



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**RESIDUOS DEL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ COMO UNA ALTERNATIVA
PARA PRODUCIR EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA:
VALORACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO***

TESIS

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

ALVARADO AMBRIZ SINAI

Codirección:

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

Asesor:

Dra. Landy Hernández Rodríguez

México, Ciudad de México, diciembre de 2020.



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT con nivel de competencia internacional, referencia 001466.

Ciudad de México, México a 27 de enero de 2021

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**RESIDUOS DEL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ COMO UNA ALTERNATIVA
PARA PRODUCIR EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA:
VALORACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO***

Que presentó

Alvarado Ambriz Sinai

Comité tutorial

CoDirector: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana _____

CoDirectora: Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros
Universidad Autónoma Chapingo _____

Asesor: Dra. Landy Hernández Rodríguez
Universidad Autónoma Chapingo _____

Comité de evaluación

Presidente: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana _____

Secretario: Dra. Landy Hernández Rodríguez
Universidad Autónoma Chapingo _____

Vocal: Dra. Lizette Liliana Verástegui Rodríguez
Universidad Autónoma Metropolitana _____

Vocal: Dra. Ofelia Sandoval Castilla
Universidad Autónoma Chapingo _____

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por enseñarme que después de la tempestad viene la calma, y estar presente siempre en mi camino profesional, académico y personal.

A mi virgen de Juquila, San Ramon Onato y Santo Toribio Obispo de Astorga que iluminaron mi mente y mi camino en los momentos críticos y de mayor dificultad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por abrirme sus puertas para poder desarrollar y culminar mi última etapa de formación académica.

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme desenvolver parte de mi fase experimental en sus instalaciones, pero sobre todo por darme la formación inicial en el camino de mi profesión.

A mi madre, la Sra. Ma. Isabel Ambriz Balcázar, por ser el mejor ejemplo de constancia y perseverancia, así como todo su apoyo para que culmine esta etapa.

A mi novio, Enrique Duran Ibarra por estar presente en esta gran etapa, por animarme, comprenderme y ayudarme a culminar este proyecto.

A el Dr. Jaime Vernon Carter, por compartir su conocimiento y su profesionalismo, pero sobre todo por la paciencia y enseñanza a lo largo de este proceso.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por el tiempo invertido para el desarrollo de este proyecto, pero sobre todo por toda la riqueza de conocimientos que me ha obsequiado en este corto pero valioso caminar en la investigación.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez, porque además de caminar conmigo en lo profesional enriqueciéndome con sus conocimientos, lo hizo en lo personal enriqueciéndome con su amistad.

A el jurado examinador, por su ardua labor en la revisión y evaluación del presente trabajo.

DEDICATORIAS

“El mayor placer de la vida, es hacer lo que la gente te dice que no eres capaz de hacer”

A mi madre Ma. Isabel Ambriz Balcázar por ayudarme a surfear todos los obstáculos y darme siempre su tiempo y su amor incondicional.

A mis hermanas Dinora y Jessica, que estuvieron hasta el final junto a mí en este caminar, y con su ejemplo me han demostrado a no desistir nunca.

A mis sobrinos, José, Andrik y Camila, quienes cuando pensé en rendirme me enseñaron que alguien seguía mis pasos.

Para Enrique Duran Ibarra, el hombre con el que quiero construir mi futuro, TE AMO.

A mi segunda familia Ramírez Sandoval, por demostrarme que siempre puedo dar más de lo que creo y que estoy donde debo estar y con quien debo estar.

A la familia Duran Ibarra, por recibirme en su casa como un integrante más de su familia y enseñarme que siempre se puede llegar más allá del sol y de la luna.

A la Dra. Blanca Hernández que siempre tuvo para mí la palabra correcta, en el momento correcto.

A Sandra, Anahí, Lupita, Nancy, Diana Edith y Landy porque más que amigas han sido hermanas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Importancia de los residuos agroindustriales en el sector agroindustrial	3
2.2. El cultivo del café	3
2.2.1. Procesamiento del café	4
2.2.2. Características fitoquímicas del café	4
2.3. Extracción	5
2.3.1. Extracción asistida por ultrasonido	5
2.4. Compuestos fenólicos	5
2.4.1. Fenol	6
2.5. Actividad antioxidante	6
2.5.1. Antioxidante	6
2.5.2. Potencial antioxidante	6
2.5.3. Mecanismos de acción de los antioxidantes	6
2.5.4. Medición de la actividad antioxidante	8
2.6. Actividad antifúngica de los compuestos fenólicos presentes en los extractos	9
2.6.1. Modo de acción de los compuestos fenólicos contra diferentes hongos patógenos	10
2.7. Cultivo de la fresa	10
2.7.1. <i>Aspergillus niger</i>	11
2.7.2. <i>Botrytis cinerea</i>	11
2.7.3. <i>Rhizopus stolonifer</i>	12

III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos particulares	15
V. HIPÓTESIS.....	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1. Materiales.....	18
6.2. Metodología.....	18
6.2.1. Análisis químico proximal.....	18
6.2.2. Obtención del extracto	18
6.2.3. Caracterización del extracto	19
6.2.4. Cepas de hongos	23
6.2.5. Actividad antifúngica in vitro	23
6.2.6. Actividad antifúngica in vivo	25
6.3. Análisis estadístico	26
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1. Análisis químico proximal	27
7.2. Caracterización del extracto	27
7.2.1. Efecto de la sonicación	27
7.2.2. Contenido fenólico total y actividad antioxidante.....	31
7.2.3. Contenido total de flavonoides y taninos totales	32
7.2.4. Determinación de compuestos fenólicos y nitrogenados	33
7.3. Actividad antifúngica in vitro	35
7.4. Actividad antifúngica in vivo.....	37
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. REFERENCIAS	43
X. ANEXO	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH).....	7
Figura 2. Mecanismo de transferencia de un solo electrón (TSE).....	7
Figura 3. Mecanismo de quelación de metales de transición (QMT).....	8
Figura 4. Reacción del radical DPPH en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo DPPH.....	8
Figura 5. Reacción del radical ABTS en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo ABTS.....	9
Figura 6. Protocolo experimental empleado para el desarrollo de la presente investigación.	17
Figura 7. Efecto de las variables de extracción amplitud y tiempo de sonicación sobre: (a) contenido fenólico total (mg de equivalentes de ácido gálico/g) y (b) actividad antioxidante DPPH (μmol de equivalentes de Trolox/g).....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de varianza multifactorial del contenido fenólico total y la actividad antioxidante DPPH de los extractos obtenidos a partir de los residuos del beneficio húmedo del café.	29
Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos y nitrogenados en el extracto seleccionado a partir de los residuos del beneficio húmedo del café (EWCW) mediante HPLC.....	34
Tabla 3. Inhibición del crecimiento de hongos por EWCW en difusión en disco.	38
Tabla 4. Efectos de las diferentes concentraciones del extracto (EWCW) sobre la inhibición del crecimiento micelial.	39
Tabla 5. Efectos de las diferentes concentraciones del extracto (EWCW) sobre la germinación de esporas (%).	40

RESUMEN

Los residuos generados por el proceso de beneficio húmedo del café (WCW) se componen principalmente de pulpa y cáscara de café, y escasamente se han estudiado y reutilizado. Entonces, el objetivo de este trabajo fue investigar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de un WCW extracto etanólico (EWCW) obtenido por ultrasonido (amplitud 70%, tiempo de sonicación 45 min). EWCW tuvo un contenido fenólico total de 33.8 mg equivalentes de ácido gálico/g y una actividad antioxidante de 1790.1 μmol equivalentes de Trolox/g. EWCW mostró una potente actividad antifúngica *in vitro* contra *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, y *Rhizopus stolonifer* equivalente o superior a aquella del fungicida sintético comercial carbendazim. Fresas fueron heridas e inoculadas con los tres hongos para ensayos *in vivo*. Después de 5 días de inoculación, el porcentaje de heridas que presentaron crecimiento de moho fue de 16.7% (400 $\mu\text{g/mL}$ de EWCW) y 38.2% (1000 $\mu\text{g/mL}$ de carbendazim) para *A. niger*, 36.1% para *B. cinerea* y 50.12% para *R. stolonifer* (2000 $\mu\text{g/mL}$ de EWCW) en comparación con 38.2% y 51.2% (1000 $\mu\text{g/mL}$ de carbendazim), respectivamente. La actividad antifúngica eficiente de EWCW puede atribuirse principalmente a sus compuestos mayoritarios ácido clorogénico (14.19 mg/g) y ácido cafeico (1.18 mg/g), los cuales representaron el 89.83% de los compuestos identificados.

Palabras clave: residuos del beneficio húmedo del café, extracto etanólico; actividad antioxidante; actividad antifúngica *in vitro*; actividad antifúngica *in vivo*.

ABSTRACT

Wet coffee waste (WCW) generated by the wet processing of coffee, is mainly made up of coffee pulp and husk, and has been scarcely studied and reutilized. Therefore, the aim of this work was to investigate the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of an WCW ethanolic-extract (EWCW) obtained by ultrasonication (amplitude 70%, sonication time 45 min). EWCW had total phenolic content of 33.8 mg gallic acid equivalents/g and antioxidant activity of 1790.1 μmol Trolox equivalents/g. EWCW showed a potent *in vitro* antifungal activity against *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* equivalent or superior to that of commercial synthetic carbendazim. Strawberries were wounded and inoculated with the three fungi for *in vivo* assays. After 5 d of inoculation, percentage of wounds presenting mold growth was of 16.7% (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EWCW) and 38.2% (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of carbendazim) for *A. niger*, and of 36.1% for *B. cinerea* and of 50.12% for *R. stolonifer* (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EWCW) compared to the 38.2% and 51.2% (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of carbendazim), respectively. The efficient antifungal activity of EWCW can be mainly attributed to its majoritarian compounds chlorogenic acid (14.19 mg/g) and caffeic acid (1.18 mg/g), which represented 89.83% of the identified compounds.

Keywords: wet coffee processing waste; ethanolic extract; antioxidant activity; *in vitro* antifungal activity; *in vivo* antifungal activity.

I. INTRODUCCIÓN

El café es un cultivo económicamente importante en todo el mundo, y es el producto más comercializado después del petróleo (Can *et al.*, 2019; Ramírez-Velasco *et al.*, 2016). Aproximadamente 55 países del mundo participan en la producción de café como parte de su producción agrícola primaria (Chanakya y Alwis, 2004), lo que lo convierte en uno de los principales sistemas alimentarios. Según datos de la Organización Internacional del Café (2020), la producción mundial de café verde en 2018 fue de 10.3 millones de toneladas; el procesamiento de esta fruta genera grandes cantidades de residuos como pulpa, cáscara, piel, entre otros (Esquivel y Jiménez, 2012), que representan aproximadamente el 50% del fruto total del café. El procesamiento húmedo del café (WCW) produce aproximadamente 29% de pulpa de café y 12% de cáscara, como subproductos con respecto a la cereza del café en general (peso seco) (Janissen y Huynh, 2018; Montoya *et al.*, 2020). Estos residuos sólidos sin un valor económico aparente generalmente se descartan impactando negativamente el medio ambiente. La reutilización de residuos ha recibido mucha atención recientemente, ya que se considera una fuente potencial de beneficios económicos y sociales, y una forma de contribuir a la mitigación de la contaminación ambiental (Ghosh *et al.*, 2017). La presencia de fitoquímicos y antioxidantes en el café y sus beneficios para la salud se han informado en muchos estudios en los últimos años (Magalhães *et al.*, 2016; Martínez-Ruiz *et al.*, 2018), por lo que se espera que se puedan obtener subproductos valiosos de WCW constituido principalmente por pulpa de cereza de café (Montoya *et al.*, 2019; Mussatto *et al.*, 2011), la cual contiene cantidades considerables de compuestos fenólicos y de cafeína (Heeger *et al.*, 2017). Los compuestos fenólicos tienen una variedad de actividades fisiológicas, como antioxidante, antimicrobiana, antimutagénica, antiinflamatoria y antialérgica (Martins *et al.*, 2011), y actualmente se usan en los campos de la biología, la medicina, y la alimentación, entre otros. Por lo tanto, obtener productos de valor agregado a partir de residuos es un tema de investigación en curso, y hacerlo de manera

competente es de suma importancia para obtener buenos rendimientos y calidad de recuperación. En este sentido, las técnicas de extracción asistida por microondas (Yang y Zhai, 2010), asistida por ultrasonido (Pan *et al.*, 2012) y fluido supercrítico (Liu *et al.*, 2011) han demostrado ser eficientes para la recuperación de compuestos fenólicos. Varios estudios han mostrado que la extracción asistida por ultrasonido es la técnica más eficiente entre las técnicas de extracción específicas (Chen *et al.*, 2012; Al-Dhabi *et al.*, 2017; Vinatoru *et al.*, 2017). Asimismo, varios estudios han informado sobre la actividad potencial de los extractos de plantas contra el ataque de hongos en frutas postcosecha con vida útil corta (Feliziani y Romanazzi, 2016; de Rodríguez *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019). Además, se ha descubierto que estos extractos representan una amenaza menos peligrosa para la salud humana y el medio ambiente que los pesticidas químicos (Masood *et al.*, 2015). Los informes han demostrado que los compuestos de origen vegetal son adecuados como bioplaguicidas (Suleiman y Yusuf, 2011). La fresa (*Fragaria spp.*) es una fruta altamente perecedera, incluso en condiciones ideales de almacenamiento a 4 °C, perdiendo su calidad comestible en una semana (Wills y Kim, 2000). Su epidermis turgente y su alta tasa de respiración lo hacen susceptible al daño mecánico y a la invasión por hongos patógenos. Entre los hongos patógenos, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum acutatum* y *Phytophthora cactorum* son de gran importancia (Khalid *et al.*, 2017). Esto abre el camino para explorar, por primera vez, las posibles propiedades antifúngicas de los extractos de WCW para controlar las enfermedades fúngicas postcosecha de la fresa.

