacate, estos presentan actividad antimicrobiana al ser probada contra distintos microorganismos patógenos como *E.coli*, *K. pneumonia*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi*, *Candida albicans* (Idris *et al.*, 2009), *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas spp* y *A. niger* (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011).

### **2.5.3 Nuez pecanera (*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch)**

#### **2.5.3.1 Generalidades**

El árbol de donde se obtiene esta nuez llega alcanzar una altura de hasta 30 metros y su edad llega a ser mayor de 100 años. El fruto que se obtiene de esta planta, la nuez pecan, es una drupa seca que tiene una forma oblonga y elipsoidea con un largo de 3-5 cm, tiene una parte comestible (embrión), una cáscara delgada (endocarpio liso) y un epicarpio y mesocarpio los cuales tienen la característica de ser carnosos, estos últimos se abren en la madurez y forman cuatro valvas longitudinales (ruezno) (Frusso, 2007).

Existen un gran número de variedades de cultivos de nuez, según la variedad será el tipo de polinización, es decir, que dentro de la polinización temprana (protandra) se encuentran variedades como Apalache, Caddo,

Cheyenne, Desirable, Lipan, Mandan, Oconee, Osage, Pawnee, Prilop, Waco y Western. Mientras que las pertenecientes al grupo de protógina (flor hembra temprana) se encuentran las variedades Apalache, Elliot, Forket, Hopi, Kanza, Lakota, Nacono, Sioux y Wichita (Lozano, 2013).

### **2.5.3.2 Producción mundial de nuez**

Las áreas de mayor producción de nuez en el mundo se encuentran entre los 25° y 35° de latitud norte y entre 25° y 35° latitud sur, en centros de origen de nuez pecanera siendo extensiones nativas las cuales se emplean para producción comercial. Los principales países productores de nuez son Estados Unidos con el 72% de la producción mundial, México con el 25%, existiendo otros pequeños productores como Australia, Sudáfrica, Israel, Brasil, Argentina, Perú y Egipto (Ojeda-Barrios *et al.*, 2009).

### **2.5.3.3 Producción en México de nuez**

Según el SIAP (2017) se estima que en México entre los estados con mayor producción de nuez se encuentran en primer lugar Chihuahua, después Sonora, Coahuila y Durango. Se considera que entre 2007 y 2016 el promedio de producción de nuez en el país fue de 106 miles de toneladas, el 60% de esta producción nacional se exporta principalmente a Estados Unidos, Vietnam y Hong Kong.

### **2.5.3.4 Usos de nuez**

**Alimento:** Su comercialización se hace principalmente en algunas presentaciones con cáscara o sin cáscara, en mitades, pedacería, polvo de nuez. Se suelen consumir frescas o se procesar para elaborar dulces, botanas, pasteles, nieves, pasteles, repostería, entre otros (Lozano 2013).

**Obtención de aceite de nuez:** Se usa desde la antigüedad como antiparásita intestinal. Actualmente se emplea como aderezo en alimentos (COFUPRO, 2003). El consumo regular de nuez puede mejorar el perfil lípido sérico y el estado antioxidante. Se considera que el aceite de nuez pecanera proporcione los beneficios para la salud que posee el consumo de nuez, debido a su contenido de

ácidos grasos poliinsaturados, fitoesteroles, tocoferoles y otros micronutrientes (Domínguez-Avila *et al.*, 2015).

**Subproductos obtenidos de la nuez:** Durante el procesamiento de la nuez, se obtiene como residuo el pericarpio de la misma y el cual por un costo bajo puede ser empleado como precursor del carbón para llevar a cabo la adsorción de metales pesados y colorantes de soluciones acuosas (Hérendez-Montoya *et al.*, 2011). De esta misma cáscara de la nuez se ha determinado su actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. aureus*, *B. cereus*, *V. parahaemolyticus* (Phinerio *et al.*, 2014), *Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa* (Caxambú *et al.*, 2016).

#### 2.5.3.5 Usos de ruezno

Actualmente existen pocos reportes de investigación con este subproductos, dentro de las que se pueden encontrar es su evaluación como antioxidante y antimicrobiano presentando buenos resultados contra bacterias Gram positivo como *B. aureus*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermis* (Férendez-Argulló *et al.*, 2013) así como el trabajo de Mendez *et al.* (2012) donde al probar diferentes extractos de plantas, entre ellos el de ruezno, este presentó la menor inhibición contra los microorganismos probados que fueron *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, *E. aerogenes*.

### 2.5.4 Café (*Coffea* sp.)

#### 2.5.4.1 Generalidades

Se llama café o cafeto a un género de árboles que pertenecen a la familia de las rubiáceas, sus semillas y la bebida que se puede preparar con ellas. El arbusto mide entre 4 y 6 metros de altura, posee una floración de color blanca, después de seis o siete meses de dicha floración aparece el fruto el cual cambia de color verde a rojo. Es por esto último que se le dice cereza, uva o capulín (SAGARPA, 2017b).

Dentro de las especies que más se cultivan para producción comercial se tiene *Coffea arabica* (Arábica) y *Coffea canephora var. Robusta* (Robusta). Actualmente de la producción mundial de café el 70% es de Arábica debido a que se considera superior al Robusta (Panusa *et al.*, 2013).

La mayoría de las variedades de Arábica en el mundo son genéticamente similares, sin embargo, difieren en su morfología y frutos poseen distinta calidad. En México los principales cultivares son de Typica, Bourbon, Caturra Rojo, Mundo Novo, Garnica y Caturra Amarillo (López-García *et al.*, 2016).

#### **2.5.4.2 Producción mundial de café**

Según SAGARPA (2017a) durante el período de 2007 a 2017 los países con mayor producción de café a nivel mundial son Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y Etiopía.

#### **2.5.4.3 Producción en México de café**

En México se producen ambas variedades, tanto la denominada Arábica (97%) y el tipo Robusta (3%). México tiene una producción de café proveniente de 13 estados cafetaleros, entre los que se encuentran como principales productores Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca, debido a que a partir de ellos se obtiene más del 80% de la producción total del país. Por lo tanto México ocupa el noveno lugar en producción de café a nivel mundial. En cuanto a la producción de café orgánico México ocupa el segundo lugar (SAGARPA, 2015).

#### **2.5.4.4 Usos del café**

Se estima que la bebida de café es la segunda más popular después del agua, debido a que se tiene un consumo de cerca de dos billones de tazas por día, además de que se consume en casi todos los países y por todos los estratos sociales mediante diferentes formas de preparación (Gaascht *et al.*, 2015).

En México se estima que el consumo de café per cápita es de 1.7 kilogramos, para 2014 el consumo creció a una tasa anual del 2.3%. Este

incremento en el consumo de café a resultado como consecuencia de que los consumidores cuentan con mayores conocimientos sobre las propiedades y beneficios del café (SAGARPA, 2015)

Mussato *et al.* (2011) expone que la industria del café instantáneo ha experimentado en los últimos años un crecimiento, por lo tanto, se ha tenido como consecuencia la generación de muchos residuos de granos de café, los cuales se obtienen durante el proceso de mezcla del polvo de café con agua caliente o con vapor para poder preparar café, de estos residuos se han generado mundialmente cerca de 6,000,000 toneladas/año. Aun cuando se conoce que son ricos en componentes que son de importancia industrial tal como los carbohidratos, compuesto fenólicos y proteínas.

De la elaboración de bebidas comercialmente conocidas como espresso o café soluble, el residuo café que se obtienen no se considera que tenga algún valor comercial y simplemente se elimina como residuo sólido, en algunos casos se ha empleado como fertilizante o simplemente es quemado (Panusa *et al.*, 2013), es por esto que en esta investigación se le pretende sugerir un uso o darle un valor agregado a este y los tres residuos anteriores ya mencionados.

#### **2.5.4.5 Usos de los residuos de café**

En recientes estudios los residuos de café han mostrado tener actividad antitumoral y antialérgica, esto debido a que tales residuos contienen compuestos fenólicos, como el ácido clorogénico, se ha reportado que este ácido presenta un gran número de beneficios para la salud debido a su gran actividad antioxidante así como actividad hepatoprotectiva, hipoglucémica, antiviral, antiinflamatoria, antibacterial y anticarcinógena (Mussato *et al.*, 2011a).

Existen evidencias de investigación de que estos residuos pueden o no tener actividad antimicrobiana, tal como lo reporta Monente *et al.* (2015) presentando una inhibición contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Candida*

*albicans*. A diferencia de los encontrado por Sant'Anna *et al.* (2016). Otra prueba realizada con éxito con residuos de café fue probar su actividad antimicrobiana en textiles presentando inhibición contra *S. aureus* (Kho y Hwa, 2017).

De igual manera Mussatto *et al.* (2011b) exponen que los residuos de café pueden ser una buena fuente para la obtención de azúcares.

Entre otras aplicaciones a considerar para los residuos sólidos obtenidos del café se encuentran la producción de biocombustibles como etanol y biodiesel, emplearlo como sustrato para los cultivos de hongos para la fermentación en estado sólido, para la adsorción ya sea de colorantes o metales pesados. Una de las propuestas poco exploradas es el obtener compuestos funcionales de gran interés para la industria alimentaria y farmacéutica a partir de los residuos sólidos del café (Panusa *et al.*, 2013).

Dentro de los componentes bioactivos de las plantas, también se encuentran los antioxidantes y antimicrobianos.

## **2.6 Radicales libres y actividad antioxidante en plantas**

### **2.6.1 Radicales libres**

#### **2.6.1.1 Generalidades**

Como lo indican Avello y Suwalsky (2006) los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón libre o desapareado, lo que los hace ser muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de otras moléculas estables para alcanzar su estabilidad electroquímica.

Una vez que el radical libre obtiene el electrón que necesitaba, ahora la molécula que se lo cedió se convierte en un radical libre debido a que queda con un electrón desapareado, lo cual hace que comience una reacción en cadena lo cual destruye las células. El RL tiene una vida media de microsegundos, el problema es que tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que le rodea, lo cual termina ocasionando un daño a las moléculas, membranas celulares y tejidos.

El oxígeno es un elemento esencial para la vida, sin embargo, es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de manera correcta pueden tener efectos sobre la función celular. Se dice que existe “estrés oxidativo” cuando se da una exposición excesiva a oxidantes y/o existe una baja capacidad antioxidante. Es decir, que todos los seres vivos que emplea oxígeno para liberar energía están generando RL. Algunas de las fuentes de generación de RL son las mitocondrias, peroxisomas y la enzima xantina deshidronasa que está presente en los endotelios (Mayor-Oxilia, 2010) conociéndose a estas como fuentes endógenas, mientras que las fuentes exógenas son aquellas que favorecen la formación de RL como son la exposición a rayos X, al ozono, tabaco, contaminantes del aire, productos químicos industriales y medicamentos. Se ha llegado a clasificar a los RL en relación al grupo funcional que tienen presente en su molécula; como bromo, nitrógeno, tioles, fósforo, oxígeno, cloro, entre otros. Aunque como se mencionó anteriormente los RL de oxígeno reactivo son los más comunes e importantes por su participación en procesos aeróbicos (Corrales y Muñoz, 2012).

El proceso que realizan los radicales libres debe ser controlado con una protección antioxidante.

#### **2.6.1.2 Problemas de salud que generan**

El problema de salud que ocasionan los radicales libres se presenta cuando el organismo tiene que soportar durante años el exceso de tales radicales libres, los cuales se producen principalmente por contaminantes externos tales como la contaminación atmosférica y el humo de cigarrillos. Otras razones por las cuales aumentan las cantidades de radicales libres es el consumo de aceites vegetales hidrogenados como la margarina, el consumo de grasas ácidos grasos trans como el de la carne y de la leche (Avello y Suwalsky, 2006). Dentro de las enfermedades donde los RL como los antioxidantes juegan un muy importante son

las enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca congestiva, cáncer, entre otros (Dabrowska y Moya, 2009).

## **2.6.2 Antioxidantes**

### **2.6.2.1 Generalidades**

Las reacciones de oxidación son esenciales durante los procesos celulares, generando RL. Esto es incompatible con la vida, por lo cual existen mecanismos de defensa los cuales tienen por objetivo neutralizar a los RL. A estas defensas se les llama antioxidantes y son cualquier sustancia que en concentraciones normales tiene una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL. La forma de actuar de los antioxidantes es que estos al impactarse con el RL, le ceden un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil y no tóxico. Sin embargo no todos los antioxidantes actúan de la misma manera, los enzimáticos actúan catalizando reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL (Mayor-Oxilia, 2010).

Los antioxidantes son moléculas pequeñas endógenas y exógenas, estos últimos son lo que se obtienen mediante la dieta e incluyen a los carotenoides, vitamina E y C. La vitamina E se puede obtener de la ingesta de aceites vegetales, aceites de semillas, maní, carnes, germen de trigo, pescado y algunas frutas y verduras. Mientras que la vitamina C se encuentra presente en frutas y verduras, de igual manera los carotenoides se obtienen de frutas y verduras sólo que estas deben de ser de color amarillo, naranja, verde oscuro, lo cual indica la presencia de carotenoides debido a que son compuestos coloreados como los betacarotenos. Incluso se ha descubierto recientemente que en ciertos alimentos existen ciertos antioxidantes que no son nutrientes, los compuestos fenólicos, entre las fuentes de estos compuestos se tiene cítricos (flavonoides), frijoles (isoflavonas), cebolla (quercetina), aceitunas (polifenoles), de igual manera se han encontrado antioxidantes fenólicos en el té, vino y café (Avello y Suwalsky, 2006).

Es así que existen dos tipos de antioxidantes los naturales y los sintéticos. Con respecto a los primeros son aquellos que se encuentran en diferentes cantidades en frutas, hojas, flores, raíces, granos y semillas, estos han estado ganando un lugar prometedor para ser empleados en lugar de los antioxidantes sintéticos, esto se ha estado presentado debido a que en todo el mundo existe la tendencia de ingerir alimentos con aditivos naturales, y se presume que como los antioxidantes naturales son menos perjudiciales debido a su origen pues esto incrementa su demanda en el mercado. Existen algunos extractos de plantas de los cuales se ha demostrado su poder antioxidante como son el romero, salvia, té, ajo, uvas, manzana, clavo, orégano, entre otros. Sin embargo, existe un mayor interés en la investigación de las propiedades de otros antioxidantes naturales como la vitamina E, vitamina C, carotenoides, ácidos fenólicos, extractos de especias y flavonoides (Valenzuela *et al.*, 2003).

Con respecto a los antioxidantes sintéticos estos son muy empleados en la industria alimentaria debido a que disminuyen los fenómenos de oxidación y por lo tanto la aparición de olores y sabores no deseados o incluso la pérdida de vitaminas o aminoácidos en el producto final. Es así que se emplean antioxidantes sintéticos como butil-hidroxi-aisol o E-320 (BHA), butil-hidroxi-tolueno o E-321 (BHT), galato de propilo (PG) y la terbutil-hidroquinona (TBHQ), entre muchos otros. Sin embargo el uso de los antioxidantes sintéticos se limita a ciertas cantidades y presentan inconvenientes ya que son volátiles y se descomponen con facilidad a altas temperaturas. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria existe una gran controversia con el uso de estos antioxidantes ya que se ha comprobado su efecto tóxico, como promotores de cáncer y/o teratógenos, lo cual ha ocasionado su prohibición en muchos países. Es por esto que se ha incrementado el uso de antioxidantes de origen natural ya sea como compuestos puros, extractos y/o aceites esenciales (Armenteros *et al.*, 2012).

### **2.6.2.2 Usos de los antioxidantes**

La FAO establece que el mexicano promedio carece de una dieta equilibrada y variada (Martínez y Villezca, 2005). Es por esto que actualmente en

el país se tiene gran demanda de aquellos productos que beneficien a la salud como los alimentos que contienen antioxidantes, debido a que se ha recomendado que para mantener una buena salud es recomendable incrementar las defensas antioxidantes y el ejercicio físico. Se ha demostrado que durante la actividad física se generan radicales libres y ácido láctico, por lo cual se ha llegado a considerar que el consumo de antioxidantes en la dieta podría ser insuficiente cuando se realice ejercicio excesivo o un sobre entrenamiento por lo que de forma responsable podrían consumirse antioxidantes dietarios (Coronado *et al*, 2015).

Por otro lado se tiene a los antioxidantes que se adicionan a los alimentos con el objetivo de evitar que se hagan rancios. Deben ser inocuos para la salud humana, sin embargo la mayoría de los antioxidantes que se emplean actualmente existen investigaciones que establecen que generan consecuencias adversas a la salud (Bueno, 2002).

A parte de la industria alimentaria, los antioxidantes también se emplean en la cosmética, aceites, polímeros, y cualquier sustancia susceptible a la oxidación mediante radicales libres (Montoya *et al.*, 2003).

## **2.7 Antimicrobianos**

### **2.7.1 Sustancias con actividad antimicrobiana procedentes de plantas**

Las plantas pueden llegar a producir hasta 100,000 productos naturales de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. Esta diversidad se ha dado debido por una parte a procesos evolutivos con el objetivo de que las plantas obtengan una mejor defensa contra el ataque ocasionado por microorganismos, insectos y otros animales. Estas sustancias se pueden dividir en dos grupos fitoanticipinas que están presentes de forma constitutiva en las plantas, y las fitoalexinas las cuales aumentan por respuesta de la planta cuando existe una invasión microbiana. Sin embargo no existe una diferencia bien definida entre las fitoanticipina y las fitoalexinas, ya que en unas plantas los compuestos pueden ser fitoalexinas y en otras fitoanticipinas. A manera de

definición las fitoalexinas y fitoanticipinas es la actividad antimicrobiana *in vivo* de estos compuestos (Domingo y López-Brea, 2003).

De las plantas se han logrado aislar cerca de 12,000 compuestos y un gran número de ellos poseen actividad antimicrobiana, la razón de ser de esto no se conoce por completo, por un lado se cree que estos compuestos podrían tener distintas funciones y de forma accidental presentan el poder antimicrobiano o si su objetivo inicial es proporcionar protección contra microorganismos. Se ha demostrado que los principales grupos que se producen en las plantas y poseen actividad antimicrobiana son los fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas, alcaloides, terpenos (Domingo y López-Brea, 2003; Compean e Ynalvez, 2014).

La bioactividad de las plantas se debe principalmente a la presencia de los metabolitos secundarios (extractos vegetales), los cuales son de interés en el control de plagas y enfermedades de plantas de importancia económica.

## **2.8 Metabolitos secundarios (MS) en plantas**

### **2.8.1 Generalidades**

Las plantas sintetizan un gran número de compuestos llamados metabolitos secundarios (MS), los cuales a diferencia de los productos del metabolismo primario, los MS difieren entre especies y esto ha reflejado su evolución y las relaciones interespecíficas. Se llaman metabolitos secundarios ya que no todas las plantas los poseen, además de que no son esenciales para el funcionamiento de la planta (Vilela *et al.*, 2011).

### **2.8.2 Función de los MS en las plantas**

Según Sepúlveda *et al.* (2003) los MS son compuestos de bajo peso molecular que no sólo tienen importancia en relación a la adaptación de las plantas a su ambiente, estableciendo una simbiosis con otros organismos y atrayendo insectos que polinizan y dispersan semillas y frutos, sino que son de

importancia también debido a la síntesis activa de metabolitos secundarios cuando las plantas se encuentran frente a condiciones adversas como:

- a) Ataques por microorganismos como virus, bacterias y hongos
- b) Consumo por herbívoros tanto artrópodos como vertebrados
- c) Competencia por el espacio de suelo, luz y nutrientes entre distintas especies de plantas
- d) Exposición a luz solar y otros tipos de estrés abiótico que se puedan presentar

Actualmente se conocen cerca de 20,000 estructuras de metabolitos secundarios. Se sabe que a un microorganismo patógeno o insectos y vertebrados herbívoros, se les dificulta lograr infectar o alimentarse de plantas que contienen una mezcla de diferentes metabolitos secundarios a diferencia de aquellas que tienen una mezcla homogénea de metabolitos secundarios.

### **2.8.3 Síntesis en plantas de MS**

La biosíntesis de metabolitos secundarios es a partir de precursores de rutas del metabolismo primario como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. Existen metabolitos secundarios que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que su almacenamiento se realiza en órganos y tejidos diferentes que en los que se llevó a cabo su síntesis, esto se da debido a su redistribución por medio del xilema y/o floema, o mediante el espacio apoplástico. Sin embargo, la síntesis de estos metabolitos secundarios va a depender de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles se incrementan como respuesta al estrés ya sea abiótico o biótico. Este aumento que se realiza en los niveles de metabolitos secundarios resulta de gran importancia para la supervivencia de la planta (Sepúlveda *et al.*, 2003).

### **2.8.4 Clasificación de MS**

Según Pérez-Alonso y Jiménez (2011), los compuestos secundarios de plantas de interés comercial se clasifican en relación con las vías de su biosíntesis en tres grupos:

- Terpenos
- Compuestos fenólicos
- Compuestos nitrogenados

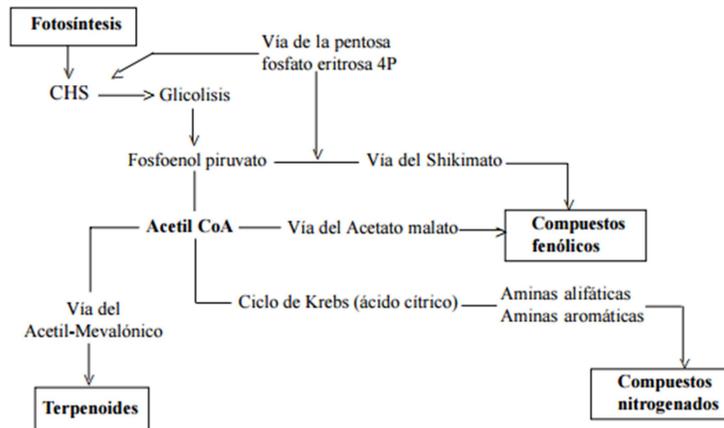


Figura 1. Vías de síntesis de los metabolitos secundarios principales. Obtenido de García (2004)

#### 2.8.4.1 Terpenos

Los terpenos o también conocidos como terpenoides, son el grupo de metabolitos secundarios más numeroso con más de 40, 000 moléculas distintas. Estos metabolitos son importantes para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y se derivan de la unión de unidades de isopreno, es decir cinco átomos de carbono. Es por esto que los terpenos se clasifican según el número de isoprenos (5C) que contienen:

- Monoterpenos. Aquellos terpenos que poseen 10 carbonos, contienen dos unidades de 5C.
- Sesquiterpenos. Poseen 15C, es decir tres unidades de isopreno.
- Diterpenos. Tienen 20C, por lo tanto cuatro unidades de 5C.
- Triterpenos. Se denominan a los que tienen 30C.
- Tetraterpenos. Tienen 40C.
- Politerpenos. Poseen más de ocho unidades de isopreno.

Los terpenos incluyen las hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (xantofilas y carotenos), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), así como derivados de esteroides (glicósidos cardiacos), latex y aceites esenciales (responsables del sabor y olor de las plantas).