Con base en lo anterior, los objetivos de este estudio fueron: (a) determinar las condiciones de sonicación (amplitud y tiempo) que produzca el contenido fenólico total más alto y la actividad antioxidante por DPPH más elevada en los extractos; y (b) evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de los extractos de desechos de café de procesamiento húmedo contra *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*.

II. ANTECEDENTES

2.1. Importancia de los residuos agroindustriales en el sector agroindustrial

En México, los residuos del sector agroindustrial y otros se definen en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) como aquellos materiales o productos cuyo propietario o poseedor desecha, que se encuentran en estado sólido o semisólido, líquido o gaseoso y que se contienen en recipientes o depósitos; mismos que pueden ser susceptibles a ser valorizados o requieren sujetarse a tratamiento o disposición final conforme a lo dispuesto en la misma Ley (DOF, 2018).

En la actualidad una de las principales problemáticas de las diferentes actividades agroindustriales es la generación excesiva de residuos, los cuales tienen un importante impacto ambiental, como la excesiva producción de aguas residuales con alta carga orgánica, nutrientes sólidos en suspensión y la generación de altas cantidades de residuos sólidos, en su mayoría de carácter biodegradable, a los que se les puede dar una revaloración para su aprovechamiento en otros sectores (Singh *et al.*, 2017).

2.2. El cultivo del café

El cultivo de café es uno de los productos agrícolas más importantes a nivel mundial; aproximadamente 55 países del mundo participan en la producción del mismo como parte de su producción agrícola primaria (Chanakya y Alwis, 2004), lo que lo convierte en uno de los principales sistemas alimentarios. Según datos de la Organización Internacional del Café (2020), la producción mundial de café verde en 2018 fue de 10.3 millones de toneladas, por lo que el procesamiento de esta fruta genera grandes cantidades de desechos como pulpa, cáscara, piel, entre otros, convirtiendo al café en uno de los productos con mayor generación de desechos sólidos.

2.2.1. Procesamiento del café

El procesamiento del café comienza con la eliminación de los componentes externos de la cereza del mismo y existen dos métodos básicos: el beneficio seco y el beneficio húmedo (Janissen y Huynh, 2018, Murthy y Naidu, 2012).

Beneficio húmedo del café

El beneficio húmedo del café incluye el despulpado, la fermentación, el lavado y el secado del grano. El objetivo final de este método es asegurar la eliminación completa del mucilago de la cubierta del grano (café pergamino) para la producción de café de alta calidad (Murthy y Naidu, 2012). La pulpa y la cáscara son los primeros residuos que se obtienen durante el beneficio húmedo del café y representan el 29% y el 12% del peso seco de la baya entera y son esencialmente ricas en carbohidratos, proteínas y minerales (especialmente potasio), además de presentar cantidades apreciables de taninos, polifenoles y cafeína (Janissen y Huynh, 2018).

2.2.2. Características fitoquímicas del café

La presencia de fitoquímicos y antioxidantes en el café y sus beneficios para la salud se han informado en muchos estudios en los últimos años (Magalhães *et al.*, 2016; Martínez-Ruiz *et al.*, 2018). Diversos autores reportan la presencia de diferentes compuestos fenólicos en el grano de café en verde, principalmente ácidos hidroxicinámicos, específicamente al menos cinco grupos principales de isómeros del ácido clorogénico, los cuales son compuestos fenólicos formados por la esterificación de ácidos quinólicos con ácidos cinámicos tales como el ácido cafeico, ferúlico, o el ácido para-cumárico (Regazzoni *et al.*, 2016, Shahidi y Ambigaipalan, 2015). Chu *et al.* (2008) determinaron la presencia de catequina, rutina, ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido cafeico, y ácido protocatechuico en café mediante electroforesis capilar.

Por lo tanto, sería de gran interés una valorización de los residuos generados durante el beneficio húmedo de este cultivo, basada en su posible composición fenólica, y por consecuencia una alta actividad antioxidante y/o antifúngica.

2.3. Extracción

La extracción de los diferentes compuestos bioactivos del café se ha investigado utilizando diferentes disolventes y técnicas. Por lo general, se emplean disolventes polares moderados, como metanol, etanol o isopropanol, a veces mezclados con agua, entre otros (Torres-Valenzuela *et al.*, 2020). Las técnicas incluyen extracción convencional sólido-líquido (Mussatto *et al.*, 2011;), extracción Soxhlet (Murthy y Naidu, 2012), extracción asistida por ultrasonido (Torres -Valenzuela *et al.*, 2020), entre otros.

2.3.1. Extracción asistida por ultrasonido

Al-Dhabi *et al.* (2017) mencionaron que la extracción asistida por ultrasonido es la técnica más eficiente entre las técnicas de extracción mencionadas. Esto debido a que es una técnica simple, rápida, de bajo costo y efectiva, con alta reproducibilidad y alta eficiencia de extracción en un tiempo mínimo. El mecanismo de sonicación se atribuye principalmente a la cavitación tras la proliferación de ondas acústicas (Wang *et al.*, 2008), lo cual da como resultado el colapso de la matriz del material y mejora la tasa de recuperación de compuestos fenólicos de la matriz del material al disolvente (Vinatoru *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2008).

2.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos bioactivos que comprenden un grupo diverso de metabolitos secundarios presentes en plantas superiores (Labbe *et al.*, 2016; Leopoldini *et al.*, 2011). El término compuestos fenólicos abarca aproximadamente 8000 compuestos de origen natural, todos con una característica estructural común, un fenol (Leopoldini *et al.*, 2011).

2.4.1. Fenol

El fenol es la molécula básica de los compuestos fenólicos, los cuales se componen principalmente de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH) (Leopoldini *et al.*, 2011, Singh *et al.*, 2017). La presencia del anillo aromático hace que los ácidos débiles, generen un efecto inductivo en el hidrógeno del grupo hidroxilo (Rice-Evans *et al.*, 1997), lo que le permite convertirse en un compuesto con una potencial actividad antioxidante.

2.5. Actividad antioxidante

2.5.1. Antioxidante

Un antioxidante es aquella molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (entendida como pérdida de uno o más electrones) de algunas otras moléculas, las cuales son generalmente ciertos sustratos biológicos (Fennema y Tannenbaum, 1985, Lobo *et al.*, 2010).

2.5.2. Potencial antioxidante

El potencial antioxidante de los diferentes compuestos fenólicos depende principalmente del número y la disposición de los grupos hidroxilo unidos al anillo aromático (Apak *et al.*, 2016).

2.5.3. Mecanismos de acción de los antioxidantes

Los mecanismos de acción de los antioxidantes se han clasificado en tres sistemas principales: la neutralización de los radicales libres mediante la transferencia de un átomo de hidrogeno (TAH) y/o mediante la transferencia de un sólo electrón (TSE) y la neutralización de catalizadores prooxidantes mediante la quelación de metales de transición, lo que conduce a complejos compuestos (Zeb, 2020).

Transferencia de átomos de hidrógeno

En TAH, el antioxidante que contiene un átomo de H representado por ArOH reacciona con los radicales libres (R), transfiriéndole un átomo de hidrógeno, mediante la ruptura homolítica del enlace O-H. El radical libre se estabiliza para formar una especie neutra (RH), mientras que el antioxidante se convierte en antioxidante radical libre (ArO) (Leopoldini et al., 2011) (Fig. 1). La donación de un átomo de hidrógeno por un antioxidante se explica por el potencial de reducción (Zeb, 2020).

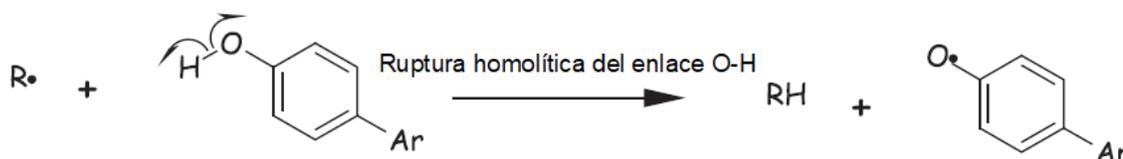


Figura 1. Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH). (Fuente: Leopoldini et al., 2011).

Transferencia de un solo electrón

En el mecanismo de transferencia de un solo electrón (TSE), el R (anión) formado es una especie energéticamente estable que tiene un número par de electrones, mientras que ArOH (el radical catiónico) es una especie de radical menos reactiva y, por lo tanto, estable (Leopoldini et al., 2011). El número impar de electrones formado por las reacciones con el radical en ArOH^{•+} es una estructura de anillo aromático que posee la posibilidad de distribuirse por toda la molécula (Rhile et al., 2006). Esto da como resultado una estabilización radical de la molécula antioxidante (Fig. 2).

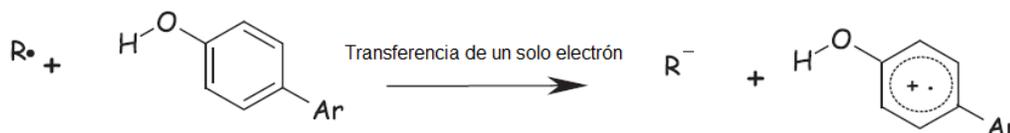


Figura 2. Mecanismo de transferencia de un solo electrón (TSE) (Fuente: Leopoldini et al., 2011).

Quelación de metales de transición

La quelación de metales de transición es una de las funciones antioxidantes que puede desempeñar un compuesto fenólico. Diversos estudios han demostrado que los metales de transición quelados por los polifenoles forman productos estables, en forma de complejos estables (Van Acker *et al.*, 1996, Zeb, 2020).

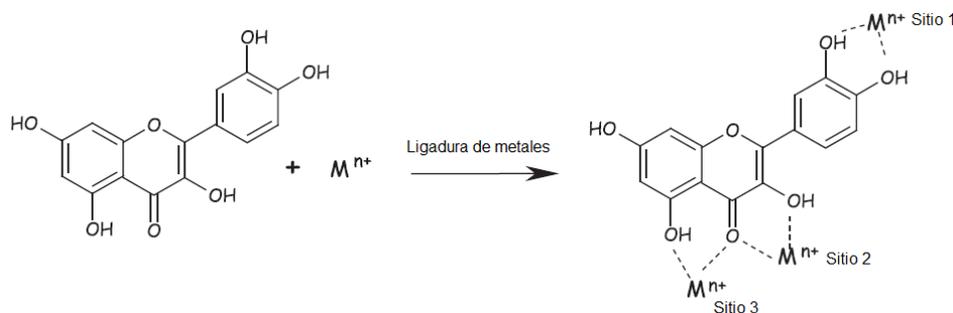


Figura 3. Mecanismo de quelación de metales de transición (QMT) (Fuente: Leopoldini *et al.*, 2011).

2.5.4. Medición de la actividad antioxidante

Determinación de la actividad inhibitoria del radical 1,1- Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

La base de este método es la cuantificación de la capacidad que tiene un compuesto antioxidante para reducir el radical DPPH en 2,2-difenil-hidrazina (DPPH-H) o análogos de hidrazina sustituidos, al donar átomos de hidrógeno o electrones que reaccionan con el radical (Fig. 4) (Alam *et al.*, 2013).

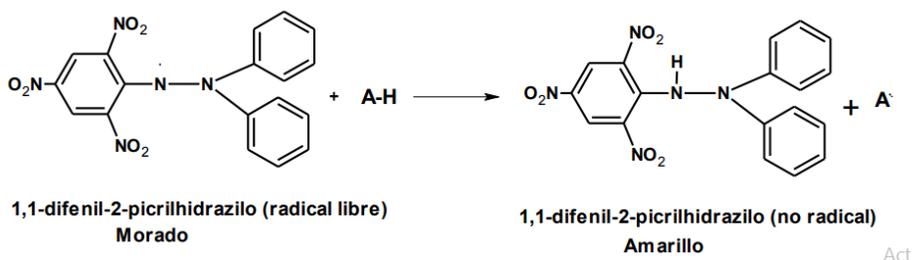


Figura 4. Reacción del radical DPPH en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo DPPH (Fuente: Alam *et al.*, 2013).

Determinación de la actividad inhibitoria del catión radical del ácido 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)

El método del radical ABTS se basa en la inhibición del radical catión $ABTS^{\bullet+}$ en comparación con un antioxidante estándar de referencia (Fig. 5) (Zulueta *et al.*, 2009).

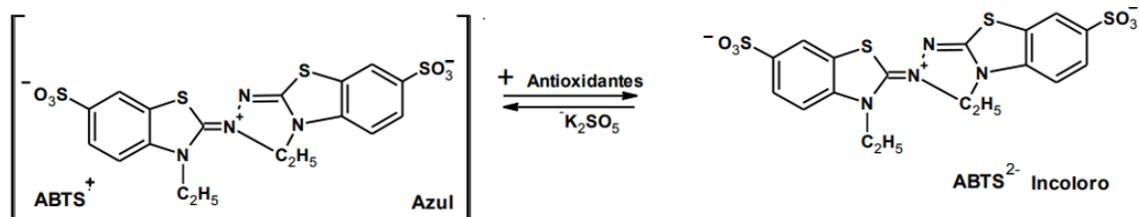


Figura 5. Reacción del radical ABTS en presencia del compuesto antioxidante durante el ensayo ABTS (Zulueta *et al.*, 2009).

Determinación del poder antioxidante reductor del hierro

Este método mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el hierro férrico. Se basa en la reducción del complejo de hierro férrico y cloruro de 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno (TPTZ) a la forma ferrosa a pH bajo (Lepoldini *et al.*, 2011).

2.6. Actividad antifúngica de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

Por otra parte, el interés por los extractos obtenidos a partir de plantas, como el café, ha aumentado en los últimos años debido a su probada actividad antioxidante y a la evidencia de otras propiedades biológicas como aquellas antimicrobianas y antifúngicas.

En el desarrollo de la cadena agroalimentaria, las frutas y las hortalizas se ven afectadas por la incidencia de enfermedades provocadas principalmente por hongos durante la etapa postcosecha (de Rodríguez *et al.*, 2017).

En algunos casos, los hongos permanecen latentes o se adquieren durante la cosecha, el transporte y/o manipulación del producto (Ogden et al., 2005).

Por ejemplo, la podredumbre por *Aspergillus* y *Rhizopus* o el moho de *Botrytis* aparecen durante la postcosecha, produciendo altas pérdidas (Hahn, 2002). Estos hongos son la principal causa de enfermedades en cultivo de fresa (Feliziani y Romanazzi, 2016).

2.6.1. Modo de acción de los compuestos fenólicos contra diferentes hongos patógenos

Diversos autores mencionan modos de acción distintos de los compuestos fenólicos contra algunos hongos patógenos (Elfirta *et al.*, 2018; Sung y Lee, 2010), entre los que destacan los siguientes:

- Inhibición de la formación de la pared celular, mediante la inhibición de la síntesis de los glucanos y la quitina.
- Disrupción de la membrana celular por la inhibición de la síntesis del ergosterol, lo cual causa la perturbación de las bicapas lipídicas de la membrana, provoca la fuga de iones y otros materiales, así como la formación de poros y disipación del potencial eléctrico de la membrana.
- Difusión de las mitocondrias fúngicas, mediante la inhibición en el transporte de los electrones mitocondriales, induciendo la reducción de ATP y como consecuencia causa la muerte celular.
- Inhibición de la división celular, producida por la inhibición de la polimerización de los microtubos.

2.7. Cultivo de la fresa

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es la baya más consumida a nivel mundial, con una producción anual global superior a 9 millones de toneladas en los últimos años (FAOSTAT, 2017). México es uno de los más grandes productores de fresa en el mundo y ocupa el tercer lugar en la exportación de esta fruta (SAGARPA, 2018).

Sin embargo, este cultivo presenta elevadas pérdidas durante la postcosecha, alcanzando hasta 89% de la producción total (Li *et al.*, 2019).

Las principales causas de descomposición de la fruta de fresa durante el almacenamiento y la vida útil es el desarrollo de pudriciones causadas por una variedad de hongos, entre los que destacan *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, entre otros (Feliziani y Romanazzi, 2016).

2.7.1. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo filamentoso septado, aeróbico y heterótrofo, formado por hifas hialinas tabicadas fértiles, micelios de coloración débil y una textura aterciopelada y se reproduce por vía asexual a través de la producción de conidios rugosos con bandas pigmentadas (Kozakiewicz y Smith, 1994). *A. niger* es considerado uno de los hongos causantes de la pudrición negra, una enfermedad postcosecha que invade y destruye el tejido vegetal de la fresa (Feliziani y Romanazzi, 2016; Hussein *et al.*, 2020); además este hongo tiene la capacidad de producir micotoxinas específicas denominadas aflatoxinas, relacionadas con problemáticas de salud (Guédez *et al.*, 2009). *A. niger* se desarrolla en un rango de temperatura entre 6 y 47 °C, ubicándose en 37 °C la temperatura óptima de crecimiento y una actividad de agua de 0.85 (Hussein *et al.*, 2017).

2.7.2. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea es un hongo filamentoso, haploide, necrotrófico y heterotálico perteneciente a la familia *Sclerotinicaeae*, específicamente en la división Ascomycota (Aqueveque *et al.*, 2017). Se trata de un hongo con micelio tabicado, ramificado y septado, de color gris oscuro y apariencia algodonosa y se caracteriza principalmente por la producción de un gran número de esporas asexuales o conidios ovalados agrupados en formas de racimos que se sitúan en el extremo de los conidióforos (Elad y Stewart, 2007). Los conidios son las principales estructuras de dispersión y reproducción del hongo (Elad *et al.*, 2004).

Prospera de manera efectiva en un rango de temperatura entre 0 y 30 °C, ubicándose en 22° C la temperatura óptima de crecimiento (Aqueveque *et al.*, 2017) y una actividad de agua de 0.93 (Feliziani y Romanazzi, 2016).

Entre los patógenos postcosecha de la fresa, *B. cinerea* se considera el más común e importante (Feliziani y Romanazzi, 2016). Al comienzo de la infección, se ve un área circular oscura donde el tejido de la fruta es más suave que la otras partes. Posteriormente, puede desarrollarse abundante esporulación desde el sitio de la infección, cuyo color varía de blanco a gris, dependiendo de la exposición a la luz. A menudo, *B. cinerea* puede transmitirse de frutos podridos a sanos cercanos (Feliziani y Romanazzi, 2016).

2.7.3. *Rhizopus stolonifer*

Rhizopus stolonifer es un hongo filamentoso cosmopolita perteneciente a la familia Mucoraceae, perteneciente a la clase zygomycota; posee un micelio no septado, color blanco y con apariencia algodonosa (Elad *et al.*, 2004). Su reproducción se da de forma asexual mediante las esporangiosporas y de forma sexual mediante hifas vegetativas denominadas como zigosporas (Elad y Stewart, 2007). El rango de temperatura para su crecimiento es entre 10 y 33 °C, ubicándose en 25° C la temperatura óptima de crecimiento; así como una actividad de agua de 0.94 (Hussein *et al.*, 2017). *R. stolonifer* es el agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda principalmente en fresa, melocotón y melón y se considera uno de los hongos de más rápido crecimiento y más destructivos.

Durante el primer día de la infección por pudrición blanda, la superficie de la fresa puede cubrirse con estructuras fúngicas delgadas, esponjosas y parecidas al algodón. Finalmente, la esporulación forma una masa oscura con esporangios negros en sus puntas, que pueden cubrir toda la superficie de la fruta (Bautista *et al.*, 2014). Sin embargo, el síntoma principal de la pudrición blanda es la delicuescencia de los tejidos de la fresa, que pierden su consistencia, se empapan en agua y exudan un lixiviado. De hecho, la infección por *R. stolonifer* está estrechamente asociada con las actividades enzimáticas de sus

poligalacturonasas, que pueden degradar las laminillas medias de las células vegetales. Las poligalacturonasas y otras enzimas como la xilanasa, celulasa y amilasa son enzimas maceradoras que suavizan los tejidos de la fruta. El percolado que se genera durante la degradación de las laminillas medias es particularmente peligroso para la dispersión de conidios patógenos dentro de paquetes que contienen frutos de fresa después de la cosecha (Bautista *et al.*, 2014, Feliziani y Romanazzi, 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de café es uno de los más importantes económicamente a nivel mundial. Como subproductos del beneficio húmedo de este cultivo se generan volúmenes elevados de cascarilla y pulpa (WCW). Hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre el posible potencial de estos desechos agroindustriales como fuente de compuestos fenólicos, como los ácidos clorogénicos, propios del café. Se ha informado que extractos de compuestos fenólicos constituyen alternativas a agentes antioxidantes y fungicidas sintéticos; llamando la atención estos últimos para su uso en la conservación de frutos. Uno de los principales retos para el desarrollo del cultivo comercial de fresa e incluso en la postcosecha de la fruta, es el manejo de las enfermedades que en su gran mayoría son de carácter fungoso. *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* son conocidos como los principales hongos destructivos durante el desarrollo del cultivo y en la postcosecha, ocasionando graves pérdidas económicas. Para contrarrestar este problema, comúnmente se utilizan productos químicos sintéticos; no obstante, se ha demostrado que dichos productos representan riesgos para la salud y que los microorganismos se hacen resistentes a su acción. Así, resulta interesante obtener extractos a partir de WCW ricos en compuestos fenólicos y explorar sus propiedades antifúngicas *in vitro* e *in vivo* en fresa.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar las condiciones de sonicación (amplitud y tiempo) que rindan el extracto con mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante por DPPH, y evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* del extracto contra *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*.

4.2. Objetivos particulares

- a) Establecer la amplitud y el tiempo de sonicación para la obtención del extracto (EWCW) a partir de los desechos del beneficio húmedo del café (WCW) con el mayor contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante por DPPH más elevada.
- b) Caracterizar el EWCW por su contenido de fenoles, flavonoides y taninos totales.
- c) Determinar la actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) del EWCW.
- d) Cuantificar en el EWCW, sus contenidos de los ácidos clorogénico, gálico, cafeico, ferúlico y protocatechuico, así como de aquellos de las sustancias nitrogenadas (trigonelina y cafeína), por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- e) Evaluar el potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* del EWCW.

V. HIPÓTESIS

Los residuos obtenidos a partir del beneficio húmedo del café son una alternativa potencial para la producción de extractos con una alta actividad antifúngica y antioxidante.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental para llevar a cabo la realización de este trabajo fue de acuerdo con el siguiente diagrama de flujo (Figura 6).