La mayoría de los terpenoides se comercializan para ser empleados como aromas y fragancias en cosmética y alimentos, o por su importancia para la calidad de los productos agrícolas. Por otro lado otros terpenoides tienen importancia medicinal debido a que poseen propiedades antiulcerosas, anticariogénicas, antimalarías, antimicrobianas, etc (Ávalos y Pérez-Urria, 2009)

#### **2.8.4.2 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos también son llamados polifenoles o fenilpropanoides reciben tales nombres debido a que derivan del fenol, el cual es un anillo aromático con un grupo hidroxilo (OH).

Se considera que según el número de grupos hidroxilo y su posición en el anillo se encuentra directamente vinculado con la toxicidad de la planta frente a microorganismos, es decir, se presenta una alta toxicidad cuando la hidroxilación es elevada. De igual manera en este grupo se deben destacar los aceites esenciales los cuales proporcionan el olor característicos a determinadas plantas y pueden tener poder antimicrobiano. Estos compuestos fenólicos son un grupo muy variado que van desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. Dentro de este grupo también se encuentran los flavonoides. Entre los compuestos fenólicos tenemos a las cumarinas de la familia de las lactonas, se han identificado más de 1500 diferentes en más de 800 especies de plantas desempeñando una función de antimicrobianas e inhiben la germinación.

Otros compuestos fenólicos son los que se obtienen del ácido benzoico como la vainillina y el ácido salicílico los cuales desempeñan un papel de defensa de las plantas (Domingo, 2017).

Por otra parte se encuentran los flavonoides, son de bajo peso molecular, están constituidos por 15 átomos de carbono, en configuración de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. De forma esencial la estructura de los flavonoides es a partir de dos anillos aromáticos A y B, unidos por un puente de tres carbonos, usualmente en forma de anillo heterocíclico C (Figura 2). El anillo aromático A se deriva de la ruta del acetato-malonato, mientras que el anillo B se deriva ruta del ácido shikimico. Las distintas variaciones de los sustituyentes en el anillo C dan como resultado distintas clases de flavonoides (Balasundram *et al.*, 2006) dentro de los más importantes están las antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas, su objetivo es defender a la planta (Domingo, 2017).

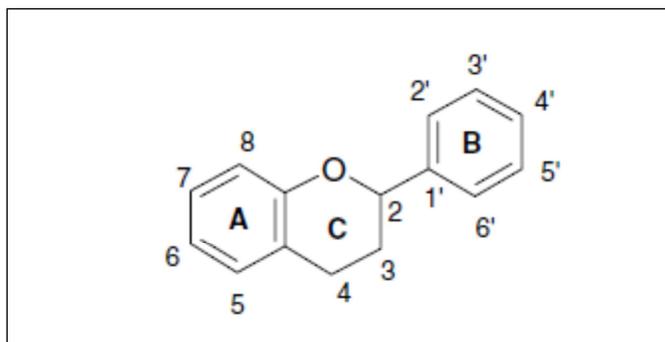


Figura 2. Estructura genérica de un flavonoide. Obtenido de Balasundram *et al.* (2006)

Por último los taninos tienen una estructura polimérica y se clasifican en dos grupos: taninos condensados y taninos hidrolizables (Ávalos y Pérez-Urria, 2009), esta clasificación se realiza en función de que los taninos puedan ser hidrolizables o no. Existen más de 30 taninos los cuales se sabe que pueden inhibir bacterias y hongos (Domingo, 2017).

Balasundram *et al.* (2006), refieren que los polifenoles poseen actividad antioxidante debido a que poseen la habilidad deshacerse de los radicales libres, esto se logra debido a que los compuesto fenólicos donan átomos

de hidrógeno o electrones o quelatos de cationes metálicos. Esta actividad antioxidante está determinada por la estructura del compuesto fenólico.

Sin embargo de acuerdo con Muñoz y Ramos (2007), los compuesto fenólicos no sólo poseen actividad antioxidante, poseen otros mecanismos preventivos tales como:

- Disminuyen colesterol
- Anti diabéticos
- Anti hormonal
- Anti inflamatorio
- Antitrombótico
- Antitumoral
- Antimutagénico
- Antibacteriano
- Antiviral
- Antifúngico
- Anticarcinogénicas (Dueñas *et al.*, 2009)

**Residuos de alimentos y agroindustriales como fuente de polifenoles.** En relación a los residuos agro industriales, se tiene que los compuestos fenólicos se encuentran presentes en casi todas las clases de residuos tanto de alimentos como de origen agroindustrial, tal como las frutas, vegetales, semillas oleaginosas, nueces, bebidas y cereales. La mayor parte de los residuos antes mencionados se obtienen a partir de la industria y de los hogares. Hasta el momento los polifenoles se han identificado en un gran número de productos alimentarios y agrícolas tales como el arroz (*Oryza sativa*), cacahuate (*Archis hypogaea*), avellana (*Corylus avellana*), café (*Coffea arabica*), entre muchos otros como se muestra en la siguiente tabla (Balasundram *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Reporte de contenido de polifenoles en residuos. Obtenido de Kupussamy *et al.*, 2015

| Muestra de residuo                                   | Residuo                  | Fenoles totales   |
|--|--------------------------|---|
| <b>(A) Residuos de alimentos y agro-industriales</b> |                          |   |
| 1. Frutas  |                          |   |
| Cáscara de manzana<br>( <i>Malus sp.</i> )           | Cáscara                  | 3.7-33.7 <sup>a</sup> ; 5.2-9.7 <sup>b</sup> 5.2 <sup>a</sup> |
| Fresa ( <i>Fragaria sp.</i> )                        | Pulpa                    | 7.8-17.1 <sup>a</sup>   |
| Pera ( <i>Pyrus sp.</i> )                            | Pulpa                    | 1.0-11.4 <sup>a</sup>   |
| Piña ( <i>Ananas comosus</i> )                       | Pulpa, semilla y cáscara | 9.1-21.7 <sup>a</sup>   |
| Fruta de la pasión<br>( <i>Passiflora alata</i> )    | Pulpa, semilla y cáscara | 41.2 <sup>a</sup>   |
| Granada( <i>Punica granatum</i> )                    | Cáscara                  | 249.4 <sup>a</sup>  |
| Uva ( <i>Vitis vinífera</i> )                        | Piel y semillas          | 0.4-9.4 <sup>a</sup>  |
|  | Pulpa                    | 48.2-54.0 <sup>a</sup>  |
|  | Semillas                 | 103.3-111 <sup>a</sup>  |
|  | Piel                     | 9.7-36.3 <sup>a</sup>   |
| Dátil ( <i>Phoenix dactylifera</i> )                 | Semilla                  | 0.2-0.4 <sup>b</sup> ; 35.4 <sup>a</sup>                      |
| Naranja ( <i>Citrus cinensis</i> )                   | Pulpa                    | 9-35 <sup>a</sup>   |
| Aguacate ( <i>Persea americana</i> )                 | Cáscara y semilla        | 4.3-88.2 <sup>a</sup>   |
| Plátano ( <i>Musa acuminata</i> )                    | Cáscara                  | 0.01-3.3 <sup>a</sup>   |
| Mango ( <i>Mangifera indica</i> )                    | Semilla                  | 1.8-117 <sup>a</sup>  |
| Tamarindo ( <i>Tamarindus indica</i> )               | Semilla                  | 94.5 <sup>a</sup>   |
| Acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> )              | Pulpa y cáscara          | 94.6 <sup>a</sup>   |
| Fruta estrella ( <i>Averrhoa carambola</i> )         | Pulpa                    | 32.2 <sup>a</sup>   |

|   |                 |                        |
|---|-----------------|------------------------|
| Rambután ( <i>Nephelium lappaceum</i> )                   | Cáscara         | 762 <sup>a</sup>       |
| Membrillo ( <i>Cydonia oblonga</i> )                      | Piel y semilla  | 0.3–7.1 <sup>a</sup>   |
| Longan ( <i>Dimocarpus longan</i> )                       | Semilla         | 0.2 <sup>a</sup>       |
| 2. Vegetales  |                 |                        |
| Remolacha roja ( <i>Beta vulgaris</i> )                   | Pulpa           | 0.4–20.1 <sup>a</sup>  |
| Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )                    | Piel            | 10.6–39.9 <sup>a</sup> |
| Espárrago ( <i>Asparagus officinalis</i> )                | Piel y tallo    | 4.2–50.1 <sup>a</sup>  |
| Achicoria ( <i>Cichorium intybus</i> )                    | Tallo           | 2.3–33.5 <sup>a</sup>  |
| Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )                            | Bagazo          | 3.3–4.1 <sup>b</sup>   |
|   | Piel            | 37.2 <sup>a</sup>      |
| Brócoli ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> ) | Tallo           | 4.94 <sup>a</sup>      |
| Coliflor ( <i>Brassica oleracea</i> )                     | Trozos cortados | 3.4–4 <sup>a</sup>     |
| Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )                         | Piel            | 9.7.7 <sup>a</sup>     |
| 3. Nueces   |                 |                        |
| Nuez ( <i>Juglans regia</i> )                             | Cáscara         | 31.6–33.7 <sup>a</sup> |
| Avellana ( <i>Corylus avellana</i> )                      | Cáscara         | 56.6–72.2 <sup>a</sup> |
| 4. Bebidas  |                 |                        |
| Café ( <i>Coffea</i> sp.)                                 | Residuo         | 1.4–17.5 <sup>a</sup>  |
| 5. Semillas oleaginosas                                   |                 |                        |
| Cacahuete ( <i>Arachis hypogaea</i> )                     | Cáscara         | 27.6 <sup>a</sup>      |
| 6. Cereales   |                 |                        |

|   |                              |                        |
|---|------------------------------|------------------------|
| Arroz ( <i>Oryza sativa</i> )   | Vaina                        | 1.2–2.2 <sup>a</sup>   |
| <b>(B) Residuos forestales y de árboles</b>   |                              |                        |
| Olivo ( <i>Olea europaea</i> )  | Hojas                        | 40.2 <sup>a</sup>      |
|   | Residuos de podas de árboles | 0.02–0.02 <sup>a</sup> |
| Algarroba ( <i>Ceratonia siliqua</i> )  |                              | 13.8 <sup>a</sup>      |
| Tarap ( <i>Artocarpus odoratissimus</i> )   | Semilla                      | 14.7 <sup>a</sup>      |
| Eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> )  | Corteza                      | 0.1–0.2 <sup>a</sup>   |
| Roble ( <i>Quercus sp.</i> )  | Bellotas                     | 0.2 <sup>a</sup>       |
|   | Corteza                      | 23.7–55.0 <sup>a</sup> |
| Nuez ( <i>Carya illinoensis</i> )   | Vaina                        | 86.4–925 <sup>a</sup>  |
| <sup>a</sup> mg de ácido gálico equivalente a g <sup>-1</sup> de extracto seco<br><sup>b</sup> mg de catequina equivalente a g <sup>-1</sup> de extracto seco |                              |                        |

De acuerdo con el Cuadro 1 la variación en la concentración total de polifenoles es muy variada entre los residuos de alimentos y los agroindustriales, estas variaciones se presentan debido a factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos se refieren a diferencias en el género, especies, cultivos u órganos, en relación a los factores extrínsecos se pueden encontrar variaciones ambientales, agronómicas, así como su manipulación y prácticas de almacenamiento (Kuppusamy *et al.*, 2015).

**Residuos agroforestales como fuente de polifenoles** Resulta de gran importancia mencionar que no se ha explorado mucho el contenido de polifenoles en residuos verdes, forestales y de jardinería. Las concentraciones de polifenoles de residuos secos obtenidos de actividades de cultivo y de cosecha provenientes de árboles continúan la mayor de ellas desconocidas. Esto último resulta de gran importancia debido a que es necesario conocer si los compuesto fenólicos se

encuentran presentes en residuos forestales así como en residuos agroindustriales y si el hecho de seguir realizando análisis en este tipo de residuos tendrá una finalidad práctica (Kuppusamy *et al.*, 2015).

#### **2.8.4.3 Compuestos nitrogenados**

Son aquellos metabolitos que como su nombre lo indica poseen nitrógeno en su estructura. Algunos como los alcaloides y glicósidos cianogénicos resultan tóxicos para el ser humano. Mientras que los glucosinolatos y aminoácidos no proteicos generan sustancias que en este caso resultan tóxicas para insectos y microorganismos (Llenera, 2011).

#### **2.8.5 Importancia económica de los metabolitos secundarios**

Actualmente existe una gran demanda de productos naturales de interés farmacéutico principalmente proveniente de las plantas, esto se ha incrementado debido a la limitación de los procesos de obtención de medicamentos por síntesis química ya que mundialmente existen un 44% de nuevos medicamento que se basan en sustancias naturales. Es tan grande la importancia de los MS que cerca del 60% de compuestos anticancerígenos y el 75% de los medicamentos contra enfermedades infecciosas son de origen natural o derivado de ellos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Según Vilela *et al.* (2011), a distintos MS se les ha dado un uso en la industria

- Alcaloides, cuyo objetivo principal es para la prevención y tratamiento de enfermedades, incluso su venta legal reporta anualmente 4,000 millones de dólares anuales al ser empleados como antidepresivos, analgésicos, antitusivos, antihipertensivos, relajantes musculares y afrodisiacos.
- Polifenoles, su uso se da principalmente como antioxidantes debido a que su consumo en la dieta disminuye el riesgo de padecer enfermedades crónicas, produciendo alimentos con elevada capacidad antioxidante. De igual manera se les da usos a los polifenoles como antioxidante para almacenamiento de caucho sintético y natural.

- Terpenoides, se emplean principalmente en la industria de las pinturas y la perfumería, en este último caso principalmente como aceites esenciales.

Durante décadas un gran número de productos naturales fueron sustituidos por derivados sintéticos del petróleo, un claro ejemplo, los insecticidas sintéticos reemplazaron al aceite de citronella después de la Segunda Guerra Mundial, los antioxidantes naturales fueron reemplazados por antioxidantes sintéticos. Actualmente la era del petróleo se acerca a su fin y así el desafío de reemplazar todos los productos sintéticos de los cuales ahora la industria depende y comenzar a sustituirlos por productos naturales (Vilela *et al.*, 2011).

### **2.8.6 Métodos para aislar MS**

La extracción es el primer paso importante en el análisis de los metabolitos secundarios de las plantas, esto es debido a que es necesario extraer los componentes químicos deseados para futuras separaciones y caracterizaciones (Sasidharan *et al.*, 2011). Dentro de los objetivos de toda extracción se encuentra: la extracción de los compuestos bioactivos de interés; incrementar la selectividad de métodos analíticos; hacer una buena extracción del compuesto para lograr su detección y separación; lograr un método reproducible. Existen distintos tipos de técnicas de extracción unas que comúnmente son llamadas como convencionales y otras que son nuevas técnicas desarrolladas, las primeras son aquellas donde se emplean solventes orgánicos (hexano, acetona, metanol, etanol, etc.) o agua y se realizan normalmente a presión atmosférica mientras que las técnicas nuevas emplean elevadas temperaturas y/o presiones. Dentro de las técnicas convencionales se encuentran la decocción, infusión, Soxhlet, maceración, hidrodestilación. Y dentro de las nuevas técnicas se pueden encontrar extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas y extracción con fluidos supercríticos (Ngaha *et al.*, 2017).

Para esta investigación se emplea la maceración que es un método de extracción sólido-líquido donde los compuestos bioactivos del material vegetal deben ser afines al solvente empleado para la extracción. Normalmente el

material vegetal se corta, se muele y puede ser en fresco o seco, se añade el o los solventes y se deja reposar por determinado tiempo en reposo o agitación (Verde-Star *et al.*, 2016).

Una vez que se obtienen los extractos de las plantas estos están constituidos por combinaciones de diferentes tipos de compuestos bioactivos con distintas polaridades, por esto existen distintas técnicas para el aislamiento de estos compuestos como Cromatografía en capa fina (TLC), Cromatografía de columna, Cromatografía flash, Cromatografía Sephadex y Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Ngaha *et al.*, 2017).

### **2.8.7 Usos y aplicaciones de metabolitos secundarios**

Como lo expresan Ávalos y Pérez-Urria (2009) los metabolitos secundarios también se denominan productos naturales debido a su importante valor tanto medicinal como económico, este valor económico se debe al uso que se les da en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Gran parte de estos productos naturales se empleaban en la medicina antigua como remedios para enfermedades, en la actualidad se utilizan como medicamentos, gomas, resinas, potenciador de sabores, colorantes, aromas, etc.

Otra forma de emplear los metabolitos secundarios de las plantas es como sustitutos de los plaguicidas sintéticos (Pérez, 2012). Ya que los metabolitos secundarios pueden tener actividad insecticida, nematocida, viricida, fungicida, bactericida y herbicida (Alonso, 1999).

#### **2.8.7.1 Plaguicidas botánicos**

El concepto de plaga es considerado como artificial, debido que en la naturaleza ningún organismo es una plaga en sí mismo, incluso si algunos son más dañinos que otros, en realidad ninguno es malo. La palabra plaga está referida a cuando un microorganismo, planta o animal incrementa tanto su densidad que termina afectando al ser humano, ya sea en su salud, comodidad y principalmente cuando representa una pérdida económica (Brechelt, 2004).

Los productos químicos sintéticos con efecto plaguicida se han estado empleando debido a que actualmente las principales causas de pérdida de productividad en agroecosistemas se debe a:

- Plagas
- Enfermedades
  - Hongos
  - Virus
  - Bacterias (Ferrar-Cerrato y Alarcón, 2010)

El empleo de plantas para el control de plagas y enfermedades llega a ser tan antiguo como las plantas domésticas. Estos productos de origen botánico se han dejado de usar durante las últimas cinco décadas debido a las tecnologías que surgieron con la revolución verde (Rivera *et al.*, 2003).

Actualmente se aplican principalmente plaguicidas sintéticos, a pesar de las consecuencias que conlleva su empleo como son envenenamiento en agricultores y consumidores de alimentos que se encuentran contaminados, destrucción de hábitats naturales, así como la contaminación agua y la resistencia de plagas a tales productos. Estas sustancias químicas son ampliamente usadas debido a que existe poca divulgación respecto a la aplicación y funcionalidad de los plaguicidas botánicos (Barrera-Necha, *et al.*, 2008; Pérez, 2012).

Ante el nuevo reto del consumo de productos inocuos, el uso de sustancias naturales (biocontrol) para el control de plagas y enfermedades ha recobrado interés en los últimos años y se considera que se debe promover el uso de plaguicidas botánicos debido a que son económicos, se obtienen y degradan fácilmente, porque su agresividad es menor que la de los plaguicidas sintéticos (Rivera *et al.*, 2003), tiene un origen biológico, presentan menor impacto negativo en la salud humana y el medio ambiente (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2008), no afectan la viabilidad de la semilla, la mayoría no inhiben la germinación ni afectan cualidades alimenticias de los granos y presentan baja o nula toxicidad para mamíferos (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2010).

Debido al uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos y las consecuencias que están generando, ha incrementado la necesidad de productos capaces de controlar plagas y/o enfermedades que afectan la agricultura, pero con un menor grado de afectación a la salud humana y al medio ambiente, los plaguicidas botánicos (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2008). Para lo cual en las últimas dos décadas se han estado reportando metabolitos secundarios de plantas los cuales han presentado actividad semejante a la de los plaguicidas sintéticos por lo cual pueden ser un sustituto para tales productos químicos (Pérez, 2012).

El control biológico de enfermedades de plantas es una de las principales razones para desarrollar distintos tipos de investigaciones. Es por esto que una gran cantidad de extractos vegetales han sido evaluados contra distintos hongos y bacterias, encontrándose en algunos de ellos actividad antimicrobiana, lo cual resulta prometedor. Por lo anterior surge la necesidad de emplear productos elaborados a partir de plantas tratando de evitar la dependencia actual que se tiene a los productos químicos sintéticos (Celis *et al.*, 2008).

Dentro de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales se encuentran los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999).

Dentro de los trabajos de biocontrol contra enfermedades de plantas se encuentran los siguientes.

## **2.9 Características de fitopatógenos en estudio**

### **2.9.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Smith**

Hasta 1983 se le conocía como *Corynebacterium michiganensis*, pero actualmente se clasifica como *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. Es una bacteria Gram positivo, no móvil, aeróbica, productor de cápsula y en agar nutritivo se presenta como colonias de color

amarillo a naranja, con textura mucosa y su temperatura óptima de crecimiento in vitro es de entre 25 y 28 °C (Borboa *et al.*, 2009).

El cancro bacteriano es causado por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*) la cual es una enfermedad que afecta el cultivo y producción de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Borboa *et al.*, 2009). Por lo tanto, esta bacteria se encuentra distribuida en todas las zonas donde existe el cultivo de jitomate, reportándose epidemias en Israel, Japón, España y México, generando pérdidas de 80 a 100%. Es por eso que el cancro es una enfermedad cuarentenaria que puede llegar a tener un impacto económico internacional en cuanto a las pérdidas generadas por tal enfermedad. *Cmm* puede sobrevivir en restos de suelo o de planta infectada hasta por lapsos de 2 a 3 años lo cual incrementa la problemática sobre su control. Las pérdidas en la producción de jitomate pueden llegar a ser de entre 80 a 100% (Frías-Pizano *et al.*, 2016).

Una vez que las plantas están enfermas pueden sobrevivir hasta la cosecha y en el fruto pueden llegar a aparecer manchas de tamaño pequeño las cuales se rodean de un halo claro, comúnmente se les conoce como “ojo de pájaro o de pavo”. Esta enfermedad genera pérdidas económicas como se mencionó anteriormente debido a que mata a plantas jóvenes y esto reduce la producción comercial, es decir, las pérdidas pueden ser directamente con la pérdida de la planta completa o con la obtención de producto de menor tamaño y cantidad (Borboa *et al.*, 2009).

En México es de suma importancia el control de *Cmm* debido a que el jitomate es uno de los principales productos agroalimentarios exportados durante el 2016, siendo los estados de Sinaloa, San Luis Potosí y Michoacán los principales productores dentro del país (SIAP, 2017).

### **2.9.2 *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson**

*Xanthomonas vesicatoria* (*Xv*) es una bacteria aeróbica, móvil, Gram negativo, en agar nutritivo son colonias largas amarillas y mucoides. La enfermedad que genera esta bacteria se le conoce comúnmente como mancha

bacteriana y sus principales hospederos son los cultivos de tomate y de chile (EPPO, 1995).

Los síntomas de la enfermedad se presentan inicialmente como manchas circulares cafés llegando a infectar toda la planta, el problema radica en que alrededor de dichas lesiones pueden crecer otros hongos o bacterias lo cual finalmente termina por disminuir su valor comercial (Arcos *et al.*, 2013).

Esta enfermedad se presenta anualmente en las regiones hortícolas del mundo donde se cultiva tomate y chile, teniendo como consecuencia pérdidas importantes en su producción y por lo tanto económicas. Es una de las enfermedades de mayor importancia que se presentan en lugares con climas tropicales y subtropicales (Carrillo-Fasio *et al.*, 2001).

Siendo el cultivo del chile al igual que el del jitomate uno de los más importantes económicamente hablando para México, debido a que en cuanto a producción de chile es el país que ocupa el segundo lugar de producción a nivel mundial, después de China. Siendo Chihuahua, Sinaloa y Zacatecas los estados con mayor producción de chile en el país (SIAP, 2017).