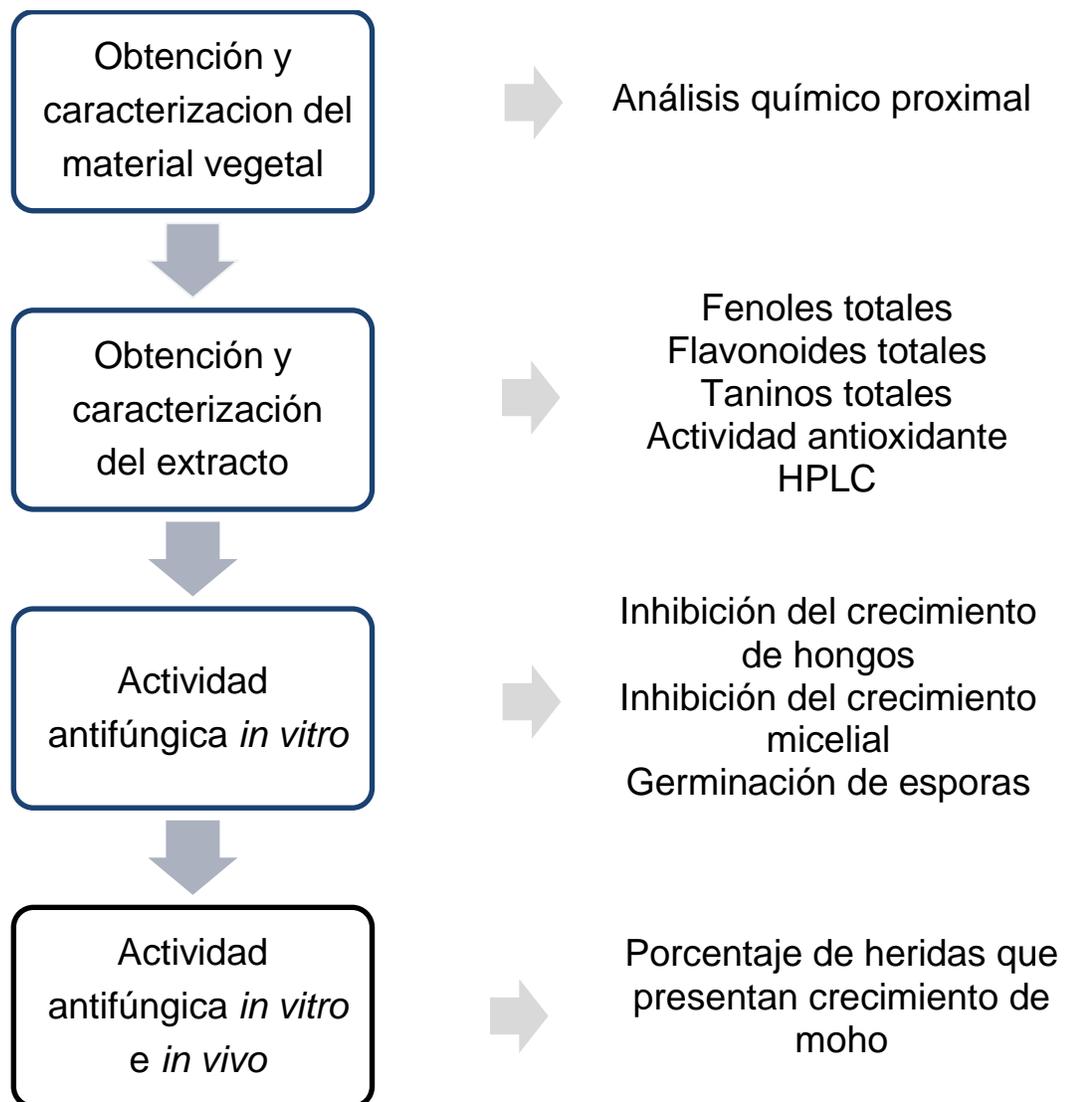


Figura 6. Protocolo experimental empleado para el desarrollo de la presente investigación.

6.1. Materiales

Los residuos (WCW) generados por el proceso de beneficio húmedo del café fueron proporcionados por el Centro Internacional de Capacitación de Cafecultura y Desarrollo Sustentable (CICADES A.C.), ubicado en la comunidad de Zacamitla, municipio de Ixhuatlán del Café en el estado de Veracruz con coordenadas 19°03'22.9" N y 96°55'03.2" W y una elevación sobre el nivel del mar de 1 343 m. La especie utilizada en el experimento fue *Coffee arabica*. Todos los reactivos usados fueron grado analítico: etanol fue obtenido de J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México), ácido gálico, trolox, reactivo de Folin, catequina, radical libre DPPH, ABTS y persulfato de sodio fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México). Finalmente, carbonato de calcio, nitrito de sodio, cloruro de aluminio, hidróxido de sodio fueron obtenidos en Química Laitz, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México), Toda el agua usada en los experimentos fue destilada.

6.2. Metodología

6.2.1. Análisis químico proximal

La humedad, proteína (N*6.25), grasa, ceniza y fibra de WCW se determinaron utilizando los métodos de la AOAC (2005). Se consideró que el porcentaje restante representaba los carbohidratos.

6.2.2. Obtención del extracto

WCW se secó a 50 °C en un horno de aire caliente HCF-62 (Riossa Digital, Ciudad de México, México) hasta un contenido de humedad final de 7 g H₂O/100 g (48 h), posteriormente se molió hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Se utilizó un experimento factorial 3² para determinar los efectos del tiempo de sonicación (15, 30, 45 min) y la amplitud (50, 60 y 70%) sobre el contenido total de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante por DPPH de los extractos. WCW seco (10 g) se mezcló en una relación sólido/líquido de 1/10 p/p con etanol/agua (70:30, v/v).

Posteriormente, se utilizó un procesador ultrasónico (modelo VCX 130 PB 500/750 W, con sonda de acero inoxidable de 13 mm de diámetro, Sonics and Materials, Inc., Newtown, CT, USA.) a una frecuencia de 20 kHz para sonicar las mezclas (100 mL). La sonicación se aplicó a las mezclas en periodos intermitentes de 5 min, seguidos de periodos de reposo de 5 min, hasta que el tiempo total de aplicación de sonicación efectiva se completó. Se utilizó un baño de agua helada para disipar el calor producido durante la sonicación (Al-Dhabi *et al.*, 2017). Los extractos se centrifugaron a 4000 ×g durante 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se concentró en un evaporador rotatorio a 40 °C y una presión de 40 mbar, se liofilizó (Lyophilizer Free Zone 2.5, Labconco, Corporation, MO, USA) y se almacenó a -18 °C hasta que se requirió. Diversos autores han señalado que los extractos con alta actividad antioxidante y alto contenido de compuestos fenólicos tienden a exhibir una alta actividad antifúngica (de Rodríguez *et al.*, 2017; Mirón-Mérida *et al.*, 2019); por esta razón se seleccionó el extracto (EWCW) con mayor contenido fenólico total y actividad antioxidante DPPH para los ensayos adicionales de actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*.

Asimismo, se determinaron para EWCW flavonoides, taninos totales, actividad antioxidante por ABTS y FRAP, y composición y contenido de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

6.2.3. Caracterización del extracto

Cuantificación de fenoles totales

El contenido fenólico total de las muestras se determinó por el método de Folin - Ciocalteu (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015). 100 µL del EWCW fueron mezclados con 125 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reaccionar durante 6 min. Después, la reacción se neutralizó con 1250 µL de solución saturada de Na₂CO₃ (19% p/v) y se ajustó a un volumen final de 3 mL con agua destilada.

La mezcla se agitó con vórtex y se almacenó en la oscuridad durante 90 min. La absorbancia de las muestras se midió a 760 nm (espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El contenido fenólico total se expresó en peso seco como miligramos de equivalentes de ácido gálico/g.

Cuantificación de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se analizó mediante el ensayo de cloruro de aluminio (Al-Dhabi *et al.*, 2017). Se diluyó un mL de muestra con 4 mL de agua destilada y 0.3 mL de solución de nitrito de sodio (5% p/v). La mezcla se incubó durante 5 min, después de lo cual se añadieron 0.150 mL de solución de cloruro de aluminio (10% p/v). Después de 5 min de reposo, se añadieron a la mezcla 2 mL de solución de hidróxido de sodio 1 M. La absorbancia se midió a 510 nm. El contenido total de flavonoides se expresó en peso seco como miligramos de equivalentes de quercetina/g.

Cuantificación de taninos totales

El contenido total de taninos se determinó mediante la prueba de yodato de potasio (Choi y Koh, 2017). Se mezclaron 5 mL de solución de KIO_3 al 2.5 %, precalentada durante 7 min a 30 °C, con 1 mL de EWCW diluido diez veces. Después, la mezcla se colocó en un baño de agua a 30 °C durante 2 min y se midió la absorbancia a 550 nm. El contenido total de taninos se expresó en peso seco como miligramos de equivalentes de ácido tánico/g.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó mediante el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), y el extracto con mayor contenido fenólico total y actividad antioxidante se seleccionó como EWCW. También se determinó la actividad antioxidante de EWCW utilizando los métodos del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y el poder antioxidante reductor férrico (FRAP).

- **Ensayo DPPH**

La actividad antioxidante se determinó de acuerdo con lo descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), empleando el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Se preparó una solución disolviendo 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol (solución de DPPH). Luego, 200 μ L de extracto de WCW (100 mg/mL disueltos en 70:30 v/v, etanol/agua) se añadieron a 2.8 mL de solución de DPPH. La absorbancia de las muestras se midió a 515 nm después de la incubación en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min.

Se obtuvo una concentración de Trolox frente a absorbancia de la curva estándar de DPPH (0.01 a 0.1 mM) y los resultados se expresaron en peso seco como moles de equivalentes de Trolox/g. La capacidad de extinción de DPPH se calculó como porcentaje de inhibición de la absorbancia de DPPH ($I_{DPPH}\%$), mediante la siguiente ecuación:

$$I_{DPPH}\% = \frac{(A_0 - A_n) \times 100}{A_0} \quad (2)$$

Donde A_0 es la absorbancia del blanco (solución DPPH) y A_n es la absorbancia de la solución de DPPH + Muestra.

- **Ensayo ABTS**

Se combinó una solución acuosa 7 mM de ABTS (50:50) con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio y se almacenó en la oscuridad durante 16 h para permitir la generación de radicales libres. La mezcla se diluyó con solución tampón de fosfato a 75 mM (pH = 7.4) hasta que la absorbancia a 734 nm fue 0.7 (Re *et al.*, 1999). Se añadió EWCW (200 μ L) a 2.8 mL de la solución madre de ABTS contenida en celdas espectrofotométricas y se midió la absorbancia después de la incubación en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 min (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015). Se obtuvo una curva estándar de Trolox (0.1 – 1.5 mM) y los resultados se expresaron en peso seco como moles de equivalentes de Trolox/g.

El porcentaje de inhibición de ABTS ($I_{ABTS}\%$) se calculó con una ecuación similar a la Eq. (2).

- **Ensayo FRAP**

Para el ensayo FRAP se siguió el método descrito por Donlao y Ogawa (2018). Para la preparación del reactivo FRAP, se mezcló tampón de acetato 300 mM (ajustado a pH 3.6); 2,4,6-tris (2-piridil) -1,3,5-triazina 10 mM en HCl 40 mM; y $FeCl_3$ 20 mM en una proporción de 10:1:1 (v/v), respectivamente. Se mezcló EWCW (200 μ L) con 1.3 mL de reactivo FRAP y se incubó a 37 °C durante 30 min en un baño de agua con temperatura controlada. La absorbancia se midió a 595 nm usando agua como blanco. El FRAP se expresó en peso seco como equivalentes molares de $FeSO_4/g$ seco.

6.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La composición de los compuestos fenólicos contenidos en EWCW (1 mg/mL de metanol) se determinó mediante análisis de la cuantificación de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como describen Hečimovic *et al.* (2011) utilizando un equipo de HPLC (Hewlett-Packard 1100, Palo Alto, CA, USA) provisto de una bomba cuaternaria, inyector automático, detector de matriz de diodos y estación de tratamiento de datos.

La separación se logró utilizando una columna C18 de fase inversa AQUA® (Phenomenex) (5 m, 150 mm 4.6 mm d.i.) a 35 °C. La fase móvil estuvo constituida de los compuestos ácido fórmico al 3% (disolvente A) y metanol de grado HPLC (disolvente B) (Merck, Darmstadt, Alemania). El caudal utilizado fue de 0.5 mL/min y el volumen de inyección fue de 5 μ L.

La elución se realizó con un gradiente comenzando con 2% de B para alcanzar el 32 % de B a los 20 minutos, el 40% de B a los 30 minutos y el 95% de B a los 40 min y volviéndose isocrático durante 5 min.

La detección se realizó a 278 nm. La identificación de los compuestos fenólicos se determinó comparando su tiempo de retención con los de los estándares (ácidos gálicos, clorogénico, protocatechuico, cafeico, ferúlico, trigonelina y cafeína; Sigma Aldrich, Toluca, Estado de México, México). Los resultados se expresaron como mg/g de EWCW.