Para el control de la mancha bacteriana comúnmente se recomienda la aplicación de productos químicos comerciales como bactericidas a base de cobre, o en mezcla con mancozeb o estreptomina; sin embargo su control no ha sido del todo satisfactorio (Carrillo-Fasio *et al.*, 2001). Razones por las cuales en esta investigación se desea determinar si se pueden proponer extractos vegetales con características antimicrobianas como alternativa en lugar de los productos químicos sintéticos.

### **2.9.3 *Phytophthora capsici* Leonian**

Es un oomiceto *Phytophthora capsici* el causante de la pudrición foliar, de raíces, así como del fruto en distintos vegetales. Se pensó en un inicio que tenía como único hospedero el cultivo de chile, sin embargo, poco después se

observó su presencia en jitomate y curcubitáceas (melón, calabaza, entre otros) (Lamour *et al.*, 2012).

Su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra entre 25 y 28 °C, su forma de reproducción puede ser de dos tipos una asexual, la cual conlleva la formación de clamidosporas y esporangios y la otra la sexual, la cual se realiza mediante la formación de oosporas (Hausbeck y Lamour, 2004).

Con respecto al chile (*Capsicum annum L.*) se presenta la enfermedad que genera marchitez del chile y que es ocasionada por *P. capsici* y la cual ha ocasionado pérdidas entre 60-100% de este cultivo en México. Esto ha traído como consecuencia que se disminuya superficies de siembra o se ha llevado la producción a otras zonas agrícolas (Rico-Guerrero *et al.*, 2004).

Con respecto al cultivo de jitomate, *P. capsici* ocasiona pudrición de raíz de cuello en las plantas, generando pérdidas tanto en la calidad como en la cantidad de producción de este cultivo en México. Este tipo de enfermedades es comúnmente tratado empleando control químico, sin embargo, su uso discriminado ha generado grandes problemas tanto ambientales como de salud pública, lo cual sólo ha generado una mayor incidencia de enfermedades en cultivos.

Es de suma importancia buscar nuevas alternativas para el control de la enfermedad generada por este hongo fitopatógeno debido a que sigue encontrando nuevos hospederos en México, tanto así que en año reciente se ha identificado su presencia en el cultivo de chayote (*Sechium edule*) en el estado de Veracruz (Andrade-Luna *et al.*, 2017).

#### **2.9.4 *Nalanthamala vermoesonii* (Biourge) Schroers**

Es un hongo que ocasiona la enfermedad conocida como raíz rosa (pink rot), afectando principalmente a palmas débiles o estresadas, logrando atacar todas las partes de las palmas, impidiendo principalmente que emerjan nuevas hojas e incluso llegando a lograr la pudrición del tronco de las palmas.

Cuando se encuentra presente la enfermedad se logra ver la masa de esporas color salmón, es por esto que recibe su nombre. Anteriormente se le conocía a este hongo como *Penicillium vermoeseni* o *Glicodium vermoseni* (Mohamed *et al.*, 2016).

Sus colonias son de entre 38-55 milímetros de diámetro, formándose una especie de polvo en la superficie de las colonias de color salmón o rosa. *Nalanthamala vermoeseni* ha sido identificada principalmente en las costas de Norte América, en California, también reportando su presencia en Florida y Hawai. Otros países con presencia de éste hongo fitopatógeno a parte de Estados Unidos, se encuentran Australia, China, Cuba, República Checa, Italia, Jamaica, Japón, Malasia, Madagascar, Nueva Zelanda, Nicaragua, Polonia, Países Bajos, Egipto (Li *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2016).

Existen pocas investigaciones respecto a este hongo y con que pueda lograrse su inhibición, es por eso que se emplea para este trabajo de investigación.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los residuos verdes se producen en altos volúmenes a nivel mundial y nacional. Diversos problemas de contaminación y daño a la salud se encuentran relacionados con estos residuos, debido a la falta de tratamiento y lugares para su disposición final. Se ha reportado que estos residuos son una fuente importante de metabolitos secundarios, de los cuales se ha comprobado diversas propiedades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, entre otros).

Por otro lado los cultivos agrícolas se ven afectados por diversos hongos y bacterias fitopatógenos que causan grandes pérdidas en los mismos, para los cuales comúnmente se utilizan plaguicidas sintéticos que representan riesgos para el ser humano (consumidor/aplicador), daños al medio ambiente y ocasiona la generación de plagas más resistentes. Incluso a pesar del uso de estas sustancias siguen presentándose pérdidas de hasta el 40% de las cosechas.

Por lo tanto al utilizar extractos vegetales a partir de cuatro residuos verdes sin utilidad aparente, como antioxidantes y/o como antimicrobianos, puede ser una alternativa para darles un valor agregado a los residuos.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo General

Determinar actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos obtenidos a partir de semilla de aguacate (*Persea americana*), residuos de café (*Coffea* sp.), residuos de hojas de orégano (*Lippia* sp.) y residuos de ruezno de nuez pecan (*Carya illinoensis*) a través de ensayos *in vitro* con la finalidad de sugerir un uso alternativo para tales residuos.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener residuos y extractos tanto acuosos como hidroalcohólicos de semilla de aguacate (*Persea americana*), residuos de café (*Coffea* sp.),

residuos de hojas de orégano (*Lippia* sp.) y residuos de ruezno de nuez pecanera (*Carya illinoensis*)

- Evaluar rendimiento en sólidos (% w/w)
- Evaluar concentración de fenoles y flavonoides
- Evaluar efecto antioxidante *in vitro*
- Evaluar efecto antimicrobiano en determinadas bacterias y hongos *in vitro*
- Identificar los compuestos químicos mayoritarios en los extractos

## V. HIPÓTESIS

Los residuos de *Lippia* sp., *Persea americana*, *Carya illinoensis* y *Coffea* sp. poseen efecto antioxidante y antimicrobiano *in vitro* por lo que tienen un uso alternativo viable.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de residuos

El material vegetal empleado para esta investigación se obtuvo de distintas fuentes. Los residuos de orégano (*Lippia* sp.) fueron proporcionados por la planta productora de aceite esencial de orégano Cooperativa Oro Verde, ubicada en Cuencamé, Durango. La semilla de aguacate (*Persea americana* Mill.) se adquirió como un residuo general comprado en supermercados de la ciudad de Durango. El ruezno de *Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch se obtuvo de la Nogalera Exhacienda La Purísima, ubicada en Praxedis Guerrero, km 13 carretera Durango-Mezquital. Los residuos de café (*Coffea* sp.) se recolectaron dentro del consumo que se genera dentro del Instituto Politécnico Nacional en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad

Durango (IPN-CIIDIR Unidad Durango), considerándose como residuos generales de igual manera que los de semilla de aguacate.

## **6.2 Obtención de extractos hidroalcohólicos (etanólicos) y acuosos.**

Para la obtención de los extractos de los residuos de las cuatro plantas (aguacate, café, orégano y nuez) a experimentar fue a partir del material vegetal secado a temperatura ambiente y triturada en un molino.

**Extractos acuosos.** Se maceraron 100g de residuo vegetal con agua tridestilada, durante un lapso de 24 horas en oscuridad en agitación. Después se filtraron los extractos al vacío con papel filtro, al material vegetal sobrante se le realiza un lavado extra de igual manera con agua y se filtró de nuevo. El extracto obtenido se concentró a presión reducida hasta llevarlo a sequedad en un rotavapor, todo lo anterior todo lo anterior se llevó acabo en el IPN-CIIDIR Unidad Durango. Por último los extractos acuosos obtenidos de los cuatro diferentes residuos (aguacate, café, orégano, nuez) fueron liofilizados en un equipo marca VirTis, esto se realizó en el Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición, perteneciente a la Facultad de Medicina y Nutrición de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), específicamente en el laboratorio de inocuidad alimentaria a cargo del Dr. Abelardo Camacho Luis. Una vez liofilizados los extractos, se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta ser usados.

**Extractos etanólicos.** De igual manera se maceraron 100 g de material vegetal de los cuatro residuos (aguacate, café, orégano, nuez) con una mezcla de etanol: agua (70: 30 v/v) durante 24 horas en agitación y oscuridad. Después se filtraron y el residuo sólido recibió un lavado extra con una mezcla del mismo solvente (etanol 70%) y se filtró. Los extractos obtenidos de los cuatro distintos residuos se concentraron a presión reducida hasta llevarlos a sequedad, lo anterior se realizó en el IPN-CIIDIR Unidad Durango. Para finalizar los extractos etanólicos obtenidos se liofilizaron de los cuatro diferentes residuos (aguacate, café, orégano, nuez) fueron liofilizados en un equipo marca VirTis, esto se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición, perteneciente a la Facultad de Medicina y

Nutrición de la UJED, específicamente en el laboratorio de inocuidad alimentaria a cargo del Dr. Abelardo Camacho Luis. Una vez liofilizados los extractos, se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta ser usados.

### **6.3 Evaluación rendimiento en sólidos (% w/w).**

A partir de los extractos obtenidos después del filtrado se realizó la determinación de sólidos donde se emplearon vasos de precipitado de 80 mL para realizar la evaluación, con cuatro repeticiones para cada muestra, llevando los vasos a peso constante en estufa a 100 °C durante cuatro horas. Obteniendo los pesos de cada vaso. A continuación se colocaron 5 mL de cada muestra en los vasos de precipitado y de igual manera se llevaron a peso constante. Se pesaron los vasos para realizar los cálculos correspondientes.

El cálculo de rendimiento de sólidos, se considera como la cantidad total de sólidos que se obtienen en la extracción en relación con la cantidad de material vegetal que se utiliza en cada una de las extracciones que se realizaron (Rosales y González, 2003).

Es decir:

$$\% \text{ Rendimiento en sólidos} = \frac{\text{gramos de extracto obtenido}}{\text{gramos totales de material vegetal seco}} * 100$$

### **6.4 Evaluación de concentración de fenoles totales**

Técnica basada en la descrita por Waterman y Mole (1994), donde se establece que se debe realizar una curva de calibración de ácido gálico a cinco concentraciones distintas de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm (Anexo 1). Para la preparación de las muestras se colocaron 50 µL de extracto a las distintas concentraciones, 3 mL de agua deionizada y 250 µL de reactivo Folín-Ciocalteu (2N). Después de un lapso de tiempo entre 1 min y antes de 8 min de haber adicionado el reactivo Folín se adicionaron 0.750 µL de carbonato de sodio al 20%. Para luego aforarse a 10 mL y se mantiene en reposo durante un periodo de 2 horas. Por último se leyó absorbancia a 760 nm, los resultados obtenidos se expresaron como equivalentes de ácido gálico en mg g<sup>-1</sup> de extracto seco.

Esta técnica se empleó para determinar los fenoles totales tanto de los extractos acuosos como etanólicos obtenidos de los cuatro residuos empleados para esta investigación, las muestras se analizaron cuatro veces.

## 6.5 Evaluación de flavonoides totales

Para esta evaluación se siguió la metodología descrita por Heimler *et al.* (2009), donde se emplearon 0.25 mL de muestra diluida tanto de los extractos acuosos como etanólicos obtenidos de los cuatro residuos, es decir ocho extractos en total, 75  $\mu$ L de solución de Nitrito de Sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) al 5%, 0.150 mL solución recién preparada de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y 0.5 mL de solución de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 1M. Después el volumen se ajustó a 2.5 mL empleando agua deionizada. La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos para luego medir la absorbancia a 510 nm, preparando un blanco de igual manera pero sin muestra. Se realizó una curva con catequina, empleándose como solución estándar, a cinco concentraciones distintas de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm, la cantidad total de flavonoides se expresaron como equivalentes de catequina por gramos de extracto seco. De las distintas concentraciones se hicieron cuatro repeticiones para cada una.

## 6.6 Evaluación efecto antioxidante *in vitro*

### 6.6.1 Radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3- etilbenzotiazolin-6 sulfónico)

Técnica basada en la descrita por Re *et al.* (1999), mediante la cual se establece la siguiente metodología. Las determinaciones se realizaron por triplicado, el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  se obtuvo tras realizar una reacción de ABTS con persulfato de potasio (2.45Mm, concentración final) la cual se incubó a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad durante 16h y después se aforó con agua a 10 mL. De esta solución se tomó 1 mL y se diluyó con etanol hasta que se obtuvo un valor de absorbancia  $0.700 \pm 0.100$  a 754 nm.

Para preparar las muestras se emplearon 50  $\mu$ L de muestra a concentraciones distintas (200, 400, 600 y 1000 ppm) y 1950  $\mu$ L del radical, se agitaron vigorosamente y se dejaron en oscuridad por un lapso de 30 minutos para luego

leerse a 754 nm (Am) y del control que fue etanol absoluto (Ac). A partir de las distintas concentraciones se hicieron dos repeticiones de cada una.

Se realizó una curva de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico) disuelto en etanol a distintas concentraciones partiendo de las 100 hasta 1000 ppm, realizando el mismo procedimiento que para muestras, de igual manera como blanco se utilizó etanol absoluto. Los resultados se expresaron como TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox). De igual manera los resultados se expresan en  $CE_{50}$  la cual se obtiene al graficar los resultados obtenidos de las distintas concentraciones de muestra, obtener la ecuación de la recta, sustituir en  $y'$  el valor de 50, despejar  $x'$  y finalmente obtener el dato de la  $CE_{50}$ .

### **6.6.2 Radical DPPH (ácido 2,2'-azinobis-3- etilbenzotiazolin-6 sulfónico)**

La capacidad que poseen los extractos como atrapadores de radicales libres fue determinada utilizando DPPH el cual tiene la característica de tener un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por resonancia. Debido a esto el DPPH se emplea para ser tomado como referencia en la determinación del poder antioxidante que tenga una sustancia para capturar radicales libres (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Técnica basada según la de Brand-Williams y Berset (1995). La determinación se realizó por triplicado, preparando una mezcla de 50  $\mu$ L a cinco diferentes concentraciones de extracto (200, 400, 600 y 1000 ppm) y 1950  $\mu$ L de DPPH se agitaron vigorosamente y se dejaron incubar a temperatura ambiente en oscuridad por un lapso de 30 min. El control se prepara sin extracto y metanol en su lugar. Se midió la absorbancia a 515 nm, realizando una comparación entre las muestras y el control. Las pruebas con las muestras a distintas concentraciones se realizaron por duplicado. La capacidad antioxidante se calculó en porcentaje de inhibición del radical DPPH empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición de DPPH} = \frac{(A_{515}\text{Control} - A_{515}\text{Muestra})}{A_{515}\text{Control}} \times 100$$

De igual manera los resultados de esta técnica se expresan en  $CE_{50}$ , calculándose a partir de la ecuación de la recta obtenida al graficar los resultados antes calculados y expresados en porcentaje de inhibición.

## 6.7 Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos vegetales de RV

La actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI) de Salinas *et al.* (2009) con algunas modificaciones.

### 6.7.1 Actividad antibacterial

Las cepas de las bacterias *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* Smith y *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson fueron proporcionadas por el Dr. Sergio Aranda, perteneciente al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Las cuales se mantuvieron en refrigeración una vez sembradas en agar nutritivo debido a que llegaron en material criogénico.

A continuación se preparó una suspensión en caldo infusión cerebro corazón (BHI), colocando una colonia del microorganismo en el caso de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm) y dos colonias en el caso de *Xanthomonas vesicatoria* (Xv), se incubaron a una temperatura aproximada de  $27 \pm 1$  °C durante 18 y 20 horas respectivamente, hasta que el caldo presentó turbidez debido al crecimiento bacteriano. Posteriormente se realizaron diluciones empleando solución reguladora de fosfatos (SRF) en agar nutritivo con el objetivo de poder determinar las unidades formadoras de colonia por mililitro que se colocaron en las pruebas con los extractos a tres concentraciones distintas de 500, 1000 y 2000 ppm. Empleándose una concentración de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL de las cuales se aplicaron 0.001 mL con un asa calibrada, los cuales se colocaron durante las pruebas en un círculo de 5 a 8 milímetros de diámetro en agar nutritivo solidificado preparado con las diferentes concentraciones de los

extractos tanto acuosos como etanólicos. A continuación las cajas Petri se incubaron durante 72 horas a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la concentración mínima de extracto vegetal obtenido de los cuatro residuos (aguacate, café, orégano, nuez) y que produjo una completa inhibición del crecimiento de colonias bacterianas de los microorganismos probados, es decir, la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se utilizó como control positivo un producto químico bactericida comercial Cuprimicin<sub>100</sub>, para cada residuo. Todo se realizó por triplicado.

### 6.7.2 Actividad antifúngica

Las siguientes cepas fueron proporcionadas por la Dra. Reyna Rojas perteneciente al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo: *Phytophthora capsici* Leonian y *Nalanthalama vermoesonii* (Biourge) Schroers. Una vez llegadas las cepas se procedió a su resiembra en agar papa dextrosa, así como a la identificación del tiempo en que tardaba cada hongo en madurar (formación de esporangio) y así liberar sus esporas para poder llevar acabo la siguiente técnica.

De los inóculos de cada especie se realizaron diluciones mediante el raspado del micelio de hongo maduro con siete días de crecimiento y se colocaron en caldo de agua peptonada tamponada (APT) y solución reguladora de fosfatos (SRF) para poder determinar a qué dilución se logró una concentración aproximada de  $10^6$  esporas/mL, empleándose finalmente APT debido a que en SRF no se obtuvo el crecimiento deseado de los hongos. El inóculo a esa concentración fue colocado sobre agar papa dextrosa acidificado (PDA) solidificado junto con los extractos probados a distintas concentraciones, dicho inóculo se colocó con un asa calibrada de 0.001mL en un círculo de 5 a 8 milímetros de. A continuación las cajas Petri fueron incubadas a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El crecimiento se revisó a los cinco días de incubación, los resultados se realizaron por triplicado y fueron expresados en CMI. En este caso como control positivo se empleó un fungicida químico comercial, Captán<sub>50</sub>. De igual manera se hizo por triplicado.

## 6.8 Análisis estadístico

Se realizaron distintos diseños experimentales. El primero sería de  $4 \times 2 \times 1 \times 2 \times 1$ , es decir, cuatro residuos (aguacate, café, orégano y nuez); dos solventes (agua y etanol al 70%), el rendimiento, dos cálculos uno de fenoles totales y otro de flavonoides y por último la prueba de los extractos contra el radical ABTS en relación al estándar comercial Trolox, empleando cuatro repeticiones de todas las pruebas incluidas en este diseño.

El segundo diseño es de  $4 \times 2 \times 4 \times 2$ , los mismos cuatro residuos de planta de aguacate, café, orégano y nuez, dos solventes (agua y etanol 70%), cuatro concentraciones 200, 400, 600 y 1000 ppm y el empleo de dos radicales (ABTS Y DPPH) para determinar la actividad antioxidante, todo por duplicado para cada concentración.

Finalmente el diseño experimental de  $4 \times 2 \times 4 \times 3$ , cuatro residuos de plantas (aguacate, café, orégano y nuez); dos solventes (agua y etanol al 70%), cuatro microorganismos fitopatógenos *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Phytophthora capsici* y *Nalanthalamo vermoesenii*) y por último tres concentraciones distintas de 500, 1000 y 2000 ppm, todo por triplicado.

Los valores experimentales obtenidos se expresan en medias más menos la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando el paquete estadístico STATISTICA 7. Las diferencias con respecto a  $p < 0.05$  se consideraron como significantes. De igual manera se realizó un análisis de Tukey para una comparación múltiple de medias con un intervalo de confianza del 95% para determinar la diferencia significativa entre grupos.

## 6.9 Identificación de compuestos químicos mayoritarios en los extractos

El análisis de los compuestos fenólicos se realizó por UPLC-MS (cromatografía líquida de ultra-rendimiento) acoplado a espectroscopía de masas). Se utilizó un cromatógrafo 3000 (UPLC) Dionex corp., con arreglo de diodos, acoplado a un sistema Bruker MicrOTOF-QII.

Para la separación cromatográfica, se utilizó una columna Polaris C<sub>18</sub>, con fase móvil 0.1% ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B), con un sistema de gradiente de 10-60% (B) en 0-10 min, 60-90% (B) en 10-15 min, 90-10% (B) en 15-17 min y 10% (B) en 17-19 min. El flujo de 0.3 mL / min, detección a 254 nm.

El análisis de masas se realizó mediante un espectrómetro de masas, empleándose en modo ionización negativo, gas de secado (nitrógeno), velocidad de flujo 6 l/min, temperatura del gas 200 °C, rango de scan de 50-3000 m / z, voltaje 500 V, voltaje del capilar 2700 V, presión del nebulizador 1.0 bar.

La identificación de los compuestos fenólicos se se llevo a cabo en base a los tiempos de retención que se obtuvieron en los cromatogramas, los espectros UV y los datos de MS que se obtuieron de los espectos de masas.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Evaluación rendimiento en sólidos (% w/w).

En el Cuadro 3 se observa el rendimiento de cada extracto mostrando que tanto en extractos etanólicos (etanol 70%) como acuosos, los residuos de aguacate y orégano presentaron un mayor rendimiento. Con respecto tanto a los solventes empleados como a los residuos de donde se obtuvieron los extractos se obtuvo un valor de  $p < 0.05$  por lo que se considera que existe una diferencia significativa para ambas variables. Mientras que el análisis de Tukey con  $\alpha = 0.05$  revela que no existe diferencia significativa entre el rendimiento obtenido del extracto de ruezno y aguacate, pero si existe diferencia entre el orégano y el resto de los rendimientos obtenidos.

Cuadro 2. Rendimiento en sólido de cada extracto en cada planta a experimentar

| Residuo  | Etanólico (%) | Acuoso (%)  |
|----------|---------------|-------------|
| Aguacate | 13.88±0.48a   | 10.46±0.40a |
| Café     | 3.97±0.12b    | 3.77±0.18b  |
| Orégano  | 22.71±0.82d   | 14.60±0.35d |
| Ruezno   | 12.80±1.55a   | 7.47±0.43a  |

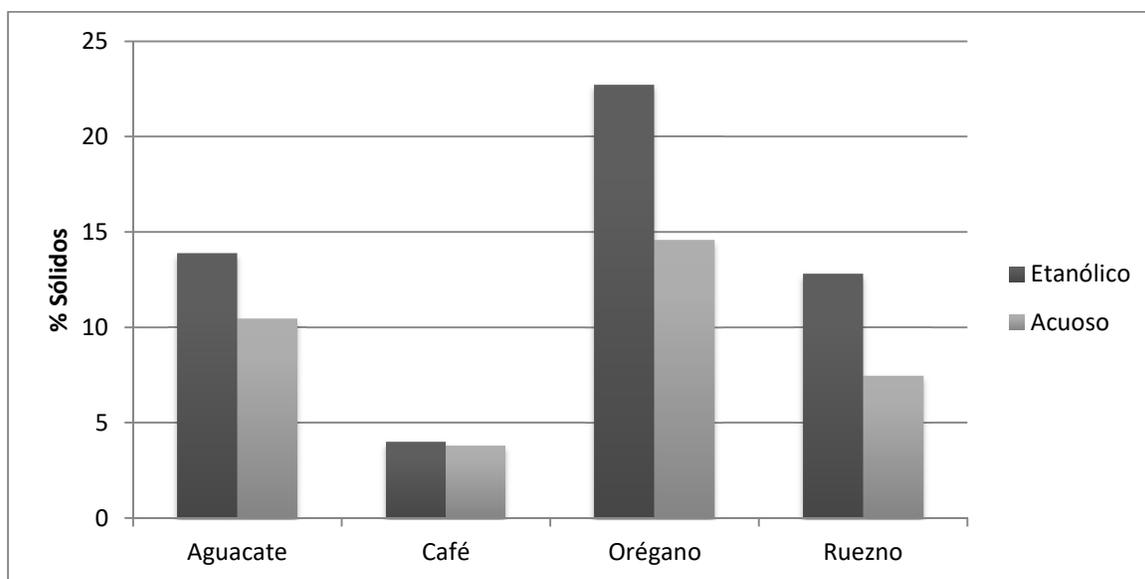


Figura 3. Comparación de rendimiento en sólidos de cada extracto obtenido con los distintos solventes orgánicos

Comparando estos resultados con lo reportado por Calderón-Oliver *et al.* (2016) quien obtuvo que en el extracto acuoso de semilla seca (variedad Hass) de aguacate obtuvo el rendimiento de 13.2%, mayor al obtenido en esta investigación. Mientras que Cruz *et al.* (2014) en una extracción con acetona-agua (80:20 v/v) con polvo de semilla de aguacate variedad Hass obtuvieron un rendimiento de 11%.

Con respecto al residuo de café se obtuvo un rendimiento muy semejante para ambos solventes, con el extracto etanólico 3.97% y con el acuoso 3.67%. Mientras que Ramalakshmi *et al.* (2009) reportan un total de sólidos mayores al de esta investigación al ser de 10.3% para residuos de Arábica y 7.2% para residuos de Robusta.

Los resultados del residuo de orégano difieren de lo mencionado por quienes reportan un mayor rendimiento de extracto acuoso *Lippia graveolens* (35.99%). Aunque los resultados de esta investigación son superiores al compararse con el rendimiento que se genera en la extracción del aceite esencial (*Oreganum vulgare* spp.) como mencionan Acevedo *et al.* (2013) el cual se encuentra entre el 2-6% y a los resultados de rendimiento de extracto acuoso de tallo de orégano (*Lippia graveolens* var. *Berlandieri*) que menciona González *et al.* (2007) al ser de 6.7%.

Por último resultados de ruezno los valores también difieren de los de Fernández-Argulló *et al.* (2013) donde el rendimiento de extractos acuosos y etanólicos a partir de ruezno verde (variedad *Mellanaise*) fue de 44.11% en el extracto acuoso, en el obtenido con EtOH fue de 3.90% y por último un rendimiento de 20.21% para el extracto de EtOH 50%.

Con respecto a los diferentes valores obtenidos por solvente, se observa que los etanólicos fueron los de mayor rendimiento, lo que podría deberse a la polaridad de los metabolitos secundarios.

Con estos resultados se pudo observar que debido a que los metabolitos secundarios poseen distintas estructuras químicas, esto se ve relacionado directamente con su afinidad a los distintos solventes, en este caso presentaron una mayor afinidad los residuos de semilla de aguacate, orégano y ruezno al solvente etanol. En la Figura 2 se aprecia que el residuo de aguacate y orégano tienen mucho que proporcionar al tener una cantidad rescatable de sólidos provenientes de una materia prima que simplemente se deshecha.

## 7.2 Evaluación de concentraciones totales de fenoles y flavonoides.

En el anexo 1, se observa la curva de calibración del ácido gálico usado como patrón de referencia para la determinación de compuestos fenólicos.

En la Figura 4 y 5, se observó que el café, presento la mayor concentración de fenoles totales con extracto acuoso. En los extractos etanólicos, la mayor concentración de fenoles fue para el orégano.

En el análisis estadístico se obtuvo que si existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de fenoles de los distintos extractos en relación a los distintos residuos (aguacate, café, orégano y ruezno) y solventes empleados. De acuerdo con el análisis de Tukey con  $\alpha = 0.05$  no existe diferencia significativa en los resultados de fenoles totales obtenidos en los extractos de aguacate y ruezno; ruezno y café; café y orégano. Sin embargo si existió diferencia significativa entre esos grupos.

En el anexo 2 se observa la curva de calibración de la catequina usado como patrón de referencia para la determinación de flavonoides.

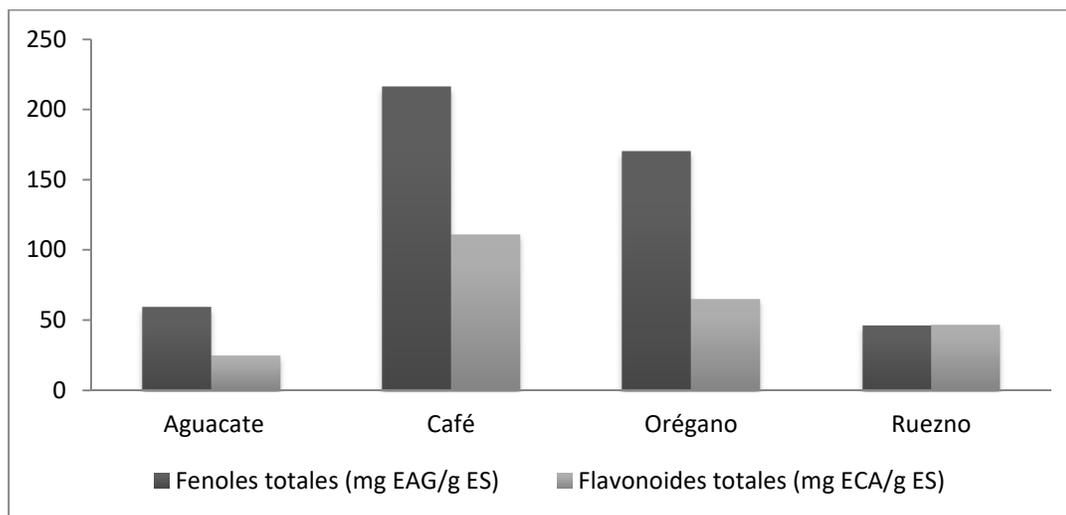


Figura 4. Concentraciones de fenoles totales y flavonoides en los extractos acuosos

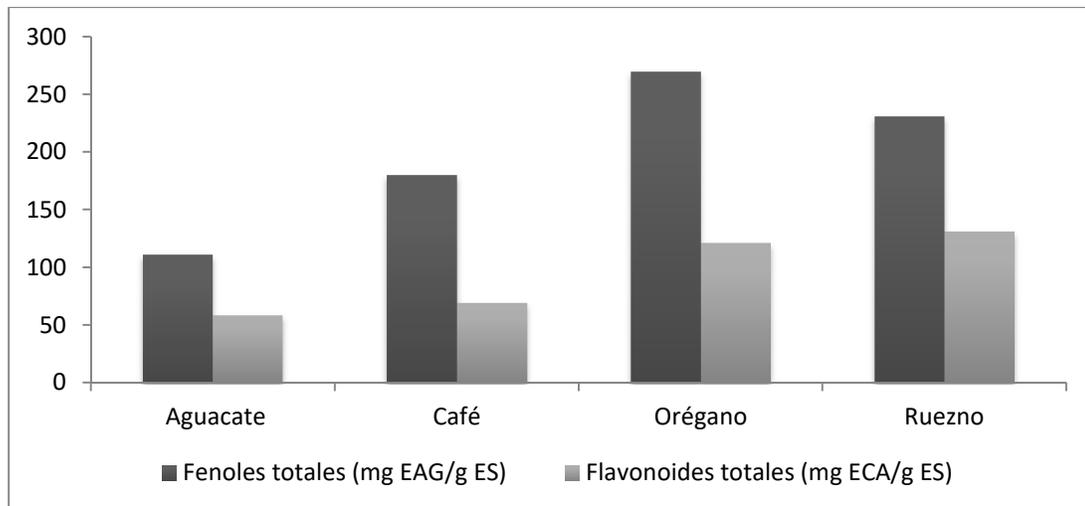


Figura 5. Concentraciones de fenoles totales y flavonoides en los extractos etanólicos

Para los flavonoides se observó en las Figuras 4 y 5, la mayor concentración en el café para los extractos acuosos y en el caso de los etanólicos la mayor concentración en el ruezno. Caso particular el ruezno, donde el extracto acuoso presenta que prácticamente todos sus fenoles son del tipo flavonoide, sin embargo, al emplear etanol estos compuesto se incrementan.

En los resultados estadísticos al realizar la ANOVA se obtuvo que en relación a la concentración de flavonoides con respecto a los distintos residuos (aguacate, café, orégano y ruezno) y los solventes empleados (agua y etanol) exista una significancia estadística. En el análisis de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) se obtuvo que no existe diferencia significativa en lo obtenido para los extractos de ruezno, café y orégano, pero si existe diferencia significativa entre estos tres extractos al compararse con el aguacate.

Cuadro 3. Valores medios de fenoles totales y flavonoides de cada residuo con su respectivo solvente

| Residuo  | Solvente | Fenoles totales<br>mg EAG/g ES | Flavonoides mg<br>ECA/g ES |
|----------|----------|--------------------------------|----------------------------|
| Aguacate | Agua     | 58.75±25.61a                   | 24.61±0.72a                |
|          | Etanol   | 110.18±32.68a                  | 57.94±2.69 <sup>a</sup>    |
| Café     | Agua     | 216.50±14.62bc                 | 110.93±5.5b                |
|          | Etanol   | 179.29±12.21bc                 | 69.06±1.36b                |
| Orégano  | Agua     | 170±15.23c                     | 64.89±2.12b                |
|          | Etanol   | 268.75±23.41c                  | 121±7.87b                  |
| Ruezno   | Agua     | 46.25±0.68ab                   | 46.56±1.56b                |
|          | Etanol   | 230.71±14.55ab                 | 131±12.58b                 |

Del extracto acuoso de aguacate los valores del Cuadro 4 resultaron elevados en comparación con los reportados por Calderón-Oliver *et al.* (2016) quienes obtuvieron en semillas de aguacate tipo Hass, 5.7 mg EAG/g ES de fenoles totales y 2.8 mg EQER/g ES de flavonoides. Con respecto al extracto etanólico de este mismo residuo los fenoles totales resultan inferiores al ser comparados con lo obtenido por Rodríguez-Carpena *et al.* (2011) quienes proyectan resultados de un extracto metanólico de semilla de aguacate Hass con fenoles totales de 7841 mg EAG/100g ES y de flavonoides 1.7 mg ECA/100g ES, siendo este último inferior comparado al obtenido en esta investigación.

Para los resultados de extracto acuoso de café (Cuadro 4) con respecto al reporte de Panusa *et al.* (2013) con residuos de café rico en Arábica mediante una extracción con agua y de etanol-agua (60:40 %v/v), obteniendo concentraciones inferiores a las de investigación en ambas pruebas tanto para fenoles totales como flavonoides, al ser de 17.43 mg EAG/g ES y de flavonoides 3.31 mg EQER/g ES para el extracto acuoso y de 23.90 mg EAG/g ES de fenoles totales y de 8.03 mg EQER/g ES para flavonoides del extracto etanol-agua.

Los datos obtenidos para los extractos de orégano reportados en el Cuadro 3 con respecto al contenido de fenoles totales resulta ser el extracto de etanol superior al reportado por Martínez-Rocha *et al.* (2008) con un extracto metanólico de orégano obtenido de Guanajuato y con un contenido de fenoles de 211.81 mg EAG/g ES, así como un valor mayor de flavonoides al contenido en el Cuadro 3, al ser el reportado de un valor de 136 mg ECA/g ES.

Por último del extracto de ruezno existen pocos reportes de su análisis, entre ellos se encuentra el de Fernández-Argulló *et al.* (2013) quienes reportan el contenido fenólico de 40.39 mg EAG/g extracto a partir del extracto acuoso de ruezno verde y de un extracto de etanol al 50% obtuvieron un total de fenoles de 84.46 mg EAG/g extracto, datos que resultan inferiores a lo reportado en el Cuadro 3. En relación a los flavonoides De la Rosa *et al.* (2011) reporta el contenido de flavonoides en extracto de acetona al 80% de cáscara de nuez fresca provenientes de tres distintos lugares del estado de Chihuahua, obteniendo un contenido de flavonoides de 26.3, 33.1 y 36.1 mg ECA/g extracto fresco, siendo estos datos inferiores a los observados en el Cuadro 4.

## **7.3 Evaluación de la actividad antioxidante**

### **7.3.1 Radical ABTS**

Para la determinación la actividad antioxidante con respecto al radical ABTS existen dos formas de expresar los resultados, una de ellas es como porcentaje de inhibición. La otra forma es con respecto a un antioxidante de referencia (Kuskoski *et al.*, 2004) en este caso se empleó Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), expresándose los resultados como capacidad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC), para este último se realizó una curva de calibración de Trolox (Anexo 3).

Cuadro 4. Actividad antioxidante de extractos con respecto al radical ABTS expresados en % de inhibición y TEAC

| Residuo  | Inhibición ABTS en % |                   | TEAC ( $\mu\text{M}$ Trolox /g) |                     |
|----------|----------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------|
|          | Acuoso               | Etanólico         | Acuoso                          | Etanólico           |
| Aguacate | 15.7 $\pm$ 1.15a     | 64.82 $\pm$ 4.1a  | 114.86 $\pm$ 11.61a             | 610.93 $\pm$ 41.41a |
| Café     | 88.01 $\pm$ 1.74b    | 65.24 $\pm$ 3.94b | 845.21 $\pm$ 17.55b             | 615.21 $\pm$ 39.77b |
| Orégano  | 75.50 $\pm$ 3.85b    | 98.94 $\pm$ 0.34b | 718.79 $\pm$ 38.89b             | 955.57 $\pm$ 3.4b   |
| Ruezno   | 42.5 $\pm$ 1.99b     | 98.13 $\pm$ 0.14b | 385.58 $\pm$ 20.09b             | 947.36 $\pm$ 1.37b  |

De acuerdo a lo que se observa en el Cuadro 5, se obtuvo mayor inhibición en todos los extractos etanólicos en comparación con los acuosos. Dentro de los extractos acuosos los que presentaron menor actividad antioxidante fueron el aguacate y el ruezno, mientras que los de mayor actividad fueron el café y orégano. En los extractos etanólicos se obtuvieron los valores más altos para orégano y ruezno.

Es importante señalar que en los dos cálculos de capacidad antioxidante en relación al radical ABTS se presentó el mismo patrón en el café, presentando una mayor capacidad antioxidante en el extracto acuoso que en el etanólico, por el contrario el resto de los extractos etanólicos de aguacate, orégano y ruezno presentaron mayor actividad antioxidante con respecto a los acuosos. Esto podría deberse a que los metabolitos secundarios que posee el residuo de café son más afines al agua, mientras que los compuestos que poseen el resto de los residuos son más solubles en etanol.

Todo lo antes mencionado puede ser apreciado en las Figuras 6 y 7, debido a que se obtuvieron resultados semejantes en cuanto a capacidad

antioxidante tanto en los valores expresados en porcentaje de inhibición como en TEAC. Se puede apreciar en tales figuras que conforme se incrementa la concentración del extracto de todos los residuos, de igual manera aumenta su capacidad antioxidante.

El análisis estadístico reportó que para la actividad antioxidante con respecto al radical ABTS si existe diferencia significativa entre los valores de actividad antioxidante con respecto a la planta y al solvente al ser el valor de  $p < 0.05$ . Mientras que el análisis de Tukey con  $\alpha = 0.05$  establece que no existe diferencia significativa entre la inhibición que presentan los extractos de ruezno, café y orégano, sin embargo, si existe diferencia significativa entre estos extractos al ser comparados con el aguacate.

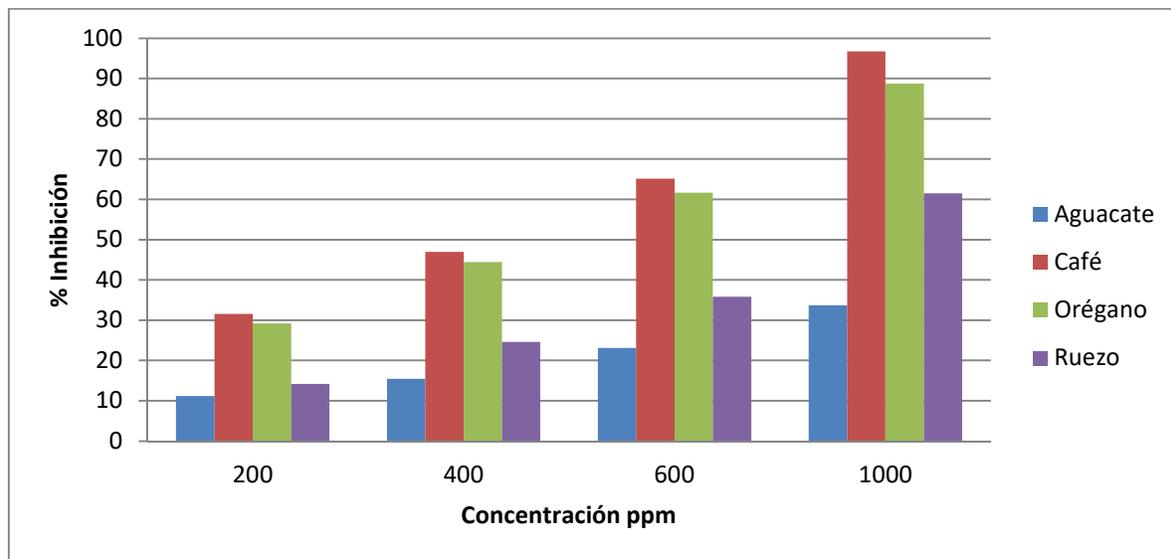


Figura 6. Porcentaje de inhibición de los extractos acuosos

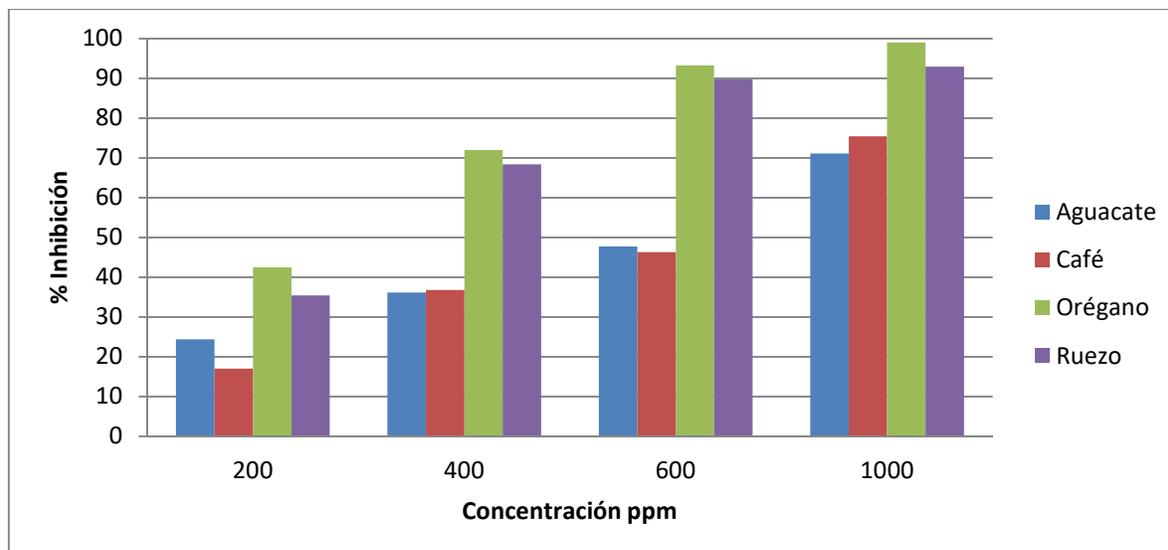


Figura 7. Porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos

Kosińska *et al.* (2012) reporta la actividad antioxidante de extracto de semilla de aguacate tipo Hass con metanol al 80%, siendo su resultado de 0.94 mmol Trolox/g de peso seco, es decir, inferior a lo que se reporta en el Cuadro 5. Mientras que Rodríguez-Carpena *et al.* (2010) reporta la actividad antioxidante de la variedad Hass y Fuerte a partir de metanol obteniendo para la variedad Hass 141.67 mmol Trolox/g materia fresca y para el Fuerte de 184.42 mmol Trolox/g materia fresca, datos muy por encima a lo reportado en el Cuadro 5 para ambos extractos.

En el caso de lo obtenido con los residuos de café se ha reportado por Bravo *et al.* (2012) que la capacidad antioxidante de un extracto acuoso a partir de residuos de café obtenidos de la preparación de café empleando un filtro de cafetera, para los residuos de Arabica obtuvieron 215.12  $\mu\text{mol Trolox/g}$  y para Robusta 167.24  $\mu\text{mol Trolox/g}$  siendo estos últimos menores a los obtenidos en este trabajo (Cuadro 5).

Muñoz *et al.* (2007) reportan para *Origanum vulgare* que presentó una actividad antioxidante de 800 mmol Trolox/kg extracto seco mientras que en el Cuadro 4 se reportan resultados muy semejantes.

Con relación al ruezno no existen datos precisos en relación al radical ABTS, sin embargo si existe el reporte de Pinheiro *et al.* (2014) sobre la actividad antioxidante de la cáscara de nuez de extracto tanto acuoso de 1809.01  $\mu\text{mol Trolox/g}$  como con alcohol 1562.51  $\mu\text{mol Trolox/g}$ , datos muy por encima de los recopilados en el Cuadro 4 para los extractos de ruezno.

### 7.3.2 Radical DPPH

Con respecto a la evaluación de los extractos de aguacate, café, orégano y ruezno contra el radical DPPH, en los extractos acuosos se obtuvo mejor respuesta en los extractos a partir de café y orégano (Figura 7). Mientras que en los extractos etanólicos (Figura 8) se obtuvo mejor respuesta en los extractos de orégano y ruezno, al igual que mayores porcentajes de inhibición en comparación a los acuosos.