6.2.4. Cepas de hongos

Aspergillus niger GH1, *Botrytis cinerea* G409 y *Rhizopus stolonifer* FC5 fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa (Ciudad de México, México), el Laboratorio de Micología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Ciudad de México, México) y el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma Chapingo (Texcoco, Estado de México, México), respectivamente, y utilizados como organismos objetivo en los diferentes ensayos antifúngicos. Los cultivos de cepas fúngicas se mantuvieron en agar dextrosa de papa (PDA) inclinados a 4 °C. Los cultivos madres se transfirieron a nuevos cultivos cada dos meses para evitar una disminución en la viabilidad de la cepa.

6.2.5. Actividad antifúngica *in vitro*

6.2.5.1.1.1. Prueba de difusión de placa

El propósito de la prueba de difusión en placa es el de determinar la sensibilidad o resistencia de las cepas de hongos a diversos compuestos antifúngicos.

Las cepas de hongos se cultivan en agar PDA en presencia de un disco de papel filtro impregnado con el compuesto antifúngico. La presencia o ausencia de crecimiento alrededor de los discos es una medida indirecta de la capacidad de ese compuesto para inhibir una cepa de hongo específica (Aqueveque *et al.*, 2017).

Discos de papel filtro (Whatman No 4; 6 mm de diámetro) fueron impregnados con 45 µL de EWCW en diferente concentración (400, 600, 1500 y 2000 µg/mL) y posteriormente colocados en placas Petri (5 cm de diámetro) con 20 mL de inóculo con hongos (10^6 esporas/mL). Se utilizó como control positivo el fungicida sintético carbendazim (1000 g/mL) (Derosal 500 SC®, 42.8 % carbendazim, Bayer de México, Ciudad de México, México).

Las placas se incubaron a 37 ± 2 °C para *Aspergillus niger*, 22 ± 2 °C para *Botrytis cinerea* y 25 ± 2 °C para *Rhizopus stolonifer* y se midió el halo de inhibición alrededor de los discos (cm) después de 72 h (Aqueveque *et al.*, 2017).

Inhibición del crecimiento micelial (%)

La actividad antifúngica del EWCW contra el crecimiento micelial de *A. niger*, *B. cinerea* y *R. stolonifer* se realizó de acuerdo con Aqueveque *et al.* (2017), con ligeras modificaciones. Se depositó EWCW (45 µL) a diferentes concentraciones (400, 600, 1500 y 2000 µg/mL) y se extendió uniformemente sobre la superficie de agar de las diferentes placas Petri. Se colocaron alícuotas (45 µL) de carbendazim (1000 µg/mL) en placas como control positivo. Trozos de micelio (0.5 cm de diámetro) extraídos de la periferia de cultivos de 5 días de *A. niger*, *B. cinerea* y *R. stolonifer* se colocaron boca abajo en el centro de cada placa. Se utilizaron placas de PDA sin EWCW o con carbendazim como controles negativos. Las placas se incubaron a 37 ± 2 °C (*A. niger*), 22 ± 2 °C (*B. cinerea*) y 25 ± 2 °C (*R. stolonifer*), respectivamente. El diámetro de cada colonia se midió a las 72 h. La inhibición del crecimiento micelial se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición del crecimiento micelial (\%)} = \frac{D_c - D_o}{D_c} * 100 \quad (2)$$

Donde D_c (cm) es el promedio del diámetro de las colonias en el control negativo y D_o es el promedio del diámetro de las colonias en las placas con EWCW y con carbendazim.

Germinación de esporas (%)

Se evaluó el efecto de EWCW (400 y 2000 µg/mL) y carbendazim (1000 µg/mL) sobre la germinación de esporas de *A. niger*, *B. cinerea* y *R. stolonifer*. El medio de cultivo se vertió en placas Petri de 5 cm de diámetro, posteriormente se colocaron en el centro de las placas 0.05 mL de suspensión de esporas (10^6 esporas/mL) de los hongos antes mencionados y se incubaron a 37 ± 2 °C, 22 ± 2 °C y 25 ± 2 °C, respectivamente durante 72 h.

Después de 5 y 20 h de incubación, se examinó el número de esporas germinadas de un total de 100 esporas en cada uno de los tres campos seleccionados al azar bajo un microscopio de disección (Olympus CX23, Olympus Optical Co., Tokio, Japón) a 400 ×. Los resultados se expresaron como germinación de esporas (%).

6.2.6. Actividad antifúngica *in vivo*

Las fresas (*Fragaria x ananassa*) se compraron en el mercado local del Municipio de Texcoco, Estado de México, México. Las frutas se cosecharon en la etapa de madurez comercial (sólo frutas con más del 80% de color rojo superficial que eran uniformes en peso promedio (17 ± 2 g) sin daño mecánico visible o infección por hongos. Las fresas se desinfectaron durante 10 min con una solución de NaClO al 1% p/v, se lavaron con agua esterilizada y se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, los frutos se sumergieron por 3 min en soluciones acuosas de EWCW (400 y 2000 µg/mL). Luego, las fresas fueron infligidas con una herida de 1 mm de profundidad en cuatro puntos a lo largo del ecuador de la fruta con una aguja estéril, y cada herida fue inoculada con 30 µL de suspensión de esporas (10^5 esporas/mL). Las frutas se colocaron en cajas de plástico de polipropileno (20.6 × 14.6 × 5.4 mm) y luego se almacenaron a 25 °C y 96% de humedad relativa durante 5 días. Se calculó el porcentaje de heridas inoculadas que presentaron crecimiento de moho (Aguilar-González *et al.*, 2015). Se utilizó carbendazim (1000 µg/mL) con fines comparativos y como control se utilizaron frutos inoculados con agua esterilizada.

6.3. Análisis estadístico

Todos los experimentos y mediciones se realizaron por triplicado, utilizando un diseño completamente al azar. Un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple fue aplicado, y cuando fue necesario se utilizó una prueba de Tukey para determinar diferencias entre las medias. Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza multifactorial para determinar qué factores (amplitud, tiempo de sonicación y su interacción) tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad antioxidante por DPPH y el contenido fenólico total de los extractos de WCW. El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA). En todos los casos se estableció un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Análisis químico proximal

Los contenidos de proteína, grasa, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno y cenizas en base seca de WCW fueron 17.2 ± 0.0 , 1.6 ± 0.1 , 44.5 ± 0.1 , 33.5 ± 0.2 y 3.1 ± 0.5 g/100 g, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de los reportados para pulpa de café (11.5% de proteína, 2.0% de grasa, 60.5% de fibra cruda y 8.9% de ceniza); para la cascarilla de café (8.0% de proteína, 0.5% de grasa, 24% de fibra cruda y 6% de ceniza) y para la piel plateada (18.6% de proteína, 2.2% de grasa, 62.4% de fibra cruda y $4.7 - 7.2\%$ de ceniza) (Murthy y Naidu, 2012).

7.2. Caracterización del extracto

7.2.1. Efecto de la sonicación

Los resultados del experimento factorial mostraron que a medida que aumentó el tiempo y la amplitud de la sonicación, el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de DPPH de los extractos aumentó significativamente (Tabla 1). La interacción entre el tiempo de sonicación y la amplitud también afectó significativamente el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de los extractos. El contenido fenólico total osciló entre 6.2 ± 0.3 mg equivalentes de ácido gálico/g para la amplitud más baja (50%) y el tiempo de sonicación más corto (15 min) hasta 33.8 ± 0.4 mg equivalentes de ácido gálico/g para la amplitud más alta (70%) y tiempo de sonicación (45 min) (Fig. 5.a). La actividad antioxidante DPPH osciló entre 370.3 ± 21.1 μmol equivalentes de Trolox/g en la amplitud más baja y el tiempo de sonicación más corto hasta 1790.1 ± 15.2 μmol equivalentes de Trolox/g en la mayor amplitud y el tiempo de sonicación más largo (Fig. 5.b).

Estos resultados pueden atribuirse al colapso de la pared celular debido a las ondas de choque ultrasónicas y los chorros de líquido durante la cavitación (Al-Dhabi *et al.*, 2017). El ultrasonido, como cualquier otra onda sonora, se propaga mediante una serie de ondas de compresión y rarefacción inducidas en las moléculas del medio por el que pasa, con el ciclo de compresión y rarefacción en función de la amplitud aplicada (Vinatoru *et al.*, 2017). Cuanto mayor sea la amplitud ultrasónica, mayor será la cavitación generada y el rendimiento de extracción (Al-Dhabi *et al.*, 2017). Parámetros como amplitud, relación líquido/sólido, temperatura de extracción, tiempo de sonicación y tipo de solvente tienen un efecto directo sobre la extracción asistida por ultrasonido del contenido fenólico total. Dahmoune *et al.* (2013) determinaron que las condiciones óptimas de extracción asistida por ultrasonido para la obtención del mayor contenido fenólico total de los residuos de limón se presentaron cuando se utilizó una amplitud de 77.79% y un tiempo de extracción de 15 min. Los tiempos de sonicación relativamente más largos permiten un contacto más prolongado entre el solvente y el sólido, lo que, combinado con la cavitación, conduce a una mayor tasa de transferencia de masa, y una mayor eficiencia de extracción (Al-Dhabi *et al.*, 2017).

Con base en los resultados obtenidos de la prueba de sonicación, se seleccionó una amplitud del 70% y un tiempo de sonicación de 45 min para obtener un extracto de WCW (EWCW) con el mayor contenido fenólico total y la mayor actividad antioxidante DPPH, mismo que fue seleccionado posteriormente para una evaluación adicional de su actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 1. Análisis de varianza multifactorial del contenido fenólico total y la actividad antioxidante DPPH de los extractos obtenidos a partir de los residuos del beneficio húmedo del café.

Parámetro	Amplitud (%)			Tiempo de sonicación (min)		
	50	60	70	15	30	45
TPC (mg equivalentes de ácido gálico/g)	8.5 ± 0.7 ^a	14.3 ± 0.7 ^b	26.1 ± 0.7 ^c	13.2 ± 0.7 ^a	15.4 ± 0.7 ^b	20.2 ± 0.7 ^c
DPPH (μmol equivalentes de trolox/g)	648.3 ± 8.1 ^a	1621.6 ± 21.0 ^b	1717.0 ± 36.9 ^c	1209.7 ± 12.6 ^a	1367.1 ± 36.9 ^b	1411.1 ± 31.4 ^c

^{a,b,c} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencia significativa entre las medias ($p \leq 0.05$).