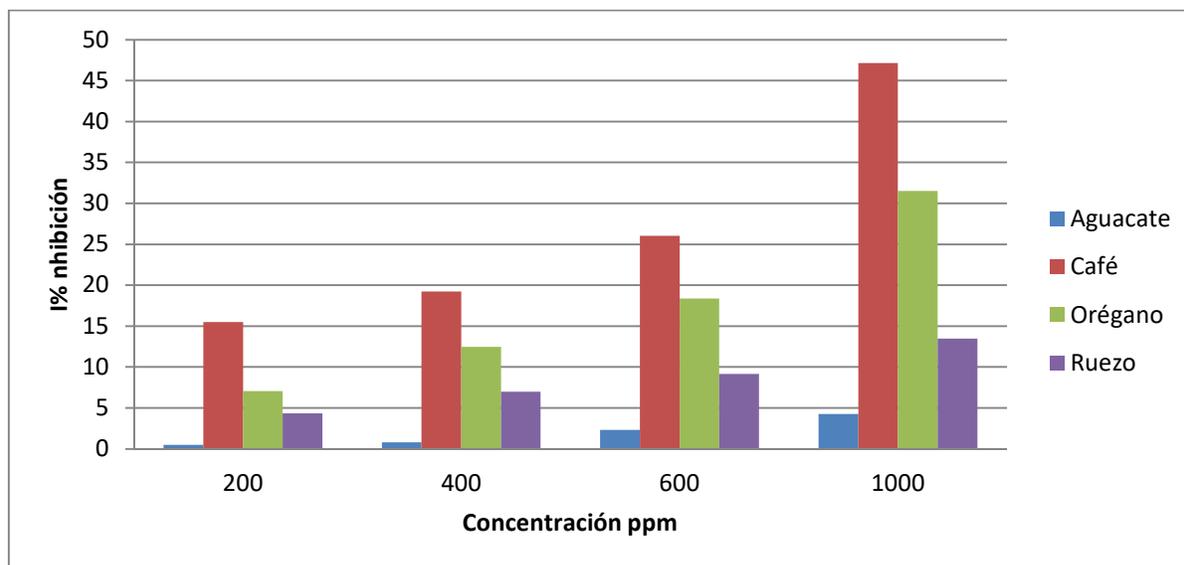


Figura 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH obtenido en los extractos acuosos

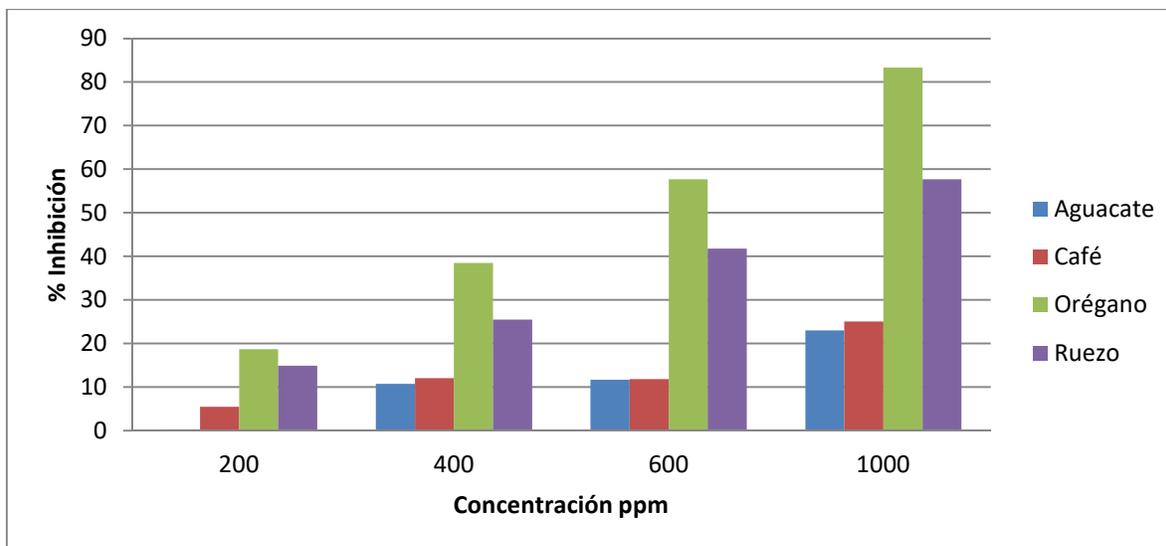


Figura 9. Porcentaje de inhibición del radical DPPH obtenido en los extractos etanólicos

De igual manera se puede apreciar que al igual que en la prueba con el radical ABTS, al incrementar la concentración de extracto aumenta el porcentaje de inhibición del radical.

De forma general el porcentaje de inhibición del radical DPPH por parte del extracto de aguacate, tanto acuoso como etanólico, fue el más bajo. Por otra parte los extractos de orégano presentaron una excelente respuesta. Mientras que el extracto de ruezno etanólico tuvo una mejor actividad antioxidante con respecto a la poca actividad el extracto acuoso, a diferencia de lo sucedido con el extracto de café, que al igual que en la prueba con el radical ABTS se tuvo mayor capacidad antioxidante en el extracto acuoso que con el etanólico.

Con respecto a los resultados estadísticos contra este radical, se obtuvo algo muy semejante a ABTS, es decir se obtuvo  $p < 0.05$  por lo que existe diferencia significativa en los resultados de actividad antioxidante en relación al residuo y el solvente. En el análisis de Tukey con  $\alpha = 0.05$  se obtuvo que no existe diferencia significativa entre ruezno y café, sin embargo, si existe diferencia significativa en los extractos de aguacate y orégano.

Para confirmar la capacidad de cada extracto de atrapar el 50% de los radicales libres ABTS y DPPH, se calculó la concentración efectiva cincuenta ( $CE_{50}$ ) donde se puede observar que los extractos etanólicos presentan mejor respuesta tanto en la evaluación contra el radical ABTS como con DPPH (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad antioxidante de extractos con respecto al radical DPPH expresados en  $CE_{50}$

| Residuo         | Solvente | $CE_{50}$ ABTS<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | $CE_{50}$ DPPH<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----------------|----------|--|--|
| <b>Aguacate</b> | Agua     | 503.17                                 | 6955.73                                |
|                 | Etanol   | 638.19                                 | 2428.03                                |
| <b>Café</b>     | Agua     | 426.45                                 | 1116.72                                |
|                 | Etanol   | 651.95                                 | 2037.99                                |
| <b>Orégano</b>  | Agua     | 591.44                                 | 1614.41                                |
|                 | Etanol   | 248.91                                 | 573.14                                 |
| <b>Ruezno</b>   | Agua     | 819.21                                 | 4199.25                                |
|                 | Etanol   | 293.11                                 | 855.83                                 |

Con respecto a la actividad antioxidante para semilla de aguacate, Melgar *et al.* (2018) reportan la actividad antioxidante de un extracto de etanol: agua (80:20 v/v) muy semejante al de esta investigación (etanol: agua, 70:30) y obtuvieron una  $CE_{50}$  para la variedad Hass de 220  $\mu\text{g/mL}$  muy por debajo del dato mostrado en el Cuadro 6. Por otra parte se reporta la  $CE_{50}$  de un extracto de semilla de variedad Hass pero a partir de su maceración con metanol al 80% y reportan 0.920 mg materia seca (Kosińska *et al.* (2012) mientras que en este documento se reportan valores mayores tanto para el extracto acuoso como para el etanólico.

En el caso del orégano Pruneda *et al.* (2008) reportan una  $CE_{50}$  para *L. graveolens* a partir de un extracto metanólico de 188  $\mu\text{g/mL}$  y para un extracto

acuoso de 115.9  $\mu\text{g/mL}$  muy por debajo de los resultados obtenidos en este trabajo (Cuadro 6).

Por otro lado Fernández-Argullo *et al.* (2013) evaluaron la actividad antioxidante de nuez verde (*Juglans regia* L.) tanto con agua obteniendo  $\text{CE}_{50}$  de 0.72  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que con etanol al 50% se obtuvo 0.33  $\mu\text{g/mL}$ . Valores inferiores a los que se encuentran en el Cuadro 5

Se ha reportado que en relación a los residuos de café, tanto los compuesto fenólicos como los productos de la reacción de Millard durante el tostado del café son responsables de la actividad de los extractos de café (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

Se pudo observar que los mejores resultados en algunos de los extractos se obtuvieron a partir del extracto etanólico, esto podría ser explicado debido a que los compuestos fenólicos son más solubles en solventes orgánicos menos polares que el agua. Los alcoholes particularmente metanol y etanol, han sido más eficientes que el agua en la extracción de fenoles a partir de fuentes naturales como cascaras de cítricos, te negro y plantas medicinales (Mussato *et al.*, 2011).

## **7.4 Evaluación del efecto antimicrobiano de extractos vegetales de RV**

### **7.4.1 Actividad antibacterial**

#### **7.4.1.1 Extractos acuosos.**

Ningún extracto acuoso presento eficiencia esto podría deberse a ciertos factores como: al mal manejo de los residuos previo a su maceración, así como ciertos compuestos afines al agua (azucres) que pudieron ayudar al incremento de distintos microorganismos al realizar las pruebas antimicrobianas.

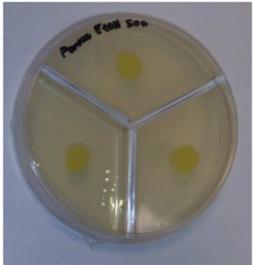
#### **7.4.1.2 Extractos etanólicos**

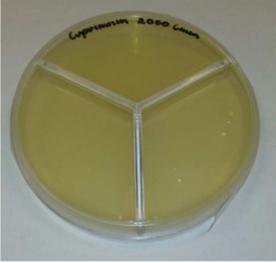
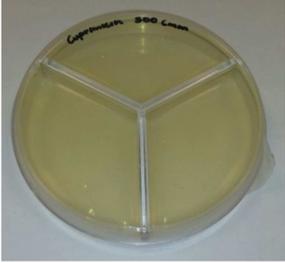
A continuación se describen los resultados obtenidos en las dos bacterias contra los extractos etanólicos.

#### 7.4.1.2.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Smith

Con respecto a esta bacteria fitopatógena se obtuvo inhibición tanto con el extracto del residuo de orégano como con el de semilla de aguacate a una concentración de 2000 ppm, debido a que en 1000 y 500 ppm respectivamente se presentó crecimiento bacteriano (Cudro 7 y 8).

Cuadro 6. Respuesta de las diferentes concentraciones sobre actividad antimicrobiana contra la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

|          | Concentraciones de extractos (ppm)  |   |   |
|----------|---|---|---|
|          | 2000  | 1000  | 500   |
| Aguacate |   |   |   |
| Café     |  |  |  |

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
| Orégano   |    |    |    |
| Rueznho   |    |    |    |
| Cuprimicin 100  |  |  |  |
| Control positivo  |   |  |   |
|  |   |  |   |

Cuadro 7. Concentración mínima inhibitoria de extractos de residuos vegetales contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

|                           | Concentración mínima inhibitoria (ppm) |      |     |
|---------------------------|--|------|-----|
|                           | 2000                                   | 1000 | 500 |
| Aguacate                  | +                                      | -    | -   |
| Café                      | -                                      | -    | -   |
| Orégano                   | +                                      | -    | -   |
| Ruezno                    | -                                      | -    | -   |
| Cuprimicin <sub>100</sub> | +                                      | +    | +   |

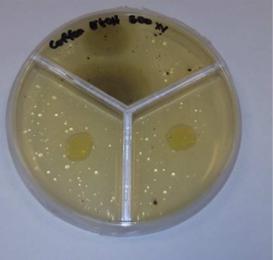
(+) Inhibición (-) Crecimiento

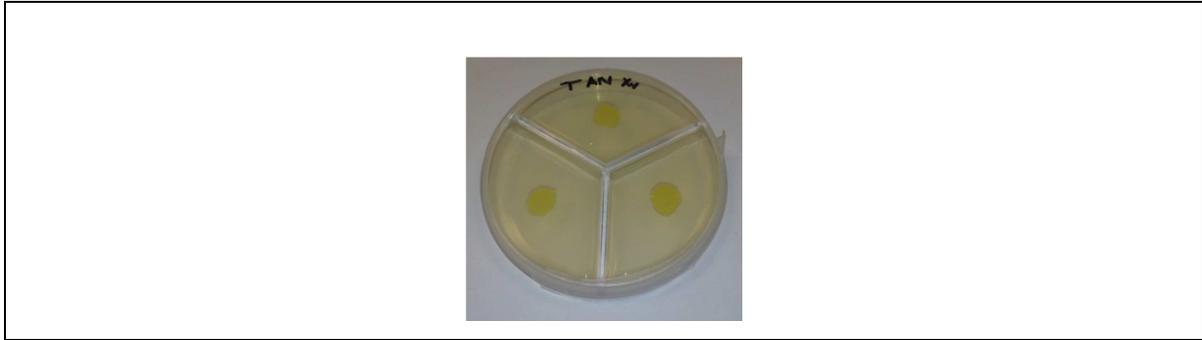
#### 7.4.1.2.2 *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson

En relación a *Xanthomonas vesicatoria* (*Xv*), se obtuvieron inhibiciones en las tres concentraciones de extracto de orégano y semilla de aguacate que se probaron a 2000, 1000 y 500 ppm. Se empleó el mismo testigo negativo, Cuprimicin<sub>100</sub>.

Cuadro 8. Respuesta de las diferentes concentraciones de extractos contra bacteria la fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*

|          | Concentraciones de extractos (ppm)  |  |   |
|----------|---|--|---|
|          | 2000  | 1000   | 500   |
| Aguacate |  |  |  |

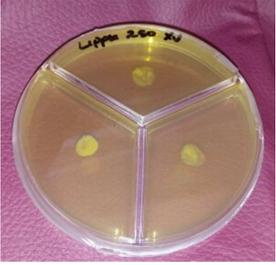
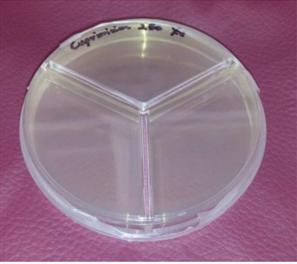
|                  |   |  |   |
|------------------|---|--|---|
| Café             |    |    |    |
| Orégano          |    |    |    |
| Ruezno           |  |  |  |
| Cuprimicín 100   |  |  |  |
| Control positivo |   |  |   |



Debido que en las tres concentraciones probadas se presentó una completa inhibición de la bacteria, se probaron otras dos concentraciones para los extractos de aguacate y de orégano con el objetivo de determinar la CMI, tales concentraciones fueron 250 y 125 ppm. Obteniéndose crecimiento en ambas pruebas.

Cuadro 9. Pruebas con concentraciones menores de extractos para determinar CMI

|          | Concentraciones de extractos (ppm) |     |
|----------|------------------------------------|-----|
|          | 250                                | 125 |
| Aguacate |                                    |     |

|   |   |  |
|---|---|--|
| Orégano   |  |  |
| Cuprimicin 100  |  |  |
| Control positivo  |   |  |
|  |   |  |

En el Cuadro 10 se muestra como el extracto de semilla de aguacate y de orégano inhibieron el crecimiento de *Xanthomonas vesicatoria*, siendo la CMI para ambos extractos de 500 ppm.

Cuadro 10. Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas contra *Xanthomonas vesicatoria*

|  | Concentración mínima inhibitoria (ppm) |      |     |     |     |
|--|--|------|-----|-----|-----|
|  | 2000                                   | 1000 | 500 | 250 | 125 |
|  |  |      |     |     |     |

|                           |   |   |   |   |   |
|---------------------------|---|---|---|---|---|
| Aguacate                  | + | + | + | - | - |
| Café                      | - | - | - | - | - |
| Orégano                   | + | + | + | - | - |
| Ruezno                    | - | - | - | - | - |
| Cuprimicin <sub>100</sub> | + | + | + | + | + |

(+) Inhibición (-) Crecimiento

Actualmente existe evidencia de que extractos de semilla de aguacate empleando distintos solventes orgánicos han sido probados principalmente contra bacterias patógenas como lo mencionado por Rodríguez-Carpena *et al.* (2011), analizan semilla de frutos de la variedad Hass y Fuerte empleando acetato de etilo, acetona y metanol durante la extracción y las pruebas se hicieron contra bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Pseudomonas spp.*, obteniendo efectos antimicrobianos moderados, a diferencia de esta investigación donde se obtuvo inhibición total de *Cmm* a 2000 ppm y de *Xv* a 500 ppm.

En el caso del residuo de café resulta muy interesante debido a que Monente *et al.* (2015) analizan residuos de café, tanto Arábica como Robusta, a partir de extractos acuosos presentando inhibición de las bacterias *S. aureus* y *L. monocytogene*. Mientras que Sant'Anna *et al.* (2016) de igual manera a partir de un extracto acuoso probado contra *S. aureus*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella enteritidis* y *E. coli*. no se presenta inhibición de estas bacterias, al igual que en esta investigación donde a ninguna concentración de extracto de café se presenta inhibición ni de *Cmm* ni de *Xv*, dichos autores atribuyen que esta falta de actividad antimicrobiana se puede deber a la baja concentración de productos generados durante la reacción de Millard, así como al proceso de extracción elegido.

Del orégano existe gran cantidad de evidencia de su poder antimicrobiano principalmente a partir de su aceite esencial, contra bacterias patógenas y fitopatógenas. Rivero-Cruz *et al.* (2011) reportan actividad

antibacteriana moderada contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* y *P. aeruginosa*. Por otra parte González-Espíndola *et al.* (2011) mencionan que mediante un extracto hexánico de hojas de orégano (*Lippia graveolens*) logra la inhibición de colonias de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. Esta actividad antibacteriana del orégano aún se ve reflejada en los residuos de hoja de la extracción de aceite esencial ya que presentó inhibición en ambas bacterias probadas (*Cmm* y *Xv*).

Con respecto al ruezno existe evidencia de haber funcionado el extracto acuoso de ruezno verde (*Juglas regia* L.) contra bacterias Gram positivas como *B. aeurus*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermis*, así como una respuesta negativa al ser probados contra bacterias Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosas* (Fernández-Argulló *et al.*, 2012), a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación que si inhibió completamente *Xv*, bacteria Gram negativa.

Por otro lado con respecto a las bacterias *Cmm* y *Xv* , las cuales se empelaron para esta investigación, existe la evidencia de su inhibición con *Allium sativum* (ajo) y fruta de *Ficus carica* (higo) (Balestra *et al.*, 2009).

#### **7.4.2 Actividad antifúngica**

De igual manera que en la prueba contra bacterias, sólo se emplearon los extractos etanólicos para probarse contra hongos fitopatógenos.

##### **7.4.2.1 Extractos acuosos.**

Ningún extracto acuoso al igual que para las pruebas contra bacterias presento eficiencia esto podría deberse a ciertos factores como: al mal manejo de los residuos previo a su maceración, así como ciertos compuestos afines al agua (azucres) que pudieron ayudar al incremento de distintos microorganismos al realizar las pruebas antimicrobianas.

##### **7.4.2.2 Extractos etanólicos**

A continuación se describen los resultados obtenidos en los dos hongos contra los extractos etanólicos.

**7.4.2.2.1 *Phytophthora capsici* Leonian**

No se presentó inhibición en ninguna de las pruebas realizadas, presentando un crecimiento normal como el control positivo. Mientras que en el control negativo no se observó crecimiento.

Cuadro 11. Actividad antimicrobiana contra hongo fitopatógeno *Phytophthora capsici*

|          | Concentraciones de extractos (ppm)  |  |   |
|----------|---|--|---|
|          | 2000  | 1000   | 500   |
| Aguacate |   |   |   |
| Café     |  |  |  |

|                      |  |  |  |
|----------------------|--|--|--|
| Orégano              |  |  |  |
| Ruezno               |  |  |  |
| Captán <sub>50</sub> |  |  |  |
| Control positivo     |  |  |  |
|                      |  |  |  |

Cuadro 12. Resultados finales contra *Phytophthora capsici*

|                           | Concentración mínima inhibitoria<br>(ppm) |      |     |
|---------------------------|---|------|-----|
|                           | 2000                                      | 1000 | 500 |
| Aguacate                  | -   | -    | -   |
| Café                      | -   | -    | -   |
| Orégano                   | -   | -    | -   |
| Ruezno                    | -   | -    | -   |
| Cuprimicin <sub>100</sub> | +   | +    | +   |

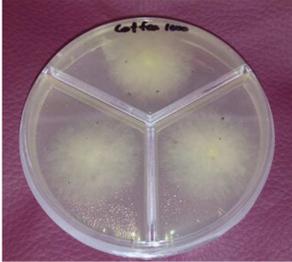
(+) Inhibición (-) Crecimiento

Los extractos empleados para las pruebas contra *P. capsici* demostraron no tener poder antifúngico contra este microorganismo.

#### 7.4.2.2 *Nalanthamala versmoesonii* (Biourge) Schroers

Cuadro 13. Respuesta de la actividad antimicrobiana contra hongo fitopatógeno  
*Nalanthamala versmoesonii*

|          | Concentraciones de extractos (ppm)  |  |   |
|----------|---|--|---|
|          | 2000  | 1000   | 500   |
| Aguacate |  |  |  |

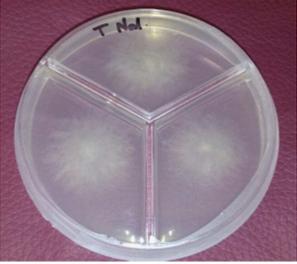
|                      |   |  |   |
|----------------------|---|--|---|
| Café                 |    |    |    |
| Orégano              |    |    |    |
| Rueznó               |  |  |  |
| Captán <sub>50</sub> |  |  |  |
| Control positivo     |   |  |   |



Como se puede apreciar en las imágenes anteriores tanto en las pruebas con extractos de aguacate y de orégano a la mayor concentración, de 2000 ppm, se ve crecimiento pero mucho menor al ser comparado con el control positivo. Motivo por el cual se repitió la prueba a concentraciones más elevadas, 3000 y 4000 ppm (Cuadro 14).

Cuadro 14. Concentraciones de extractos de aguacate y orégano a 3000 y 4000 ppm contra *Nalanthamala vermoesenii*

|          | Concentraciones de extractos (ppm) |      |
|----------|------------------------------------|------|
|          | 4000                               | 3000 |
| Aguacate |                                    |      |

|   |   |  |
|---|---|--|
| Orégano   |  |  |
| Captán 50   |  |  |
| Control positivo  |   |  |
|  |   |  |

Finalmente se obtuvo una inhibición completa del hongo, empleando una concentración de extracto de aguacate a 3000 ppm y de extracto de orégano a 4000 ppm, siendo estas las CMI para los extractos ya mencionados probados contra *Nalanthamala vermoesenii* (Cuadro 15).

Cuadro 15. Respuesta de los extractos de cuatro residuos verdes contra *Nalanthamala vermoesenii*

|                      | Concentración mínima inhibitoria (ppm) |      |      |      |     |
|----------------------|--|------|------|------|-----|
|                      | 4000                                   | 3000 | 2000 | 1000 | 500 |
| Aguacate             | -                                      | +    | -    | -    | -   |
| Café                 | ---                                    | ---  | -    | -    | -   |
| Orégano              | +                                      | -    | -    | -    | -   |
| Ruezno               | ---                                    | ---  | -    | -    | -   |
| Captán <sub>50</sub> | +                                      | +    | +    | +    | +   |

(+) Inhibición (-) Crecimiento

Los extractos de café y ruezno contra *N. vermoesenii* demostraron no tener poder antifúngico, sin embargo, al igual que en las pruebas contra bacterias fitopatógenas los extractos que presentaron actividad inhibitoria solo fueron los de semilla de aguacate y orégano.

En relación al extracto de semilla de aguacate se reporta por Giffoni *et al.* (2009) que extractos hexánicos y metanólicos de semilla de aguacate presentaron actividad antifúngica contra *Candida spp* y *Malassezia pachydermati*. Mientras que Raymond y Dykes (2010) dan a conocer que un extracto etanólico de la semilla del aguacate presenta inhibición contra *Zygosaccharomyces bailii*, a diferencia de un extracto acuoso que no inhibe a tal microorganismo, dichos autores especulan que esto se puede deber a la madurez del aguacate, ya que al madurar el fruto disminuye su potencial antifúngico debido a la descomposición de ingredientes activos.