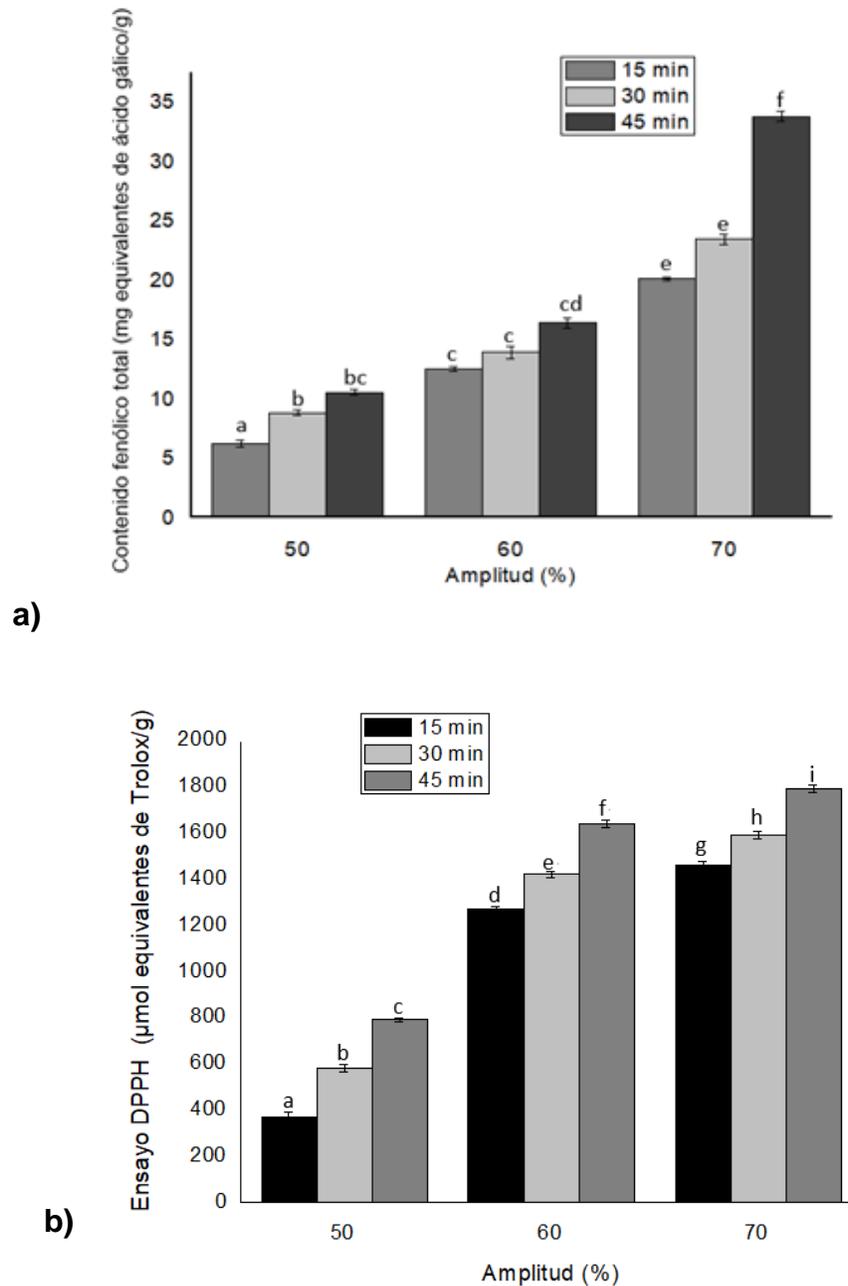


Figura 7. Efecto de las variables de extracción amplitud y tiempo de sonicación sobre: (a) contenido fenólico total (mg de equivalentes de ácido gálico/g) y (b) actividad antioxidante DPPH (μmol de equivalentes de Trolox/g). Letras diferentes indican diferencia significativa entre medias ($p \leq 0.05$).

7.2.2. Contenido fenólico total y actividad antioxidante

El contenido fenólico total de EWCW (33.8 ± 0.4 mg equivalentes de ácido gálico/g) fue significativamente mayor que el reportado para la pulpa de cereza de café (9.7 mg equivalentes de ácido gálico/g) (Hegger *et al.*, 2017), y para la cáscara de café (1.0 mg equivalentes de ácido gálico/g) (Moreira *et al.*, 2018), ambos extraídos con agua tibia.

Las propiedades antioxidantes de los extractos de las matrices alimentarias se evalúan generalmente utilizando más de un método, porque los antioxidantes pueden actuar mediante diferentes mecanismos, y un único ensayo sólo puede proporcionar una idea reductora parcial de las propiedades antioxidantes (Leopoldini *et al.*, 2011). Además, dada la complejidad química de los extractos de plantas, que a menudo están formados por docenas de compuestos con diferentes grupos funcionales, polaridad y comportamiento químico, es conveniente emplear diferentes ensayos para tener una imagen ampliada de las posibles aplicaciones (Sacchetti *et al.*, 2005).

La base molecular de las propiedades antioxidantes de los polifenoles surge de la reacción directa con los radicales libres y de la quelación de los metales libres (que finalmente están involucrados en reacciones que generan radicales libres) (Leopoldini *et al.*, 2011). En el presente trabajo, la actividad antioxidante de EWCW fue evaluada por DPPH, ABTS y FRAP. La actividad antioxidante (μmol equivalentes de trolox/g) para EWCW fue de 1790.1 ± 15.2 para DPPH y de 2000.6 ± 20.9 para ABTS, mientras que fue de 1295.0 ± 10.8 μmol de FeSO_4/g para FRAP. Por otro lado, los porcentajes de inhibición de EWCW para DPPH y ABTS fueron de $93.6 \pm 0.5\%$ y $97.4 \pm 0.4\%$, respectivamente.

Andrade *et al.* (2012) reportaron una actividad antioxidante ABTS de 381 μmol equivalentes de trolox/g para cáscara de café extraída con acetato de etilo, mientras que Magoni *et al.* (2018) informaron una actividad antioxidante de DPPH de 141.7 μmol equivalentes de trolox/g para pulpa de café extraída con una

mezcla de agua y etanol (30:70 % p / p) como disolvente. La composición de la WCW (pulpa y cáscara de café) y las condiciones de extracción podrían ser responsables de las diferencias entre nuestros resultados y los de los autores mencionados anteriormente. La recuperación de polifenoles y compuestos con propiedades antioxidantes de los materiales vegetales está potencialmente influenciada por la solubilidad de los compuestos fenólicos en el solvente utilizado para el proceso de extracción (Jimenez *et al.*, 2011). Al-Dhabi *et al.* (2017) informaron que la relación líquido/sólido, temperatura de extracción, potencia del ultrasonido y el tiempo de sonicación afectan significativamente el rendimiento del contenido fenólico total y la actividad antioxidante de los extractos de plantas. Torres-Valenzuela *et al.* (2020) reportaron un porcentaje de inhibición de DPPH y ABTS de 45 y 91% en extractos de pulpa de café con solventes supramoleculares. Las variables del proceso utilizadas para las reacciones de extracción, como el tiempo de reacción, la temperatura, la relación líquido/sólido y la naturaleza del disolvente, suelen tener una gran influencia tanto en la cinética de los compuestos fenólicos liberados de la matriz sólida como en la actividad antioxidante de los extractos obtenidos (Ballesteros *et al.*, 2017). De acuerdo con lo descrito por Bravo *et al.* (2012), los compuestos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos, feruloilquínicos y otros ácidos clorogénicos) y no fenólicos podrían tener un efecto potencial en la actividad antioxidante de ciertos extractos.

7.2.3. Contenido total de flavonoides y taninos totales

Los flavonoides y los taninos son metabolitos secundarios en las plantas que tienen capacidad antioxidante y diversas biofuncionalidades. Tales propiedades hacen posible la aplicación de estos compuestos en diferentes áreas (Ballesteros *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2019). En particular, los extractos de plantas con altos contenidos de flavonoides y taninos han sido etiquetados como excelentes agentes antifúngicos (de Rodríguez *et al.*, 2017). Los contenidos totales de flavonoides y taninos totales de EWCW fueron 9.1 ± 0.5 mg equivalentes de quercetina/g y 11.6 ± 0.1 mg equivalentes de ácido tánico/g, respectivamente.

El contenido total de flavonoides fue inferior a 11.4 mg de equivalentes de quercetina/g reportados para la pulpa de café cereza (Do *et al.*, 2019), mientras que el contenido total de taninos encontrado fue mayor al reportado por Murthy y Naidu (2012) para la pulpa de café (3.0 mg de equivalentes tánicos de ácido/g).

7.2.4. Determinación de compuestos fenólicos y nitrogenados

Los compuestos fenólicos y nitrogenados de EWCW se identificaron por los tiempos de retención relativos (Tabla 2). La cuantificación de estos compuestos se realizó con la curva de calibración de los respectivos estándares. Los principales compuestos fenólicos encontrados (mg/g) en EWCW fueron: ácido clorogénico (14.19), ácido cafeico (1.18), ácido gálico (0.78), ácido protocatecuico (0.73), ácido ferúlico (0.23) y compuestos nitrogenados que incluyen cafeína (1.2) y trigonelina (0.16). El ácido clorogénico y el ácido cafeico fueron los polifenoles dominantes, representando el 89.83% de los compuestos fenólicos identificados.

La actividad antioxidante del café depende de las características de los compuestos fenólicos y en particular, del contenido de ácido clorogénico, que posee una fuerte capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y una alta biodisponibilidad *in vitro* (Jeszka-Skowron *et al.*, 2016). El ácido clorogénico tiene una amplia cantidad de actividades biológicas, que incluyen aquellas hipoglucémicas, hepatoprotectoras, antivirales, antibacterianas, antiarcinogénicas y antiinflamatorias, mismas que están relacionadas principalmente con su potente actividad antioxidante (Ballesteros *et al.*, 2017; Ruiz-Palomino *et al.*, 2019). El ácido clorogénico también puede ejercer actividad antifúngica y es capaz de inhibir el crecimiento de hongos patógenos como *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *B. cinerea* y *Cercospora sojina*, entre otros (Martínez *et al.*, 2017). El contenido de ácido clorogénico en este trabajo fue significativamente mayor que el 1.0 – 4.0 mg/g encontrado para la pulpa de *Coffea arabica* (Heeger *et al.*, 2017).

Las variaciones en los compuestos fenólicos y las diferencias en su contenido en la pulpa de cereza de café se han atribuido principalmente a diferencias en la ejecución del beneficio húmedo u otros factores como las condiciones de crecimiento (altitud, clima, suelo y prácticas agrícolas) o el tiempo de cosecha (Heeger *et al.*, 2017).

El ácido cafeico es un metabolito secundario sintetizado por las plantas, y sus derivados naturales y sintéticos muestran una potente actividad antioxidante, incluso a bajas concentraciones. Además, se ha demostrado en muchas investigaciones de carácter biológico que el ácido cafeico y sus análogos también presentan actividades antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, antitumorales (Sidoryk *et al.*, 2018) y antifúngicas (Sardi *et al.*, 2016). El ácido gálico aislado de extractos metanólicos de los frutos de *Diospyros virginiana* L. mostró buena actividad antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, y *Penicillium var. cyclopium* (Rashed *et al.*, 2014).

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos y nitrogenados en el extracto seleccionado (EWCW) mediante HPLC.

Componente	Tiempo de retención (min)	Contenido (mg/g)
Ácido clorogénico	2.6	14.19
Acido cafeico	7.7	1.18
Ácido gálico	1.8	0.78
Ácido protocatecuico	2.4	0.73
Ácido ferúlico	6.7	0.23
Trigonelina	1.4	1.20
Cafeína	3.0	0.16
Total		18.47

Los valores de cafeína registrados en este trabajo fueron inferiores a los contenidos de cafeína (3.5 – 7.0 mg/g) encontrados en la pulpa de cereza de café por Heeger *et al.* (2017). Se ha informado que la cafeína inhibe el crecimiento del hongo mutualista de *Atta sexdens rubropilosa* (Miyashira *et al.*, 2012). Londoño-Hernandez *et al.* (2020) reportó como los principales componentes de la pulpa de café al ácido ferúlico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido 3-p-cumaroilquínico y ácido 3-feruloilquínico; mientras que Dungjai *et al.* (2016) informó como componentes al ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido protocatecuico y compuestos nitrogenados que incluyen trigonelina y cafeína. En nuestro estudio encontramos que EWCW contuvo ácidos cafeico y gálico que no han sido reportados por otros autores para *Coffea arabica*.

7.3. Actividad antifúngica *in vitro*

La Tabla 3 muestra el diámetro del halo de inhibición (en cm) alrededor de los discos medido después de 72 h. Las actividades se clasificaron según el diámetro de los halos de inhibición como: Activo = 1.5 cm o más, moderado = 1.0 – 1.5 cm y débil = menos de 1.0 cm o difuso (Aqueveque *et al.*, 2017). El control de carbendazim (1000 µg/mL) mostró una actividad antifúngica activa contra los tres hongos, con diámetros de inhibición de halo que oscilan entre 3.2 y 4.0 cm. La actividad antifúngica de EWCW contra *A. niger* fue significativamente mayor en cualquier concentración que el de carbendazim, excepto el tratamiento de 400 µg/mL, que no fue significativamente diferente. La actividad antifúngica de EWCW a 2000 µg/mL fue significativamente más eficaz contra *B. cinerea* y *R. stolonifer* que el control carbendazim.

EWCW exhibió una inhibición del crecimiento micelial superior contra *A. niger* en comparación con el control de carbendazim, excepto el tratamiento a 400 µg/mL, que no fue significativamente diferente (Tabla 4). La inhibición del crecimiento micelial osciló entre 89.1 y 99.7%. El tratamiento con 2000 µg/mL de EWCW fue significativamente más eficaz contra *B. cinerea* y comparable contra *R. stolonifer* que el tratamiento con carbendazim.

Con base en estos resultados, se estudió el efecto de EWCW sobre la germinación de esporas usando 400 µg/mL para *A. niger* y 2000 µg/mL para *B. cinerea* y *R. stolonifer*. La Tabla 5 muestra que independientemente de la cepa de hongos, la germinación de las esporas fue significativamente menor para EWCW que para carbendazim después de 5 ó 20 h. Para cuantificar la tasa de cambio en la germinación de las esporas, se determinó la pendiente correspondiente (Δ germinación de esporas = %/ Δ t_{5-20h}).