Existe evidencia de que un extracto acuoso de café fue probado contra hongos fitopatógenos como *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *A. flavus*, entre otros, donde tampoco lograron su inhibición (Sant'Anna *et al.*, 2016).

El extracto de orégano en este caso solo logró la inhibición de *Nalanthamala vermoesenii*. Jasso *et al.* (2011), realizaron evaluaciones con

extractos crudos de hoja de orégano (*L. graveolens*) a partir de hexano y etanol, mostrando incluso una inhibición del 100% de hongos como *R. stolonifer* y *C. gloeosporioides*.

El extracto crudo de ruezno, al igual que el de café, no presentó ninguna actividad antimicrobiana, Pinheiro *et al.* (2014) menciona algo semejante al probar extractos acuosos y etanólicos de cáscara de nuez contra *P. roquefortii*, *Rhizopus* sp., y *Fusarium* sp, al no presentar ninguna inhibición en tales hongos con ninguno de los extractos probados.

Como se muestra anteriormente, con ninguno de los cuatro extractos se obtuvo una respuesta inhibitoria contra *P. capsici*, sin embargo, existe evidencia de su inhibición con otros extractos como con el extracto acuoso de *Parthenium hysterophorus* (Moosa *et al.*, 2016), con extracto acuoso de ajo (*Allium sativum* L.) debido a su contenido de alicina (Hayat *et al.*, 2016). Además de lograr su parcial inhibición mediante el residuo obtenido al extraer el aceite esencial de neem mediante un extracto etanólico (Duong *et al.*, 2014).

Con respecto *N. vermoeseni* son pocos los reportes existentes hasta el momento sobre este microorganismo y posibles extractos a emplear para su inhibición.

En el análisis estadístico de toda el experimento de actividad antimicrobiana se obtuvo que existe diferencia significativa en la inhibición obtenida respecto a los microorganismos empleados (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Phytophthora capsici* y *Nalanthamala vermoeseni*), los residuos empleados (aguacate, café, orégano y ruezno), y los solventes (agua y etanol). Sin embargo no existe diferencia significativa en la relación de la inhibición con respecto a las concentraciones que se probaron en todos los extractos (500, 1000 y 2000 ppm), al obtenerse un valor de p de 0.110661 ( $p > 0.05$ ).

En el Cuadro 16 se presenta una compilación de todos los resultados de experimentación obtenidos en este trabajo. Destacando de manera general que las mejores respuestas se obtuvieron en los residuos de orégano.

Cuadro 16. Resultados finales obtenidos

| Residuo                | Solvente  | Rendimiento (%)          | Fenoles mg EAG/g ES       | Flavonoides mg ECA/g ES | Actividad antioxidante (CE <sub>50</sub> ) |                      | Actividad antimicrobiana |          |
|------------------------|-----------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|--|----------------------|--------------------------|----------|
|                        |           |                          |                           |                         | ABTS                                       | DPPH                 | Microorganismo           | CMI*     |
| Semilla aguacate       | Acuoso    | 10.46±0.40               | 58.75±25.61               | 24.61±0.72              | 503.17                                     | 6955.73              | -                        | -        |
|                        | Etanólico | 13.88±0.48               | 110.2±32.68               | 57.94±2.69              | 638.19                                     | 2428.03              | <i>Cmm</i> **            | 2000 ppm |
|                        |           |                          |                           |                         |  |                      | <i>Xv</i> ***            | 500 ppm  |
|                        |           |                          |                           |                         |  |                      | <i>P. capsici</i>        | -        |
| <i>N. versmoesonii</i> | 3000 ppm  |                          |                           |                         |  |                      |                          |          |
| Café                   | Acuoso    | 3.77±0.18                | 216.5±14.62               | 110.93±5.5              | 426.45                                     | 1116.72              | -                        | -        |
|                        | Etanólico | 3.97±0.12                | 179.29±12.2               | 69.06±1.36              | 651.95                                     | 2037.99              | <i>Cmm</i>               | -        |
|                        |           |                          |                           |                         |  |                      | <i>Xv</i>                | -        |
|                        |           |                          |                           |                         |  |                      | <i>P. capsici</i>        | -        |
| <i>N. versmoesonii</i> | -         |                          |                           |                         |  |                      |                          |          |
| Orégano                | Acuoso    | 14.60±0.35               | 170±15.23                 | 64.89±2.12              | 591.44                                     | 1614.41              | -                        | -        |
|                        | Etanólico | <b><u>22.71±0.82</u></b> | <b><u>268.75±23.4</u></b> | <b><u>121±7.87</u></b>  | <b><u>248.91</u></b>                       | <b><u>573.14</u></b> | <i>Cmm</i>               | 2000 ppm |
|                        |           |                          |                           |                         |  |                      | <i>Xv</i>                | 500 ppm  |

|               |           |            |                           |                         |                      |         |                        |          |
|---------------|-----------|------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|---------|------------------------|----------|
|               |           |            |                           |                         |                      |         | <i>P. capsici</i>      | -        |
|               |           |            |                           |                         |                      |         | <i>N. versmoesonii</i> | 4000 ppm |
| <b>Ruezno</b> | Acuoso    | 7.47±0.43  | 46.25±0.68                | 46.56±1.56              | 819.21               | 4199.25 | -                      | -        |
|               | Etanólico | 12.80±1.55 | <b><u>230.71±14.5</u></b> | <b><u>131±12.58</u></b> | <b><u>293.11</u></b> | 855.83  | <i>Cmm</i>             | -        |
|               |           |            |                           |                         |                      |         | <i>Xv</i>              | -        |
|               |           |            |                           |                         |                      |         | <i>P. capsici</i>      | -        |
|               |           |            |                           |                         |                      |         | <i>N. versmoesonii</i> | -        |

\*Concentración mínima inhibitoria \*\**Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* \*\*\**Xanthomonas verwoese*

(-) Extractos que incrementan crecimiento de microorganismos

## 7.5 Análisis estadístico

Se realizaron los análisis para los distintos diseños experimentales de este trabajo mediante el programa Statistica 7, para que de esta manera se pueda llegar a una conclusión, en relación a los resultados previamente reportados.

El primer diseño experimental es solvente, residuos, rendimiento y actividad antioxidante con respecto a Trolox. En los resultados de la ANOVA para el rendimiento se obtuvo un valor de p inferior a 0.05 por lo que existe diferencia significativa en los resultados de rendimiento con respecto a los residuos empleados (aguacate, café, orégano y ruezno) y los solventes (agua y etanol) (Cuadro 17).

Cuadro 17. Resultados de ANOVA con respecto al rendimiento de los extractos de aguacate, café, orégano y ruezno

|              | Grados de libertad | Rendimiento SS | Rendimiento MS | Rendimiento F | Rendimiento p   |
|--------------|--------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|
| Intercepción | 1                  | 4018.366       | 4018.366       | 1393.999      | <b>0.000000</b> |
| Residuos     | 3                  | 890.247        | 296.749        | 102.944       | <b>0.000000</b> |
| Solvente     | 1                  | 145.593        | 145.593        | 50.507        | <b>0.000000</b> |
| Error        | 27                 | 77.831         | 2.883          |               |                 |

En la Figura 10 se aprecia un mayor rendimiento en los extractos etanólicos que en los acuosos, siendo mayores los extractos de aguacate y orégano con ambos solventes.

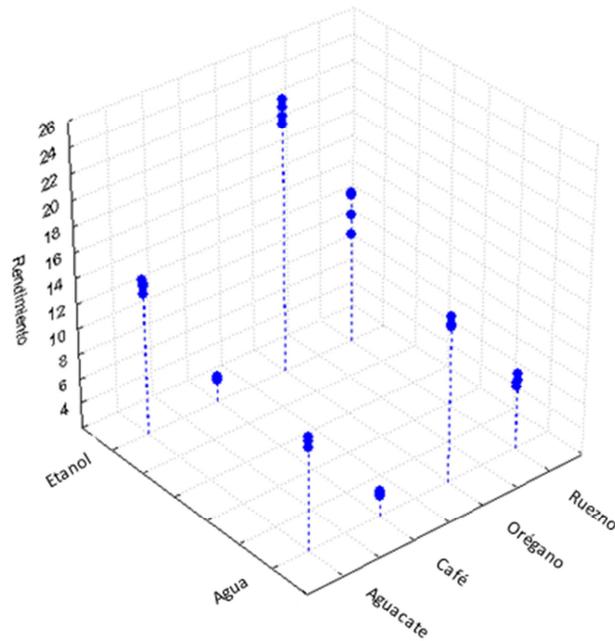


Figura 10. Gráficas comparativas de rendimiento de los dos solventes empleados con los residuos de aguacate, café, orégano y ruzno

En la Figura 11 se expresa que existe una diferencia significativa estadísticamente ( $p < 0.05$ ) hablando entre los solventes (agua y etanol) con respecto al rendimiento obtenido, siendo mejor el etanol. Lo mismo se presenta en la Figura 12 donde se expresa la diferencia de medias de los residuos con respecto al rendimiento existiendo diferencia significativa entre ellos ( $p < 0.05$ ) y observándose un mayor rendimiento en el extracto del residuo de orégano.

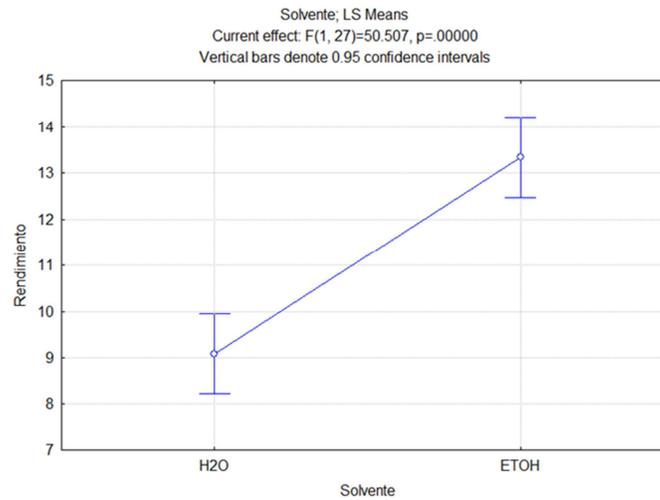


Figura 11. Diferencias de medias de los solventes con respecto al rendimiento obtenido

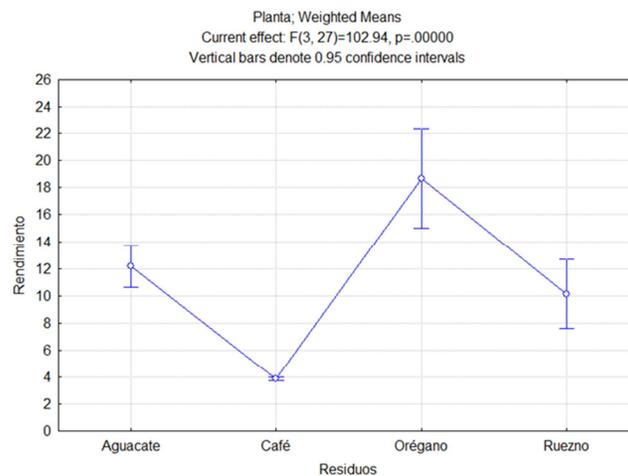


Figura 12. Diferencias de medias de los residuos con respecto al rendimiento que se obtuvo a partir de sus extractos

Con respecto a la determinación de fenoles la ANOVA arrojó que si existe diferencia significativa entre los valores de fenoles en relación a los residuos empleados y los solventes, obteniéndose un valor de  $p < 0.5$  (Cuadro 18).

Cuadro 18. Resultados obtenidos de la ANOVA para los resultados obtenidos de la concentración de fenoles totales en los distintos extractos

|            | Grados de libertad | Fenoles SS | Fenoles MS | Fenoles F | Fenoles p       |
|------------|--------------------|------------|------------|-----------|-----------------|
| Intercepto | 1                  | 819428.6   | 819428.6   | 365.6311  | <b>0.000000</b> |
| Residuo    | 3                  | 88963.7    | 29654.6    | 13.2319   | <b>0.000017</b> |
| Solvente   | 1                  | 44306.3    | 44306.3    | 19.7696   | <b>0.000135</b> |
| Error      | 27                 | 60510.6    | 2241.1     |           |                 |

En la Figura 13, se observa que de igual manera en los extractos etanólicos se obtuvo mayor concentración de fenoles totales, principalmente para ruezno y orégano.

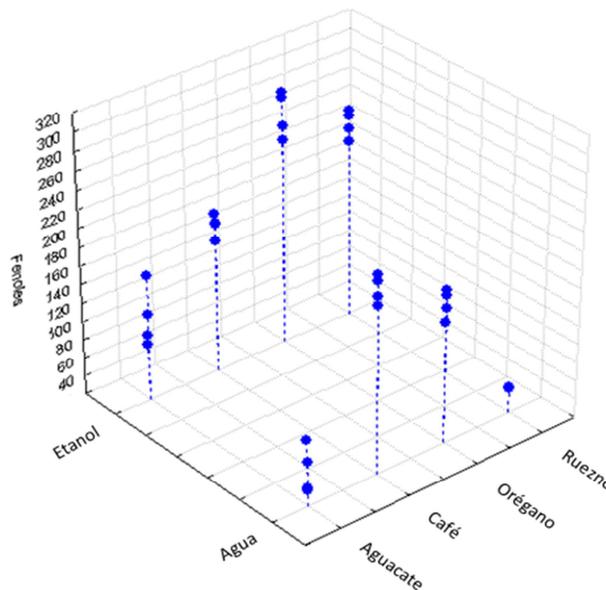


Figura 13. Comparación de contenido de fenoles totales en relación al solvente y residuos (aguacate, café, orégano y ruezno) de los cuales se obtuvieron los extractos acuosos y etanólicos

En los resultados del análisis de varianza para los flavonoides igual se obtiene que existe diferencia significativa  $p < 0.05$  (Cuadro 19).

Cuadro 19. Datos obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) respecto a los resultados de flavonoides

|            | Grados de libertad | Flavonoides SS | Flavonoides MS | Flavonoides F | Flavonoides p   |
|------------|--------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|
| Intercepto | 1                  | 195929.3       | 195929.3       | 287.9051      | <b>0.000000</b> |
| Residuo    | 3                  | 14652.8        | 4884.3         | 7.1771        | <b>0.001078</b> |
| Solvente   | 1                  | 8713.8         | 8713.8         | 12.8044       | <b>0.001335</b> |
| Error      | 27                 | 18374.4        | 680.5          |               |                 |

Sucediendo prácticamente lo mismo en los flavonoides que con los fenoles totales, al tenerse una mayor concentración en los extractos etanólicos (Figura 14). Siguiendo el mismo patrón con la determinación de actividad antioxidante reportada en relación a una curva de calibración de Trolox (Figura 15).

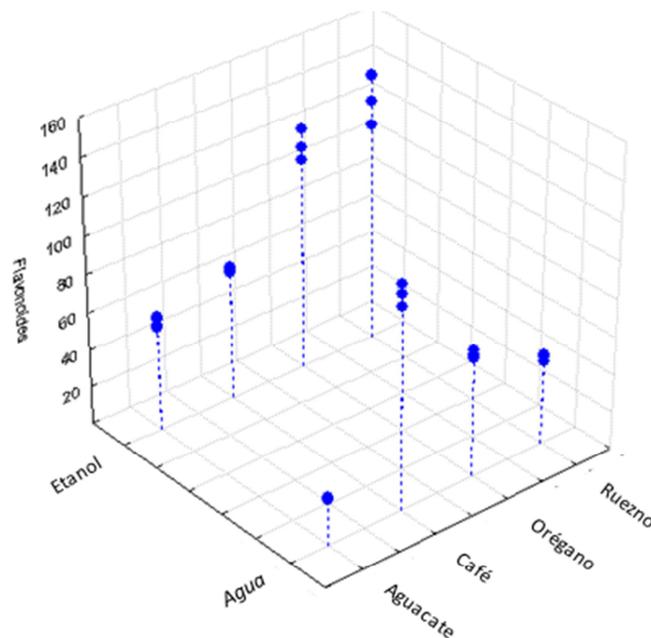


Figura 14. Comparación entre el contenido de flavonoides de los extractos (etanol y agua) obtenidos de los residuos de aguacate, café, orégano y ruezno

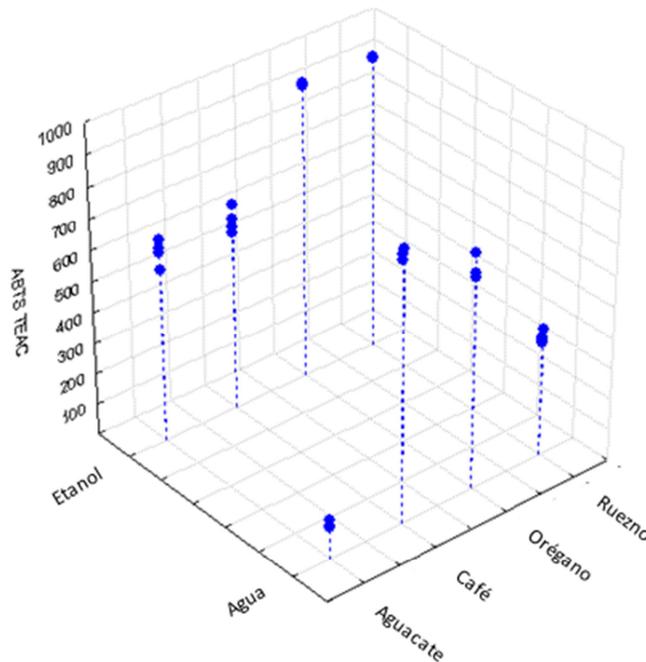


Figura 15. Comparación de los resultados de actividad antioxidante con respecto al radical ABTS expresado según el estándar comercial Trolox

En el segundo diseño experimental realizado, en relación a la determinación de ABTS y DPPH del análisis de varianza demuestra que existe diferencia significativa entre los resultados de inhibición respecto a los residuos y solventes usados, así como las distintas concentraciones de los extractos (Cuadros 20 y 21).

Cuadro 20. Resultados de análisis de ANOVA respecto a lo obtenido en la inhibición del radical ABTS a distintas concentraciones

|               | Grados de libertad | ABTS SS  | ABTS MS  | ABTS F   | ABTS p          |
|---------------|--------------------|----------|----------|----------|-----------------|
| Intercepto    | 1                  | 166469.3 | 166469.3 | 995.9481 | <b>0.000000</b> |
| Residuo       | 3                  | 9108.9   | 3036.3   | 18.1655  | <b>0.000000</b> |
| Solvente      | 1                  | 4353..4  | 4353.4   | 26.0455  | <b>0.000004</b> |
| Concentración | 3                  | 23160.6  | 7720.2   | 46.1883  | <b>0.000000</b> |
| Error         | 56                 | 9360.2   | 167.1    |          |                 |

Cuadro 21. Resultados de análisis de ANOVA respecto a lo obtenido en la inhibición del radical DPPH a distintas concentraciones

|               | Grados de libertad | DPPH SS  | DPPH MS  | DPPH F   | DPPH p          |
|---------------|--------------------|----------|----------|----------|-----------------|
| Intercepto    | 1                  | 27350.42 | 27350.42 | 178.0347 | <b>0.000000</b> |
| Planta        | 3                  | 5527.14  | 1842.38  | 11.9928  | <b>0.000004</b> |
| Solvente      | 1                  | 2882.88  | 2882.88  | 18.7658  | <b>0.000062</b> |
| Concentración | 3                  | 6369.43  | 2123.14  | 13.8204  | <b>0.000001</b> |
| Error         | 56                 | 8602.95  | 153.62   |          |                 |

Se puede observar en la Figura 16 y 17 como a mayores concentraciones del extracto incrementa la actividad antioxidante siendo el orégano uno de los que presentó mejor respuesta contra ambos radicales.

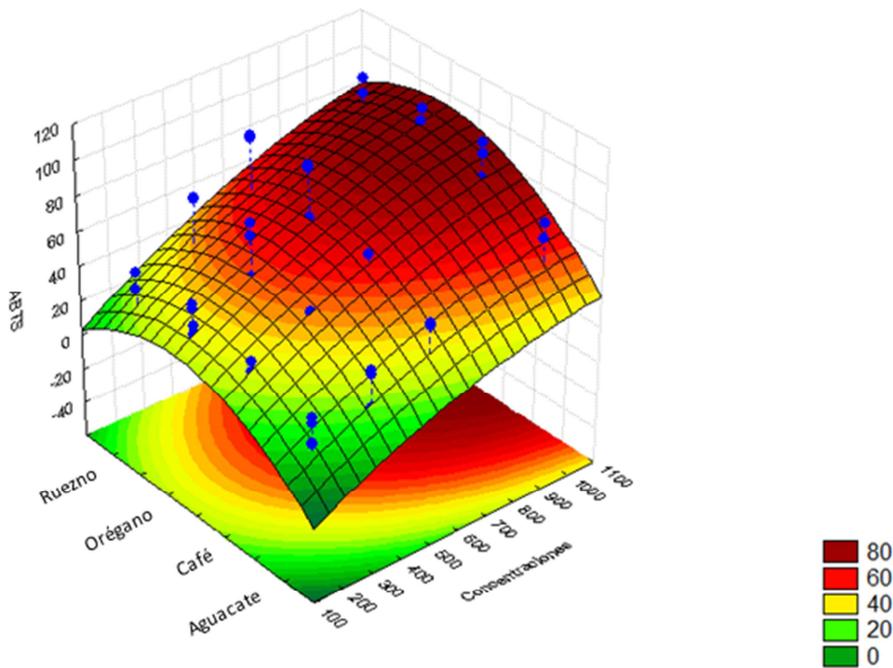


Figura 16. Comparativo de resultados de actividad antioxidante contra el radical ABTS en relación a los residuos de aguacate, café, orégano y ruezno

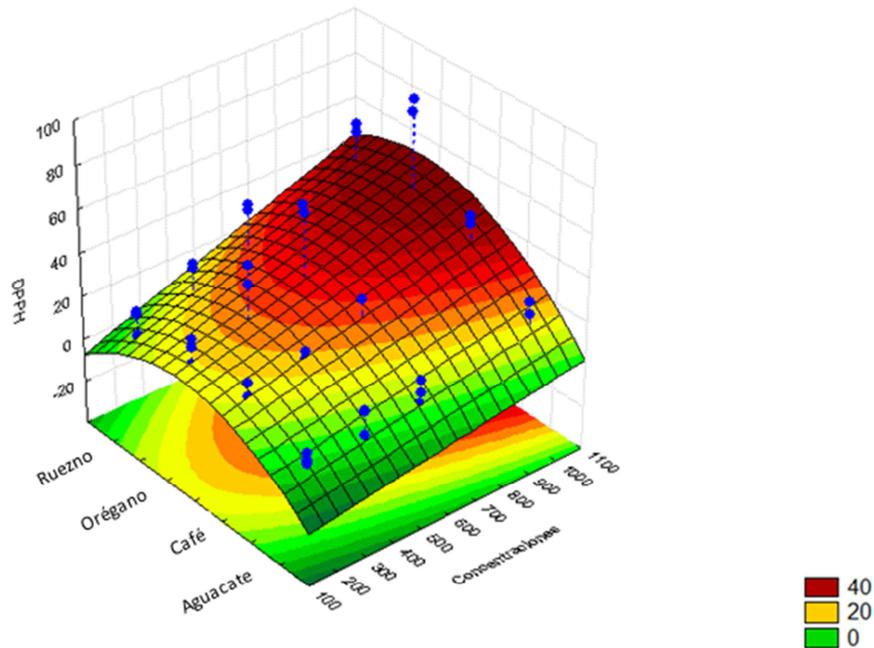


Figura 17. Resultados de actividad antioxidante contra DPPH, en relación a los extractos de aguacate, café, orégano y ruezno

Con respecto al último diseño experimental, el cual constituye la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de los residuos de semilla de aguacate, café, orégano y ruezno, probados contra cuatro microorganismos fitopatógenos. En el análisis de ANOVA se determinó que existe diferencia significativa entre la inhibición y los residuos, solventes y microorganismos que se emplearon para este trabajo ( $p < 0.05$ ). Pero no existe diferencia significativa entre la inhibición y las concentraciones de los extractos probadas para todos los microorganismos de 500, 1000 y 2000 ppm ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 22).