Los resultados nos permiten apreciar que para todos los hongos la pendiente fue menor para el EWCW que para los tratamientos de carbendazim, que fueron para *A. niger* (0.34 y 0.68 %/h), para *B. cinerea* (0.35 y 0.65 %/h), y para *R. stolonifer* (0.87 y 3.15 %/h), respectivamente.

La actividad antifúngica de EWCW parece deberse a los compuestos fenólicos identificados en este trabajo (subsección 7.2.4). Se ha informado que estos compuestos tienen la capacidad de romper la pared celular de hongos patógenos (Sung y Lee, 2010). Se ha demostrado que una alta concentración de compuestos fenólicos y una consecuente alta actividad antioxidante de los extractos, promueve a su vez una alta actividad antifúngica (de Rodríguez *et al.*, 2017; Mirón-Mérida *et al.*, 2019). Además, los compuestos fenólicos que se encuentran en mayor concentración en el extracto se consideran responsables de la actividad antifúngica (Martínez *et al.*, 2017; Sung y Lee, 2010). Específicamente, el ácido clorogénico, nuestro principal compuesto fenólico, afecta a las células de los hongos al dañar sus membranas, disipando así el potencial eléctrico de la membrana (Sung y Lee, 2010). Martínez *et al.* (2017) informaron que el ácido clorogénico indujo una rápida permeabilización de la membrana en las esporas de hongos, lo que provocó la pérdida de viabilidad.

Asimismo, Ahmad y Matsubara (2019) encontraron que la actividad antifúngica del ácido cafeico contra *Fusarium oxysporum f. sp. asparagi* se ejerció a través de la rotura de interceptación en el micelio del hongo y el daño de la pared celular, lo que inhibió su crecimiento.

de Rodríguez *et al.* (2017) afirmaron que el mecanismo de los fenoles contra los patógenos fúngicos está relacionado con la inhibición enzimática a través de su oxidación. La presencia de grupos hidroxilo en compuestos fenólicos podría unirse con grupos sulfhídrico en proteínas fúngicas, cambiando la conformación proteínica de la pared celular (Elfirta *et al.*, 2018).

Otro mecanismo por el cual los compuestos ejercen su actividad antifúngica es mediante la degradación de las paredes celulares de los hongos patógenos. En particular, el ácido gálico puede producir la enzima quitinasa que degrada la quitina, el principal componente estructural de las paredes celulares de los hongos fitopatógenos (Seo *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2016) demostraron que la cafeína destruye las capas protectoras de los hongos (pared y membrana celular) y los orgánulos subcelulares.

Asimismo, puede producirse un efecto sinérgico o complementario entre compuestos fenólicos, por lo que el efecto de estas interacciones podría ser de gran utilidad en la lucha contra patógenos (de Rodríguez *et al.*, 2017; Elfirta *et al.*, 2018).

7.4. Actividad antifúngica *in vivo*

Las fresas se hirieron en cuatro sitios a lo largo del diámetro ecuatorial, se inocularon con *A. niger*, *B. cinerea* y *R. stolonifer*, y se almacenaron durante 5 días a 25 °C. Al final del almacenamiento se determinó el porcentaje de heridas que presentaron crecimiento de moho. El porcentaje de heridas que presentaron crecimiento de moho en el control de agua estéril fue significativamente mayor que para EWCW y carbendazim, independientemente de la cepa del hongo.

Tabla 3. Inhibición del crecimiento de hongos por EWCW en difusión en disco.

Cepa	Tratamiento ($\mu\text{g/mL}$)	Diámetro del halo de inhibición (cm)
<i>A. niger</i>	EWCW ₄₀₀	3.1 ± 0.1^a
	EWCW ₆₀₀	5.0 ± 0.1^b
	EWCW ₁₅₀₀	5.0 ± 0.0^b
	EWCW ₂₀₀₀	5.0 ± 0.0^b
	Carbendazim ₁₀₀₀	3.2 ± 0.1^a
<i>B. cinérea</i>	EWCW ₄₀₀	2.1 ± 0.3^a
	EWCW ₆₀₀	2.8 ± 0.2^b
	EWCW ₁₅₀₀	3.7 ± 0.0^c
	EWCW ₂₀₀₀	4.9 ± 0.1^d
	Carbendazim ₁₀₀₀	4.0 ± 0.3^c
<i>R. stolonifer</i>	EWCW ₄₀₀	0.7 ± 0.1^a
	EWCW ₆₀₀	0.8 ± 0.0^a
	EWCW ₁₅₀₀	2.3 ± 0.1^b
	EWCW ₂₀₀₀	3.8 ± 0.3^d
	Carbendazim ₁₀₀₀	3.3 ± 0.1^c

Se agregaron a los discos 45 μL de EWCW a las concentraciones especificadas. Los subíndices de la columna de tratamiento se refieren a la concentración utilizada. ^{a,b,c,d} Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Tabla 4. Efectos de diferentes concentraciones del extracto (EWCW) sobre la inhibición del crecimiento micelial.

Cepa	Tratamiento ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición del crecimiento micelial (%)
<i>A. niger</i>	EWCW ₄₀₀	89.1 \pm 7.3 ^a
	EWCW ₆₀₀	99.3 \pm 10.3 ^b
	EWCW ₁₅₀₀	99.5 \pm 11.3 ^b
	EWCW ₂₀₀₀	99.7 \pm 12.3 ^b
	Carbendazim ₁₀₀₀	90.1 \pm 6.3 ^a
<i>B. cinerea</i>	EWCW ₄₀₀	62.0 \pm 2.3 ^a
	EWCW ₆₀₀	70.2 \pm 3.4 ^b
	EWCW ₁₅₀₀	74.1 \pm 4.4 ^b
	EWCW ₂₀₀₀	97.3 \pm 10.1 ^d
	Carbendazim ₁₀₀₀	83.3 \pm 4.1 ^c
<i>R. stolonifer</i>	EWCW ₄₀₀	14.6 \pm 1.1 ^a
	EWCW ₆₀₀	51.0 \pm 4.7 ^b
	EWCW ₁₅₀₀	71.0 \pm 9.5 ^c
	EWCW ₂₀₀₀	88.7 \pm 11.2 ^d
	Carbendazim ₁₀₀₀	81.1 \pm 10.2 ^d

Los subíndices de la columna de tratamiento se refieren a la concentración utilizada. ^{a,b,c,d} Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$)

Tabla 5. Efectos de diferentes concentraciones del extracto (EWCW) sobre la germinación de esporas (%).

Cepa	Tratamiento ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo (h)	Germinación de esporas (%)
<i>A. niger</i>	EWCW ₄₀₀	5	2.4 \pm 0.3 ^b
		20	7.5 \pm 0.2 ^c
	Carbendazim ₁₀₀₀	5	2.8 \pm 0.0 ^b
		20	13.0 \pm 1.5 ^b
<i>B. cinerea</i>	EWCW ₂₀₀₀	5	3.6 \pm 0.4 ^b
		20	10.2 \pm 0.2 ^c
	Carbendazim ₁₀₀₀	5	5.0 \pm 0.5 ^a
		20	14.7 \pm 1.3 ^b
<i>R. stolonifer</i>	EWCW ₂₀₀₀	5	4.9 \pm 0.2 ^c
		20	18.1 \pm 1.1 ^c
	Carbendazim ₁₀₀₀	5	8.0 \pm 0.8 ^b
		20	58.2 \pm 0.7 ^b

^{a,b,c} Diferentes superíndices en la misma columna indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las medias.

En el caso de *A. niger*, el porcentaje de heridas con crecimiento de moho fue de $65.7 \pm 4.1\%$ para agua estéril, que se redujo significativamente a $42.3 \pm 0.5\%$ para carbendazim y a $16.7 \pm 1.1\%$ para EWCW (400 $\mu\text{g/mL}$). Para *B. cinerea*, el porcentaje de heridas con presencia de moho también se redujo significativamente a $36.1 \pm 1.1\%$ cuando se utilizó EWCW (2000 $\mu\text{g/mL}$) y a $38.2 \pm 4.1\%$ con carbendazim, en comparación con el control de agua estéril $74.2 \pm 8.1\%$. Por último, para *R. stolonifer* el porcentaje de heridas con presencia de moho ($70.4 \pm 0.25\%$) en el control de agua estéril se redujo a $50.1 \pm 1.3\%$ EWCW (2000 $\mu\text{g/mL}$) y al $51.2 \pm 0.05\%$ con carbendazim.

Estos resultados son indicativos de la eficacia de EWCW para inhibir el crecimiento de moho de diferentes cepas de hongos.

B. cinerea se considera el patógeno principal de las fresas cosechadas, que causa el moho gris en la fruta (Petrasch *et al.*, 2019). A menudo, *B. cinerea* puede evolucionar de fruta podrida a fruta sana cercana, lo que provoca una gran descomposición de un producto y, a veces, el deterioro de lotes completos (Feliziani y Romanazzi, 2016). *R. stolonifer* es reconocido como uno de los hongos más destructivos y de más rápido crecimiento. Las enfermedades postcosecha causadas por este hongo se conocen como podredumbre blanda y/o podredumbre negra. En la fresa, el síntoma principal de la pudrición blanda es la delicuescencia de los tejidos, que pierden su consistencia, se empapan en agua y exudan un lixiviado (Feliziani y Romanazzi, 2015). *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp. son los agentes causantes de enfermedades postcosecha que generalmente presentan niveles insignificantes; sin embargo, su incidencia ha aumentado entre los cultivares que muestran resistencia al moho gris (Feliziani y Romanazzi, 2016). *A. niger* es considerado uno de los hongos causantes de la pudrición negra, una enfermedad postcosecha que invade y destruye el tejido vegetal del fruto (Guédez *et al.*, 2009).

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados *in vitro* e *in vivo* demostraron la eficacia de EWCW contra *A. niger*, *B. cinerea* y *R. stolonifer*. Los ácidos clorogénico y cafeico fueron los principales compuestos identificados en el extracto, a los cuales se les atribuye la actividad antifúngica del mismo. En este trabajo, por primera vez, se describen las propiedades antifúngicas y antioxidantes de los extractos obtenidos a partir de los residuos del beneficio húmedo del café.

IX. REFERENCIAS

Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.

Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., & Jeganathan, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 206-213.

Aguilar-González, A. E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 181-185.

Ahmad, H., & Matsubara, Y. I. (2019). Antifungal effect of *Lamiaceae* herb water extracts against Fusarium root rot in Asparagus. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 1-8.

Andrade, K. S., Gonçalves, R. T., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R. M., Martínez, J., & Ferreira, S. R. (2012). Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, 88, 544-552.

AOAC (2005). *Official Methods of Analysis* (18th edition). Maryland: Association of Official Analytical, Chemists International. Washington, DC, USA.

Aqueveque, P., Céspedes, C. L., Becerra, J., Aranda, M., & Sterner, O. (2017). Antifungal activities of secondary metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1048-1054.

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(5), 1028-1045.

Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Journal of Food Engineering*, *199*, 1-8.

Bautista-Baños, S. (2014). *Postharvest Decay: Control Strategies*, Elsevier, London, UK.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30.

Bravo, J., Juániz, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012). Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *60*(51), 12565-12573.

Can, O. T., Gengec, E., & Kobya, M. (2019). TOC and COD removal from instant coffee and coffee products production wastewater by chemical coagulation assisted electrooxidation. *Journal of Water Process Engineering*, *28*, 28-35.

Chanakya, H. N., & De Alwis, A. A. P. (2004). Environmental issues and management in primary coffee processing. *Process Safety and Environmental Protection*, *82*(4), 291-300.

Chen, J., Shen, Y., Chen, C., & Wan, C. (2019). Inhibition of key citrus postharvest fungal strains by plant extracts *in vitro* and *in vivo*: A review. *Plants*, *8*(2), 26.

Chen, W., Wang, W. P., Zhang, H. S., & Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus*

edulis mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 614-619.

Choi, B., & Koh, E. (2017). Spent coffee as a rich source of antioxidative compounds. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 921-927.

Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., & Madani, K. (2013). Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50, 77-87.

de Rodríguez, D. J., Salas-Méndez, E. D. J., Rodríguez-García, R., Hernández-Castillo, F. D., Díaz-Jiménez, M. L. V., Sáenz-Galindo, A., Gonzalez-Morales, M. L., Flores-Lopez, J. A., Villarreal-Quintanilla, F. M., Peña-Ramos, D. A., & Carrillo-Lomelí, D. A. (2017). Antifungal activity *in vitro* of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Industrial Crops and Products*, 107, 499–508.

Donlao, N., & Ogawa, Y. (2018). Impacts of processing conditions on digestive recovery of polyphenolic compounds and stability of the antioxidant activity of green tea infusion during *in vitro* gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 648-656.

Do, P. M. N., Hoang, Q. T. T., & Le, A. T. H. (2019). Optimization of conditions of extraction process from coffee cherry pulp (cascara) and application to drinking water products with antioxidant activity. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57(3B), 26.

Duangjai, A., Suphrom, N., Wungrath, J., Ontawong, A., Nuengchamnong, N., & Yosboonruang, A. (2016). Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research*, 5(4), 324-331.

Elad Y., & Stewart A. (2007) *Microbial control of Botrytis spp.* En: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht, Canterbury, New Zealand.

Elfirta, R. R., Falah, S., Andrianto, D., & Lastini, T. (2018). Identification of active compounds and antifungal activity of *Toona sinensis* leaves fractions against wood rot fungi. *Biodiversitas*, 19(4), 1313-1318.

Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488-495.

Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), 47-63.

Fennema, O. (1985). *Chemical changes in food during processing—an overview. En Chemical Changes in Food During Processing* (pp. 1-16). Springer, Boston, MA.

Food and Agriculture Organization of de United Nations (2017). Production of Strawberry. <http://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/1036868/>. Accesada 03/07/2020.

Ghosh, P., Fawcett, D., Sharma, S., & Poinern, G. (2017). Production of high-value nanoparticles via biogenic processes using aquacultural and horticultural food waste. *Materials*, 10, 852-871.

Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2009). Antagonist effect of *Trichoderma harzianum* over some strawberry (*Fragaria* spp.) post harvesting fungi pathogens. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 34-38.

Hahn, F. (2002). AE—automation and emerging technologies: fungal spore detection on tomatoes using spectral Fourier signatures. *Biosystems Engineering*, 81(3), 249-259.

Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, 129(3), 991-1000.

Heeger, A., Kosińska-Cagnazzo, A., Cantergiani, E., & Andlauer, W. (2017). Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of cascara beverage. *Food Chemistry*, 221, 969-975.

Hussein, M. A., El-Said, A. H., & Yassein, A. S. (2020). Mycobiota associated with strawberry fruits, their mycotoxin potential and pectinase activity. *Mycology*, 47, 1-9.

International Coffee Organization. Coffee Market Report. (2020). <http://www.ico.org/es/Market-Report-19-20-c.asp> (2017). Accesado 02/02/2020.

Janissen, B., & Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 128, 110-117.

Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K., & De Peña, M. P. (2016). Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1403-1409.

Jimenez, M., Castillo, I., Azuara, E., & Beristain, C. I. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp *capuli*) extracts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1), 29-37.

Ju, H. J., Yoo, T. K., Jin, S., Kim, H., & Hyun, T. K. (2020). *In vitro* evaluation of the pharmacological properties of crude methanol extract and its fractions of

Aconitum austrokoreense aerial parts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(3), 1341-1350.

Joaquín-Cruz, E., Dueñas, M., García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C., & García-Salinas, C. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70 151-157.

Khalid, U., Khan, S. N., Farooq, S., Siddique, M., Siddique, S., & Khan, S. (2019). Fungi associated with postharvest quality deterioration of strawberry at green markets of Lahore. *Mycopath*, 15, 67–69.

Kozakiewicz Z., Smith D. (1994) *Fisiología de Aspergillus*. En: Smith JE (eds) *Aspergillus. Manuales de Biotecnología*, vol. 7. Springer, Boston, MA.

Kumar, N.S., Hewavitharanage, P., & Adikaram, N.K.B. (1995). Attack on tea by *Xyleborus fornicatus*: Inhibition of the symbiote, *Monacrosporium ambrosium*, by caffeine. *Phytochemistry*, 40, 1113 -1116.

Labbe, M., Ulloa, P. A., Lopez, F., Saenz, C., Pena, A., & Salazar, F. N. (2016). Characterization of chemical compositions and bioactive compounds in juices from pomegranates ('Wonderful', 'Chaca' and 'Codpa') at different maturity stages. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76(4), 479-486.

Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.

Li, X., Xie, X., Xing, F., Xu, L., Zhang, J., & Wang, Z. (2019). Glucose oxidase as a control agent against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in postharvest strawberry. *Food Control*, 105, 277-284.

- Liu, J., Lin, S., Wang, Z., Wang, C., Wang, E., Zhang, Y., & Liu, J. (2011). Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability. *Food and Bioproducts Processing*, *89*(4), 333-339.
- Londoño-Hernandez, L., Ruiz, H. A., Ramírez, T. C., Ascacio, J. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2020). Fungal detoxification of coffee pulp by solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*, 101467.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118.
- Magalhães, L. M., Machado, S., Segundo, M. A., Lopes, J. A., & Páscoa, R. N. (2016). Rapid assessment of bioactive phenolics and methylxanthines in spent coffee grounds by FT-NIR spectroscopy. *Talanta*, *147*, 460-467.
- Magoni, C., Bruni, I., Guzzetti, L., Dell'Agli, M., Sangiovanni, E., Piazza, S., Regonesi, M. E., Maldini, M., Spezzano, R., Carusso, D., & Labra, M. (2018). Valorizing coffee pulp by-products as anti-inflammatory ingredient of food supplements acting on IL-8 release. *Food Research International*, *112*, 129-135.
- Martínez, G., Regente, M., Jacobi, S., Del Rio, M., Pinedo, M., & de la Canal, L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *140*, 30-35.
- Martínez-Ruiz, C., Lozano, G., Roldan-Cruz, C., Meraz, M., & Rodríguez-Huezo, M. E. (2018). Evolution of antioxidant activity in heated coffee brew. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *17*(2), 613-619.
- Martins, A. F., Pereira, A. G., Fajardo, A. R., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2011). Characterization of polyelectrolytes complexes based on N, N, N-trimethyl chitosan/heparin prepared at different pH conditions. *Carbohydrate Polymers*, *86*(3), 1266-1272.

- Masood, S., Randhawa, M. A., Butt, M. S., & Asghar, M. (2016). A potential of biopesticides to enhance the shelf life of tomatoes (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) in the controlled atmosphere. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(1), 3-13.
- Mirón-Mérida, V. A., Yáñez-Fernández, J., Montañez-Barragán, B., & Huerta, B. E. B. (2019). Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. *Food Science and Technology*, 101, 167-174.
- Miyashira, C. H., Tanigushi, D. G., Gugliotta, A. M., & Santos, D. Y. (2012). Influence of caffeine on the survival of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* and *in vitro* growth of their mutualistic fungus. *Pest Management Science*, 68(6), 935-940.
- Montoya, A. C. V., da Silva Mazareli, R. C., Delforno, T. P., Centurion, V. B., Sakamoto, I. K., de Oliveira, V. M., Luz Silva, E., & Varesche, M. B. A. (2020). Hydrogen, alcohols and volatile fatty acids from the co-digestion of coffee waste (coffee pulp, husk, and processing wastewater) by applying autochthonous microorganisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(39), 21434-21450.
- Moreira, M. D., Melo, M. M., Coimbra, J. M., dos Reis, K. C., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2018). Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. *Waste Management*, 82, 93-99.
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173-179.

Ogden, I., Rosa, E., Wyss, G., & Brandt, K., (2005). Seguridad y contaminación. Información destinada al consumidor para el control, de la calidad y la seguridad en las cadenas de producción orgánica. Research Institute of Organic Agriculture FiBL and University of Newcastle (p. 4).

Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 486-490.

Petrasch, S., Knapp, S. J., Van Kan, J. A., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877-892.

Ramírez-Velasco, L., Armendariz-Ruiz, M. A., Arrizon, J., Rodríguez-González, J. A., & Mateos-Díaz, J. C. (2016). Liberation of caffeic acid from coffee pulp using an extract with chlorogenate esterase activity of *Aspergillus ochraceus* produced by solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 503-512.

Regazzoni, L., Saligari, F., Marinello, C., Rossoni, G., Aldini, G., Carini, M., & Orioli, M. (2016). Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 20, 472-485.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Rhile, I. J., Markle, T. F., Nagao, H., DiPasquale, A. G., Lam, O. P., Lockwood, M. A., & Mayer, J. M. (2006). Concerted proton– electron transfer in the oxidation of hydrogen-bonded phenols. *Journal of the American Chemical Society*, 128(18), 6075-6088.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.

Ruiz-Palomino, P., Guatemala-Morales, G., Mondragón-Cortéz, P. M., Zúñiga-González, E. A., Corona-González, R. I., & Arriola-Guevara, E. (2019). Empirical model of the chlorogenic acid degradation kinetics during coffee roasting in a spouted bed. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(2), 387-396.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621-632.

Sardi, J. D. C. O., Gullo, F. P., Freires, I. A., de Souza Pitangui, N., Segalla, M. P., Fusco-Almeida, A. M., Rosalen, L.P., Regasini, O.L., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 387-391.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, (2018). Cultivo de fresa. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2017-2018/Paginas/2020B466.aspx>. Accesado 02/07/2018.

Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., Gat, Y., & Kumar, A. (2019). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review. *Toxin Reviews*, 1–13.

Sidoryk, K., Jaromin, A., Filipczak, N., Cmoch, P., & Cybulski, M. (2018). Synthesis and antioxidant activity of caffeic acid derivatives. *Molecules* 23(9), 2199.

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1-16.

Suleiman, M., & Yusuf, M. A. (2011). The potential of some plant powders as biopesticides against *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus maculatus* (F.) The potential of some plant powders as biopesticides against *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) on stored grains: a review (Coleoptera: Bruchidae) on stored grains: a review. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 4(2), 204-207.

Sung, W. S., & Lee, D. G. (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 219-226.

Torres-Valenzuela, L. S., Ballesteros-Gómez, A., & Rubio, S. (2020). Supramolecular solvent extraction of bioactives from coffee cherry pulp. *Journal of Food Engineering*, 278, 109933-109941.

Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.

Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2), 804-810.

- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. (2007). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.
- Wills, R. B. H., & Kim, G. H. (1995). Effect of ethylene on postharvest life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 6(3-4), 249-255.
- Yang, Z., & Zhai, W. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 470-476.
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316.

X. ANEXO

Publicación

Wet processing coffee waste as an alternative to produce extracts with antifungal activity: In vitro and in vivo valorization.

Alvarado-Ambriz, S., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, L., & Vernon-Carter, E. J. (2020).

Revista Mexicana de Ingeniería Química, 19(Sup. 1), 135-149.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00236

Matrícula: 2171801006

RESIDUOS DEL BENEFICIO
HÚMEDO DEL CAFÉ COMO UNA
ALTERNATIVA PARA PRODUCIR
EXTRACTOS CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA: VALORACIÓN *IN*
VITRO E IN VIVO

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 27 del mes de enero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
DRA. LIZETTE LILIANA RODRIGUEZ VERASTEGUI
DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA
DRA. LANDY HERNANDEZ RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: SINAI ALVARADO AMBRIZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

A p r o b a r

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

SINAI ALVARADO AMBRIZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO
CASTAÑEDA

VOCAL

DRA. LIZETTE LILIANA RODRIGUEZ
VERASTEGUI

VOCAL

DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

SECRETARIO

DRA. LANDY HERNANDEZ RODRIGUEZ



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Ciudad de México., a 27 de enero de 2021.

DR. E. JAIME VERNON CARTER
P R E S E N T E .

Por este conducto la Comisión del Posgrado en Biotecnología, le agradece su participación como **Co-Director** durante el desarrollo de la tesis de Doctorado de la alumna **SINAI ALVARADO AMBRIZ**, quien disertó y defendió el tema: **“Residuos del beneficio húmedo del café como una alternativa para producir extractos con actividad antifúngica: Valoración in vitro e in vivo”**.

Sin más por el momento, quedo de usted.

A T E N T A M E N T E .
“CASA ABIERTA AL TIEMPO”

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
COORDINADOR



Posgrado en Biotecnología
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Av. San Rafael Atlixco No 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F., A.P. 55-535 Teléfono 5804-65-51, e-mail: pgbt@xanum.uam.mx