Cuadro 22. Resultados del análisis ANOVA en relación a la inhibición microbiana de los extractos

|            | Grados de libertad | Inhibición SS | Inhibición MS | Inhibición F | Inhibición p    |
|------------|--------------------|---------------|---------------|--------------|-----------------|
| Intercepto | 1                  | 2.28471       | 2.285714      | 50.63291     | <b>0.000000</b> |
| Planta     | 3                  | 2.40          | 0.80          | 17.72152     | <b>0.000000</b> |
| Solvente   | 1                  | 1.60          | 1.60          | 35.44304     | <b>0.000000</b> |

|                |     |       |          |          |                 |
|----------------|-----|-------|----------|----------|-----------------|
| Microorganismo | 3   | 2.40  | 0.80     | 17.72152 | <b>0.000000</b> |
| Concentración  | 2   | 0.2   | 0.10     | 2.21519  | <b>0.110661</b> |
| Error          | 350 | 15.80 | 0.045143 |          |                 |

En la Figura 18 se puede apreciar como los mejores resultados de inhibición se presentaron en la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*, seguida de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, ya que estas dos bacterias fueron en las que se obtuvieron las menores CMI en los extractos etanólicos de orégano y aguacate (Figura 19).

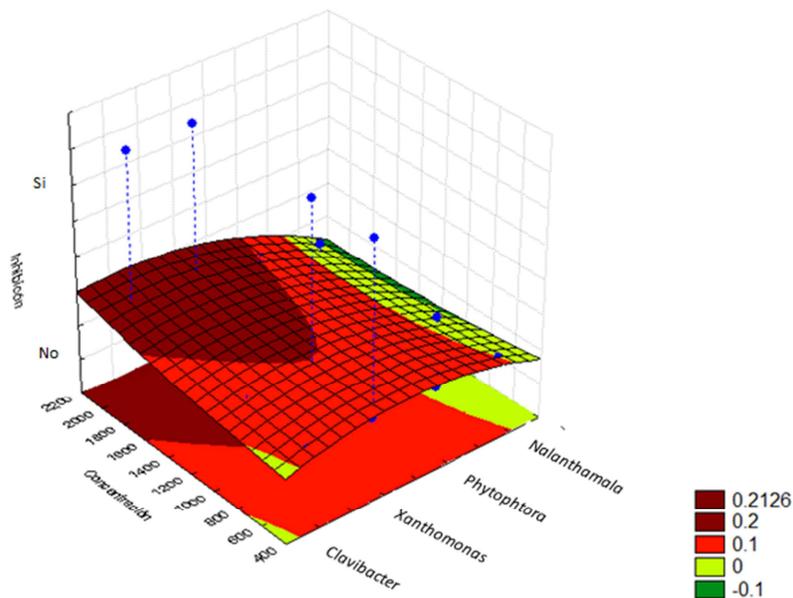


Figura 18. Comparativo de la inhibición que presentaron los extractos de los residuos a distintas concentraciones con respecto a cuatro microorganismos fitopatógenos

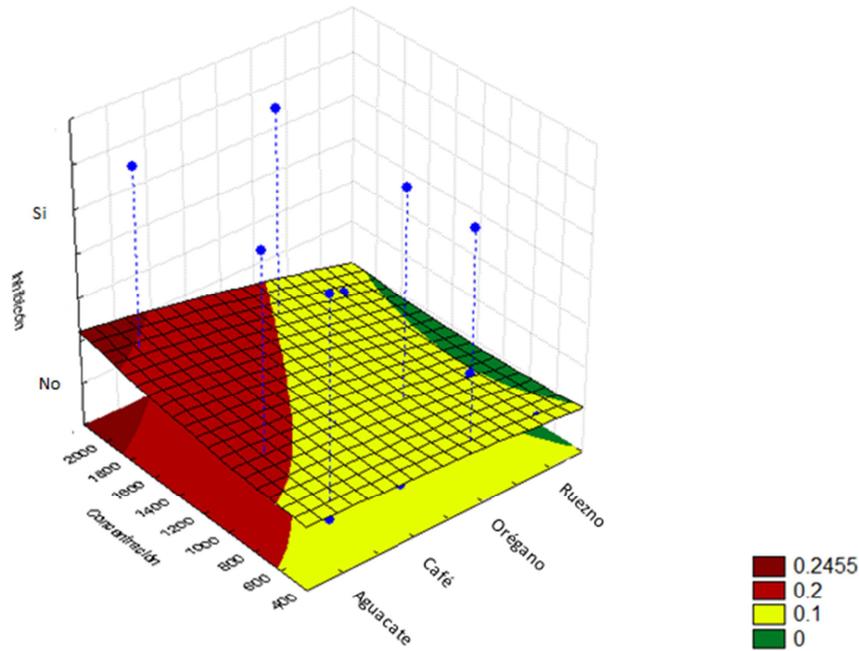
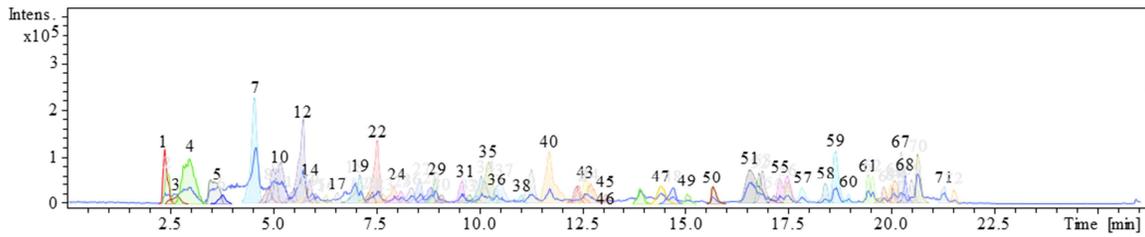


Figura 19. Comparativo de la inhibición de los extractos de aguacate, café, orégano y ruezno a distintas concentraciones

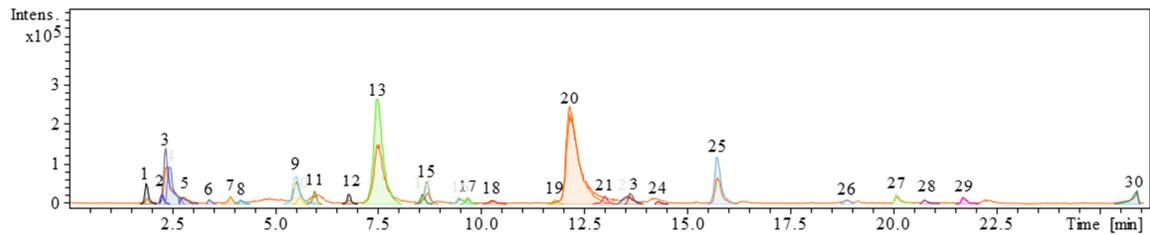
### 7.5 Identificación de compuestos químicos mayoritarios en los extractos

En la Figura 20 se presenta el cromatograma total de iones de los diferentes extractos. En la tabla 23 se presentan los datos del análisis de masas y los compuestos químicos identificados.

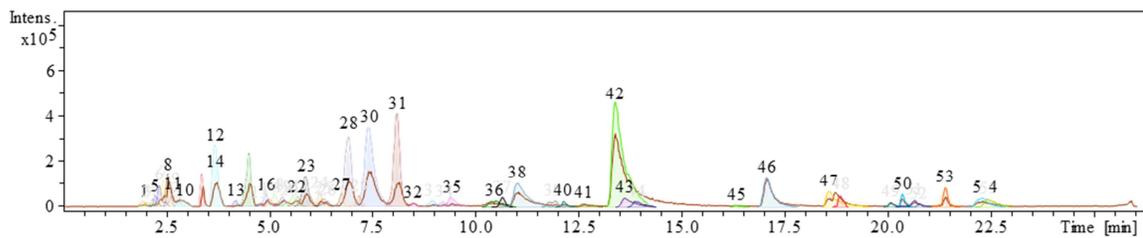
## Extracto de semilla de aguacate



## Extracto de café



## Extracto de orégano



## Extracto de ruezno

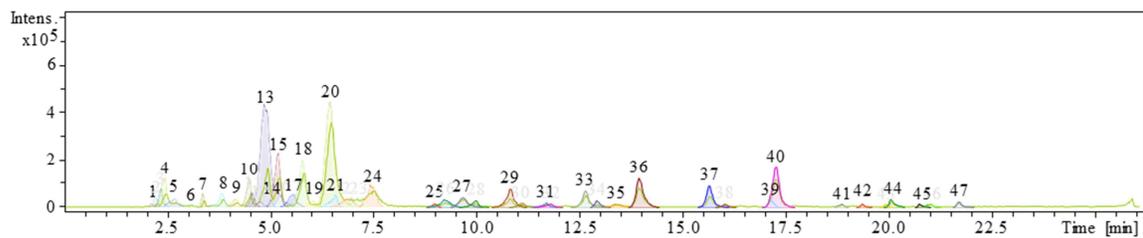


Figura 20. Cromatograma total de Iones de los extractos de semilla de aguacate, café, orégano y ruezno obtenido por espectrometría de masas

Cuadro 23. Análisis de los espectros de masas de los extractos para la identificación de los compuestos mayoritarios.

| <b>Extracto de semilla de aguacate</b> |                      |                            |                                      |
|--|----------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| No. pico                               | T <sub>r</sub> (min) | [M – H] <sup>-</sup> (m/z) | Compuesto sugerido                   |
| 1                                      | 2.4                  | 211.0820                   | Acido valérico                       |
| 4                                      | 2.9                  | 289.0714                   | Catequina/epicatequina               |
| 7                                      | 4.6                  | 289.0715                   | Catequina/epicatequina               |
| 12                                     | 5.7                  | 239.0923                   |                                      |
| 22                                     | 7.5                  | 463.2551                   | Quercetina-hexósido                  |
| 40                                     | 11.7                 | 433.2806                   | Quercetina-arabinosa                 |
| 51                                     | 16.6                 | 329.2330                   | Acido vanillico-glucosa              |
| 67                                     | 20.2                 | 327.1814                   | p-cumaroil tirosina                  |
| <b>Extracto de café</b>                |                      |                            |                                      |
| No. pico                               | T <sub>r</sub> (min) | [M – H] <sup>-</sup> (m/z) | Compuesto sugerido                   |
| 3                                      | 2.3                  | 191.0227                   |                                      |
| 9                                      | 5.5                  | 179.0349                   | Ácido caféico                        |
| 13                                     | 7.5                  | 359.0769                   | Acido dihidrocafeico 3-O-glucurónido |
| 20                                     | 12.1                 | 207.0652                   | Derivado de ácido caféico            |
| 25                                     | 15.7                 | 213.1125                   |                                      |
| <b>Extracto de orégano</b>             |                      |                            |                                      |
| No. pico                               | T <sub>r</sub> (min) | [M – H] <sup>-</sup> (m/z) | Compuesto sugerido                   |
| 11                                     | 3.4                  | 191.0556                   | Carvacrol                            |
| 14                                     | 4.5                  | 387.1659                   |                                      |
| 28                                     | 6.9                  | 451.1251                   | Floretín hexósido                    |
| 30                                     | 7.4                  | 359.0773                   | Acido rosmarínico                    |
| 31                                     | 8.1                  | 435.1298                   | Floretín                             |
| 42                                     | 13.4                 | 271.0609                   | Naringenina                          |
| <b>Extracto de ruezno</b>              |                      |                            |                                      |
| No. pico                               | T <sub>r</sub> (min) | [M – H] <sup>-</sup> (m/z) | Compuesto sugerido                   |
| 13                                     | 4.9                  | 711.2138                   |                                      |
| 15                                     | 5.2                  | 281.1388                   | Octil galato                         |
| 18                                     | 5.8                  | 177.0552                   |                                      |
| 20                                     | 6.5                  | 193.0497                   | Acido ferulico                       |
| 36                                     | 13.9                 | 329.2335                   |                                      |
| 40                                     | 17.2                 | 341.1388                   |                                      |

Los compuestos obtenidos en el aguacate concuerdan con lo reportado por Melgar *et al.* (2018), así como los encontrados en café coinciden con lo que encontrado por Panusa *et al.* (2013). En relación a los compuestos del extracto de orégano estos coinciden por lo que reportan Guimaraes *et al.* (2017).

## VIII. CONCLUSIONES

En la mayoría de los residuos se obtuvieron mayores rendimientos en sólidos, concentraciones de fenoles y flavonoides totales, actividad antioxidante y antimicrobiana al utilizar etanol como solvente.

El orégano fue el residuo con el que se obtuvo la mayor eficacia tanto al probarse contra microorganismos fitopatógenos como en la actividad antioxidante que posee, así como la concentración de fenoles, seguido principalmente por el residuo de aguacate.

Los extractos de aguacate y orégano inhibieron a *Nalanthamala vermoesenii*. No existe evidencia de pruebas para su inhibición con extractos vegetales y de residuos. Este es el primer trabajo a nivel nacional en el que se obtuvo tal inhibición a partir de los extractos de orégano y aguacate.

Se lograron identificar los metabolitos principales de los cuatro residuos empleados para esta investigación.

Los extractos etanólicos de orégano y aguacate podrían ser empleados en un futuro para contrarrestar enfermedades que atacan cultivos de importancia económica para el país.

De manera general, se concluye que se podrían emplear a futuro los extractos etanólicos de residuos de orégano y aguacate para la inhibición de bacterias fitopatógenas como *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* y *Xanthomonas vesicatoria*, e incluso de *Nalanthamala vermosenii*. Esto podría ser la pauta para próximos análisis contra este hongo fitopatógeno. Y a los residuos de orégano y aguacate se les podría dar un uso alternativo en diferentes áreas debido a los compuesto que poseen (extracción de compuestos fenólicos y/o plaguicidas botánicos) y así aprovechar tales compuestos bioactivos de estos residuos que son considerados comúnmente como basura y que su generación se sigue incrementando. A diferencia del residuo de café el cual debería tener un uso diferente al cual se planteó en este trabajo.

## IX. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

1. Debido a que el orégano fue el que presentó mejor respuesta en todos los análisis y es un residuo, podrían realizarse con este extracto etanólico pruebas en invernadero para ver si genera algún tipo de toxicidad en plántulas. Para que pueda llegar a ser empleado en un futuro como un plaguicida botánico.
2. De igual manera a partir del extracto etanólico de orégano o del ruezno podrían realizarse más estudios para ver si existe la posibilidad de obtener compuestos fenólicos que pueden ser empleados en distintos ámbitos industriales como en alimentos, cosméticos, entre otros.
3. El residuo de café, debido a que incrementa el crecimiento de los microorganismos podría ser probado para formulaciones para la siembra de microorganismos, como agares. O realizarse pruebas para su posible compostaje y de esta manera poder darle un uso alternativo a este residuo.
4. El extracto de ruezno etanólico que presentó buena actividad antioxidante podría ser empleado en pruebas con células debido a que tal vez no funcione para este tipo de inhibición de microorganismos fitopatógenos pero si en líneas celulares debido a que esta podría ser el mecanismo de acción que presentan los compuestos fenólicos que se reportan en este documento.
5. Tener mucho cuidado durante el manejo de los residuos (obtención, transporte, secado y molienda) debido a que como cualquier otro alimento pueden contaminarse muy fácilmente y eso afectar los resultados de investigaciones posteriores.

## X. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Acevedo, D., Navarro, M., y Monroy, L. (2013). Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*origanum vulgare*). *Información Tecnológica*, 24(4), 43–48.

doi:10.4067/S0718-07642013000400005

Alonso, O. (1999). Los insecticidas botánicos: una opción ecológica para el control de plagas. *Pastos y forrajes*, 22(1), 1-16. Recuperado de <http://payfo.ihatuey.cu/index.php/pasto/article/view/993/495>

Aguilar, A. J. (2008). Basura. Recuperado de [http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos\\_08/42-53%20basura%20OKMM.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos_08/42-53%20basura%20OKMM.pdf)

Andrade-Luna, M. I., Espinosa-Victoria, D., Gómez-Rodríguez, O., Cadena-Iñiguez, J., Arévalo-Galarza, M. L., Trejo-Téllez, L. I., y Delgadillo-Martínez, J. (2017). Severity of a *Phytophthora capsici* isolate in chayote *Sechium edule* plants at growth chamber level. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40–57.

Doi:10.18781/R.MEX.FIT.1607-3

Arcos, C. G., Ramírez, M. M., y Hernández Zeferino, V. (2013). Evaluación de bactericidas orgánicos para control de mancha bacteriana *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* en chile serrano. XVI Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. 512–515.

Armenteros, M., Ventanas, S., Morcuende, D., Estévez, M., y Ventanas, J. (2012). Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. *Eurocarne*, 207, 63–73.

- Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. Recuperado de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea*, (494), 161–172.  
doi:10.4067
- Ayala, S. T, y Ledesma, N. (2009). *Avocado History, Biodiversity and Production*.  
doi:10.1007/978-3-319-06904-3
- Balasundram, N., Sundram, K., y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.  
doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- Balestra, G. M., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E., y Quattrucci, A. (2009). Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28(10), 807–811.  
doi:10.1016/j.cropro.2009.06.004
- Barrera-Necha, L., y Bautista-Baños, S. (2008). Actividad Antifúngica de Polvos, Extractos y Fracciones de *Cestrum nocturnum* L. Sobre el Crecimiento Micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27–31. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092008000100005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092008000100005&script=sci_arttext)
- Borboa, F. J., Rueda, P. E. O., Acevedo, F. E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O., y García, O. A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista fitotecnología México*, 32(4), 319–326.

Brand-Williams, Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science Technology*, 28(1), 25–30.  
doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Bravo, J., Juárez, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., y Cid, Concepción. (2012). Evaluation of Spent Coffee Obtained from the Most Common Coffeemakers as a Source of Hydrophilic Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12565-12573.  
doi:10.1021/jf3040594

Brechelt, A. (2004). El Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL)*, 36. Recuperado de [http://www.rap-al.org/articulos\\_files/Manejo\\_Ecologico\\_de\\_Plagas\\_A.Bretchel.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/Manejo_Ecologico_de_Plagas_A.Bretchel.pdf)

Bueno, M. (2002). Aditivos Antioxidantes. *Instituto de Medicina Biológica y Antienvejecimiento*.

Cadena, M. M. E., Hernández, C. Y., y Osorio, S. E. S. (2012). Investigación de basura orgánica en el D.F. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Contaduría y Administración.

Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., y Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 46–52.  
doi:10.1016/j.lwt.2015.07.048

Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R., Márquez-Zequera, I., Millán-Ocampo, S., y Gaxiola-Espinoza, G. (2001). Sensibilidad a Cobre de Cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ( Doidge ) Dye, en Sinaloa , México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1), 72-77.

- Caxambú, S., Biondo, E., Kolchinski, E. M., Padilha, R. L., Brandelli, A., y Sant'Anna, V. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell aqueous extract on minimally processed lettuce leaves. *Food Science and Technology*, 36, 42–45.
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., y Cuca, E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. *Agronomía Colombiana*. 26(1), 97-105.
- Chapla, D., Divecha, J., Madamwar, D., y Shah, A. (2010). Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 361–369.  
doi:10.1016/j.bej.2010.01.012
- COFUPRO (2003). Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología de la nuez. Recuperado de <https://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit44.pdf>
- Compean, K. L., y Ynalvez, R. A. (2014). Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: a review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 8(5), 204-213.
- Corella-Bernal, B. A., y Ortega-Nieblas, M. M. (2013). Importancia el aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. *Revista Ciencias Biológicas y de Salud*, 15(1), 57-64.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212.  
doi:10.4067/S0717-75182015000200014

- Corral, T. L. C. (2011). *Aprovechamiento de los residuos que se generan en la extracción del aceite esencial de orégano (Lippia graveolens HBK. s.l.)* (Tesis de maestría, Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional, unidad Durango). Recuperada de <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/12655>
- Corrales, L. C., y Muñoz, A. M. M. (2012). Estrés oxidativo : origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250.
- Cortinas, N. C. (2002). Manual 1 introducción y elementos de técnica regulatoria. Recuperado de <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsars/e/fulltext/taller1/taller1.pdf>
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- Cruz, C. D., Fletcher, G. C., y Pajak, M. A. (2014). Tannins and extracts of fruit byproducts: Antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46), 11146–11156. doi:10.1021/jf503819t
- Cury, R. K., Aguas, M. Y., Martinez, M. A., Olivero, V. R., y Chams, C. L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(S), 122. doi:10.24188/recia.v9.nS.2017.530
- Dabrowska, C. C. y Moya, M. M. S. (2009). *Vitaminas y antioxidantes*. Recuperado de [http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS\\_Y\\_ANTIOX\\_EL\\_MEDICO.pdf](http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf)

- De La Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., y Shahidi, F. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 152–162. doi:10.1021/jf1034306
- Dominguez-Avila, J. A., Alvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J. A., Maldonado-Mendoza, I. E., Gómez-García, M. C., y de la Rosa, L. A. (2015). The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. *Food Chemistry*, 529-537.
- Domingo, D. (2017). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española Quimioterapia*. 16(4), 386-392. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Diego\\_Domingo/publication/28066457\\_Plantas\\_con\\_accion\\_antimicrobiana/links/0c9605256d677b1d8f000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Diego_Domingo/publication/28066457_Plantas_con_accion_antimicrobiana/links/0c9605256d677b1d8f000000.pdf)
- Domingo, D., y López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana, *Rev. Esp. Quimioterapia*, 385-392.
- Dreher, M. L., y Davenport, A. J. (2013). Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 738–750. doi:10.1080/10408398.2011.556759
- Duda-Chodak, A., y Tarko, T. (2007). Antioxidant properties of different fruit seeds and peels. *ACTA Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 6(3), 29–36.
- Dueñas, J., Naranjo, B., y Araujo, P. (2009). Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas., 1-8. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/877>

- Duong, D. H., Ngo, X. Q., Do, D. G., Le, T. A. H., Nguyen, V. T., y Smol, N. (2015). Effective control of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) cake to plant parasitic nematodes and fungi in black pepper diseases in vitro. *Journal of Vietnamese Environment*, 6(3), 233-238.  
doi:10.13141/jve.vol6.no3.pp233-238
- EPPO (1995). *Xanthomonas vesicatoria*. Recuperado de [https://gd.eppo.int/download/doc/282\\_datasheet\\_XANTVE.pdf](https://gd.eppo.int/download/doc/282_datasheet_XANTVE.pdf)
- Fernández-Argulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentao, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., y Pereira, J. A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops & Products*, 42, 126–132.  
doi:10.1016/j.indcrop.2012.05.021
- Ferrar-Cerrato, R., y Alarcon, A. (2010). *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y plant-microorganismo* (1a ed.). México: Trillas.
- Frías-Pizano, J., Acosta-García, G., Sánchez-rico, K. F., González-Chavira, M. M., y Gerardo, R. (2016). Detección de *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis* por PCR en planta de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*, 7(6), 1347–1357.
- Frusso, E. A. (2007). Características morfológicas y fenológicas del Pecán. *Inta*, 1–3.
- Fuentes, M. N., Fragozo, T. O. I., y Vizcaíno, M. L. (2015). Residuos agroindustriales como adiciones en la elaboración de bloques de concreto no estructural. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 25(2), 99-116.  
doi:10.18359/rcin.1434

Gaascht, F., Dicato, M., y Diederich, M. (2015). Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. *Genes and Nutrition*, 10(6), 1–17.

doi:10.1007/s12263-015-0501-3

García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, 27(1), 1-12. Recuperado de <http://payfo.ihatuey.cu/index.php/pasto/article/view/795/1290>

García-Pérez, E., Castro-Álvarez, F. F., Alejandra, J., y Silverio, G. (2012). Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano\*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2), 339–353.

Giffoni, L, J. J. G., Salles, B. É. H., Cordeiro, R. A., Nogueira, B. R. S., Costa, S. J. J., Medeiros, B. L., ... Gadelha, R. M. F. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), 110–113.

doi:10.1590/S0037-86822009000200003

Giroto, F., Alibardi, L., y Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, 45, 32–41.

doi:10.1016/j.wasman.2015.06.008

González, E. M. S., González, E. M., López, E. I. L., Tena, F. J. A., Retana, R. F. I., González, R. L., y González, G. M. C. (2011). *Lippia graveolens* H.B.K. ¿Especie o complejo de especies? . En G. Pérez Santiago, M. P. González Castillo, G. Alexandre Iturbide & M. C. González Güereca (Eds.), *El orégano mexicano: estado actual del conocimiento* (pp. 11-14). Durango, México: La casa editorial de Durango.

- González-Espíndola, L. A., Jacobo-Salcedo, M. R., Castro, B. F., y García-Luján, C. (2011). Actividad bactericida de varios extractos y de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* HBK) sobre una cepa fitopatógena de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. En G. Pérez Santiago, M. P. González Castillo, G. Alejandro Iturbide & M. C. González Güereca (Eds.), El orégano mexicano: estado actual del conocimiento (pp. 109-116). Durango, México: La casa editorial de Durango.
- González, G. M. C., Soto, H. M., Kite, G., y Martínez, V. M. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 43-49.
- González-Sánchez, M. E., Pérez-Fabiel, S., Wong-Villarreal, A., Bello-Mendoza, R., y Yañez-Ocampo, G. (2015). Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante digestión anaerobia. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 229–235.
- Guimaraes, L. S., Guimarães, L. G., Vicco, D. K. T., Paulo, J., Pereira, B., Morais, G. De,...Rastrelli, L. (2017). Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia origanoides*. *Journal of Chromatography A*, 1520, 83–90. doi:10.1016/j.chroma.2017.09.004
- Gutiérrez, A. D. G., Ortiz, G. C. A., y Mendoza, C. A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal, 1–5.
- Hayat, S., Cheng, Z., Ahmad, H., Ali, M., Chen, X., y Wang, M. (2016). Garlic, from Remedy to Stimulant : Evaluation of Antifungal Potential Reveals Diversity in Phytoalexin Allicin Content among Garlic Cultivars; Allicin Containing Aqueous Garlic Extracts Trigger Antioxidants in Cucumber. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–15.

doi:10.3389/fpls.2016.01235

Hausbeck, M. K., y Lamour, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops: Research Progress and Management Challenges. *Plant Disease*, 88(12), 1292-1303.

Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., y Romani, A. (2009). Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry*, 114(3), 765–770.

doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.010

Hernández-Montoya, V., Mendoza-Castillo, D. I., Bonilla-Petriciolet, A., Montes-Morán, M. A., y Pérez-Cruz, M. A. (2011). Role of the pericarp of *Carya illinoensis* as biosorbent and as precursor of activated carbon for the removal of lead and acid blue 25 in aqueous solutions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 92(1), 143–151.

doi:10.1016/j.jaap.2011.05.008

Huerta, C. (1997). Orégano mexicano: oro vegetal. CONABIO. *Biosiversitas*, 15, 8-13.

Idris, S., Ndukwe, G., y Gimba, C. (2009). Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of seed extracts of *Persea americana* (avocado pear). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2(1), 173–176.

doi:10.4314/bajopas.v2i1.58538

Imafidon, K. E. y Amaechina, F. C. (2010). Effects of Aqueous Seed Extract of *Persea americana* Mill. (Avocado) on Blood Pressure and Lipid Profile in Hypertensive Rats. *Advances in Biological Research*, 4(2), 116–121.

Jasso, R. D., Rodríguez, G. R., Hernández, C. F. D., Aguilar, G. C. N., Sáenz, G. A., Villarreal, Q. J. A., y Moreno, Z. L. E. (2011). In vitro antifungal activity of

extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34, 960–966.  
doi:10.1016/j.indcrop.2011.03.001

Koh, E., y Hwa, K. (2017). Preparation and properties of cotton fabrics finished with spent coffee extract. *Cellulose*.  
doi:10.1007/s10570-017-1466-8

Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., y Dykes, G. A. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of persea americana Mill. Peels and seeds of two varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4613–4619.  
doi:10.1021/jf300090p

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., y Naidu, R. (2015). Bioremediation potential of natural polyphenol rich green wastes: A review of current research and recommendations for future directions. *Environmental Technology and Innovation*, 4, 17–28.  
doi:10.1016/j.eti.2015.04.001

Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., y Huitema, E. (2012). Pathogen profile. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular plant pathology*, 13, 329–337.  
doi:10.1111/J.1364-3703.2011.00754.X

Li, D., Zhao, G., Yang, C., Jalsrai, A., y Kerin, B. (2013). Four noteworthy hyphomycetes from indoor environments, 125, 111–121.  
doi: 10.5248/125.111

- Llenera, H. A. (2011). Metabolitos secundarios. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Recuperado de [http://www.rap-al.org/articulos\\_files/METABOLITOS\\_Llenera3.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/METABOLITOS_Llenera3.pdf)
- Lotfy, H. R., Misihairabgwi, J., y Mutwa, M. M. (2012). The preparation of activated carbon from agroforestry waste for wastewater treatment. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* 6(11), 149–156.
- López, E. I. L., González, E. M. S., González, E. M., Ruacho, G. L., Retana, R. F. I. y Tena, F. J. A. (2011). Distribución geográfica de las especies de orégano en Durango.. En G. Pérez Santiago, M. P. González Castillo, G. Alejandro Iturbide & M. C. González Güereca (Eds.), *El orégano mexicano: estado actual del conocimiento* (pp. 23-32). Durango, México: La casa editorial de Durango.
- López-García, F. J., Escamilla-Prado, E., Zamarripa-Colmenero, A., y Cruz-Castillo, J. G. (2016). Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica* L.) en Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(3), 297–304.
- Lozano, C. J. I. (2013). *Cultivo de Nogal (Carya illinoensis)* (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). Recuperada de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5853/T19821%20LOZANO%20CADENA,%20JOSE%20IGNACIO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Luna, F. J. A., Córdoba, L. L. S., Gil, P. K. I., y Romero, B. I. M. (2013). Efecto de residuos agroforestales parcialmente biodegradados por *Pleurotus Ostreatus* (Pleurotaceae) sobre el desarrollo de plántulas de tomate. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 357–366. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84880705149&partnerID=tZOtx3y1>

Mayor-Oxilia (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista Instituto de Medicina Tropical*, 5(2).

Martínez-Rocha, A., Puga, R., Hernández-Sandoval, L., Loarca-Piña, G., y Mendoza, S. (2008). Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plants Foods for Human Nutrition*, 1–5.  
doi:10.1007/s11130-007-0061-9

Martinez, J. I., y Villezca, B. P. A. (2005). La alimentación en México. Un estudio a partir de la encuesta nacional de ingresos y gastos de los hogares y de las hojas de balance alimenticio de la FAO. *Ciencia UANL*, 8(2), 196-208.

Meléndez, R. P., Rodríguez, H. R., Aguilar, C. N., y Nevárez-Morillón, G.V. (2013). Microbiological Effect of Fermented Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Waste. *Waste biomass Valor*.  
doi:10.1007/s12649-013-9222-2

Melgar, B., Dias, M. I., Ciric, A., Sokovic, M., Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., ... Ferreira, I. C. R. F. (2018). Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops & Products*, 111, 212–218.  
doi:10.1016/j.indcrop.2017.10.024

Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-adame, D., Castillo, F., Hernández-castillo, F. D., y Aguilar, C. N. (2012). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops & Products*, 37(1), 445–450.  
doi:10.1016/j.indcrop.2011.07.017

- Mohamed, H. W., Ahmed, A. E., Ezzat, M., Shaker, A. R., & Abdelwahed, S. S. (2016). First record and disease management of pinkrot in cocos palm trees in Egypt. *Scholar Research Library*, 8(10), 27–31.
- Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., Peña, M. P. De, y Cid, C. (2015). Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne. *Journal of Functional Foods*, 12, 365–374.  
doi:10.1016/j.jff.2014.12.006
- Montoya, B. H., Lemeshko, V., López, J. B., Pareja, A., Urrego, R., y Torres, R. (2003). Actividad antioxidativa de algunos extractos vegetales. *Vitae Revista de la Facultad de Química farmacéutica*, 10(2), 72–79. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169817981008.pdf>
- Moosa, A., Farzand, A., y Anjum, M. Z. (2016). In vitro evaluation of botanical extracts and fungicides against Phytophthora blight of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Pakistan Journal of Phytopatology*, 28(2), 201–206.
- Muñoz, E. L. y Rojas, B. L. (2016). Subproductos del aguacate, materia prima potencial para diversos sectores industriales. *Investigación, ciencia, innovación y competitividad “, Una estrategia de desarrollo agroindustrial sostenible en territorio de Paz”*, 130-143. Recuperado de <http://www.udla.edu.co/documentos/docs/ViceRectoria%20de%20Investigaciones%20y%20Posgrados/Publicaciones/Libros/Investigacion%20Ciencia,%20Innovacion%20y%20Competitividad.pdf#page=130>
- Muñoz, J. A. M., y Ramos, E. F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico*, 7(1), 23–31.
- Muñoz, A. A., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Cardenas, C. Y., Reyes, J. A., Kouzntsov, V., y Stashenko, E. E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia Et Technica*, 13(33), 125-128.

- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., y Teixeira, J. A. (2011a). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83(1), 173–179.  
doi:10.1016/j.seppur.2011.09.036
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., y Teixeira, J. A. (2011b). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 368–374.  
doi:10.1016/j.carbpol.2010.07.063
- Ngaha, N. M. I., Mahdi, E., Massoma, L. D., Nde, Z, y Nyonseu, D. (2017). Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. 67-72  
doi: 10.15242/IIE.C0517024
- Ochoa, P. M. A. (2014). Residuos forestales. Recuperado de <https://prezi.com/plrfeadz5wnt/residuos-forestales/>
- Ojeda-Barrios, D. L., Hernández-Rodríguez, O. A, López-Ochoa, G. R., y Martínez-Téllez, J. J. (2009). Evolución de los sistemas de producción de nuez en México. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(3), 115-120.
- Olaeta, J. A. (2016). Industrialización Del Aguacate : Estado Actual y Perspectivas Futuras.
- Ornela, J. J., Yahia, E. M. (2002). El aguacate en México. *Horticultura Internacional*.
- Orona, C. I., Salvador, A. A. J., Espinosa, A. J. J., y Vázquez, V. C. (2017). Recolección y comercialización del orégano (*Lippia spp*) en el semi-desierto mexicano, un caso de estudio: reserva ecológica municipal sierra y cañón de Jimulco, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 41, 684-695.

- Oumam, N., Oumam, M., Abourriche, A. K., Abourriche, A. M., Hannache, H., y Bennamara, A. (2013). Elaboration and characterization of a new activated carbon obtained from oregano residue : Application in environmental field, *4005*, 3–5. doi:10.1051/mateconf/20130504005
- Padilla-Camberos, E., Martínez-Velázquez, M., Flores-Fernández, J. M., y Villanueva-Rodríguez, S. (2013). Acute Toxicity and Genotoxic Activity of Avocado Seed Extract (*Persea americana* Mill., c.v. Hass). *The scientific world journal*. doi:10.1155/2013/245828
- Panusa, A., Zuorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., y Petrucci, R. (2013). Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 4162–4168. doi:10.1021/jf4005719
- Pérez, Á. S., Ávila, Q. G., y Coto, A. O. (2015). Revisión bibliográfica El aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Cultivos Tropicales*, *36*(2), 111–123. doi:10.13140/RG.2.2.19879.55200
- Pérez-Alonso, N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, *11*(4), 195-211.
- Pérez, L. E. (2012). Resumen plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, *16*(1), 51–59. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209125190002.pdf>
- Pinheiro, D. A. C., Silvestre, D. H., Mello, D. S., Manique, B. P. L., Werneck, V. C. R., Maraschin, M.,...Mara, B. J. (2014). Effect of extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut (*Cary illinoensis* (Wangenh) C. Koch) shell. *Industrial Crops and Products*, 552-561.

Pinto, A. A., y Zilberman, D. (2014). Modeling, dynamics, optimization and bioeconomics I: Contributions from ICMOD 2010 and the 5th Bioeconomy Conference 2012. *Springer Proceedings in Mathematics and Statistics*, 73, 1–2.

doi:10.1007/978-3-319-04849-9

Pruneda, E., Peralta-Hernández, J. M., Esquivel, K., Lee, S. Y., Godínez, L. A., y Mendoza, S. (2008). Water Vapor Permeability, Mechanical Properties and Antioxidant Effect of Mexican Oregano – Soy Based Edible Films. *Journal of Food Science*, 73(6), 488–493.

doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00843.x

Ramalakshmi, K., Mohan, R. L. J., Takano-Ishikawa, Y., y Goto, M. (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry*, 115(1), 79–85.

doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.063

Raymond, C. T. W., y Dykes, G. A. (2010). Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 753-756.

doi:10.3109/13880200903273922

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237.

Reyes-Jurado, F., López-Malo, A., y Palou, E. (2016). Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Protection*, 79(2), 309–315.

doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-39

- Rico-Guerrero, L., Medina-Ramos, S., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-Olvera, L., y Guevara-González, R. G. (2004). Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1), 1-6.
- Rivera, A. M. M., Carballo, G. C., Milanés, F. M., Ramos, G. R., y Orama, V. A. (2003). Efecto de plaguicidas de origen botánico sobre el áfido *Carolinaia cyperi* Ainslie. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(3). Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962003000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000300009)
- Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E., y Mata, R. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. *Journal of Food Science*, 76(2), 309–317. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.02022.x
- Romero-Arenas, O., Martínez, G. M. A., Damián, H. M. A., Ramírez, V, B., y López-Olguín, J. F. (2015). Producción del hongo Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(6), 1229–1238.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., y Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5625–5635. doi:10.1021/jf1048832
- Rodriguez-Garcia, I., Cruz-Valenzuela, M. R., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Moctezuma, E., Gutierrez-pacheco, M. M., ... Ayala-zavala, J. F. (2015). Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil added within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity. doi:10.1002/jsfa.7568

- Rosales, A. V. (2015). *Evaluación de efecto antioxidante y antimicrobiano de los residuos de orégano (Lippia graveolens)* (Tesis de maestría, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, México). Recuperado de [repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/)
- Rosales, C. M., & González, L. R. F. (2003). Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera Y Bosques*, 9(2), 41–49.  
doi:10.21829/myb.2003.921285
- Rosales, E., Ferreira, L., Sanromán, M. Á., Tavares, T., y Pazos, M. (2015). Enhanced selective metal adsorption on optimised agroforestry waste mixtures. *Bioresource Technology*, 182, 41–49.  
doi:10.1016/j.biortech.2015.01.094
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos) (2015). Convención Internacional del Café, México 2016. 1-21.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos) (2011). Monografía de cultivos. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Monograf%C3%ADa%20del%20aguacate.pdf>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos) (2017a). Panorama internacional café. Recuperado de [https://amecafe.org.mx/wpcontent/uploads/2017/09/Panorama\\_Internacional\\_Caf%C3%A9\\_2017.pdf](https://amecafe.org.mx/wpcontent/uploads/2017/09/Panorama_Internacional_Caf%C3%A9_2017.pdf)
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos) (2017b). Planeación agrícola nacional 2017-2030. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B\\_sico-Caf\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf)

SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos) (2002). Tecnología de la Producción en Nogal Pecanero. 3, 1-221.

Salinas, S. D.O., Arteaga, N. G. L., León, R. I., Dorado, R. O., Valladares, C. M. G., y García, N. V. M. (2009). Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra biosphere reserve in Morelos (México). *Polibotánica*, 28, 213-225  
Sant'Anna, V., Biondo, E., Kolchinski, E. M., Schröetter, L. F., Folmer, C. A. P, Bach, E., & Brandelli, A. (2016). Total Polyphenols, Antioxidant, Antimicrobial and Allelopathic Activities of Spend Coffee Ground Aqueous Extract. *Waste Biomass Valor*, 0–3.  
doi:10.1007/s12649-016-9575-4

Sant'Anna, V., Biondo, E., Kolchinski, E. M., Schröetter, L. F., Folmer, C. A. P, Bach, E., & Brandelli, A. (2016). Total Polyphenols , Antioxidant , Antimicrobial and Allelopathic Activities of Spend Coffee Ground Aqueous Extract. *Waste Biomass Valor*, 0–3.  
doi:10.1007/s12649-016-9575-4

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., y Yoga, L. L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *Institute for Research in Molecular Medicine*, 8(1), 1–10.

Secretaria de Economía (2012). Recuperad de [http://www.2006-2012.economia.gob.mx/files/Monografia\\_Aguacate.pdf](http://www.2006-2012.economia.gob.mx/files/Monografia_Aguacate.pdf)

Sepúlveda, J. G., Porta, D. H., y Rocha, S. M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx>

SIAP (2017). Atlas agroalimentario. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>

- Suárez, J., y Martín, G. J. (2010). Producción de agroenergía a partir de biomasa en sistemas agroforestales integrados: una alternativa para lograr la seguridad alimentaria y la protección ambiental. *Pastos Y Forrajes*, 33(3), 1–19.
- Thi, N. B. D., Kumar, G., y Lin, C.-Y. (2015). An overview of food waste management in developing countries: Current status and future perspective. *Journal of Environmental Management*, 157, 220–229.  
doi: 10.1016/j.jenvman.2015.04.022
- Valenzuela, B. A., Sanhueza, J., y Nieto, S. (2003). Natural antioxidants in functional foods : from food safety to health benefits. *Grasas y aceites*, 54, 295–303.
- Verde-Star, M. J., García-González, S., y Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (Eds). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40.
- Vilela, A. E., González-Paleo, L., y Ravetta, D. A. (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas : mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral*, 317–327.
- Villavicencio-Nieto, M.A., y Pérez-Escandón, B. E. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*, 193–238.
- Vivas, V. F. E., Castro, C. R. L., Macías, M. D, y Rosado, G. P. (2017). Elaboration of Essential Oil from the Oregano for Medicinal Use Sheet. *International Journal of Physical Sciences and Engineering*, 1(1), 81–87.  
doi:10.21744/ijpse.v1i1.22

Vojvodić, A., Komes, D., Vovk, I., Belščak-Cvitanović, A., y Bušić a, A. (2016). Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food Research International*.

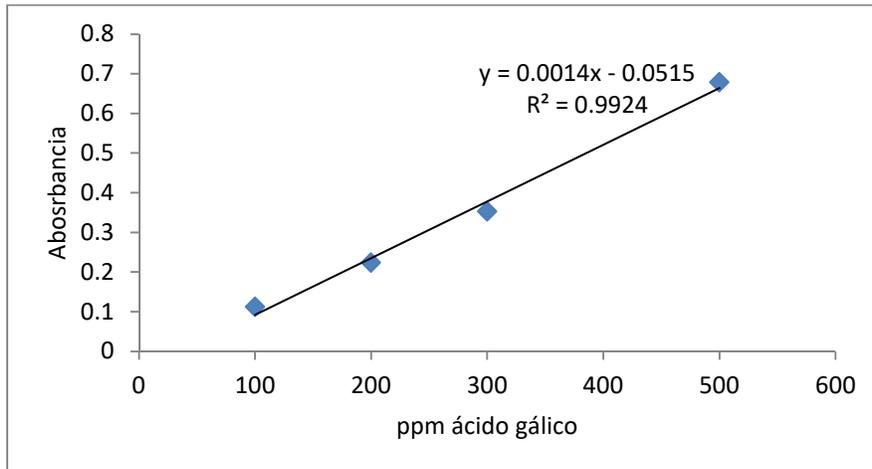
doi:10.1016/j.foodres.2016.07.02

Waterman, P. G., y Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites: Methods in Ecology. *Blackwell Scientific Publications*. Boston, 238 pp.

## ANEXOS

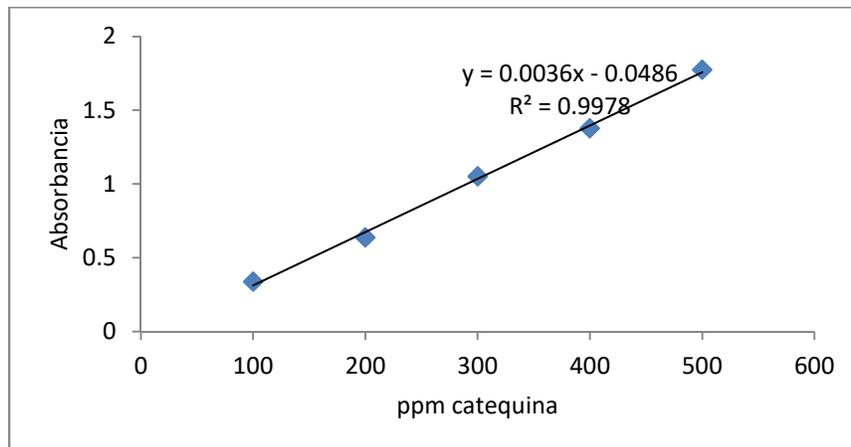
### Anexo 1

Curva de calibración de ácido gálico realizada para la evaluación de la concentración de fenoles.



### Anexo 2

Curva de calibración de catequina para la determinación de flavonoides totales.



## Anexo 3

Curva de calibración de Trolox para evaluar la actividad antioxidante respecto al radical ABTS.

