



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**APROVECHAMIENTO DE UN RESIDUO AGRÍCOLA:
VALORACIÓN DE LA CÁSCARA DE LAS
SEMILLAS DE RAMÓN (*BROSIMUM ALICASTRUM*)
COMO FUENTE DE METABOLITOS BIOACTIVOS**

Tesis que presenta

JESSICA GUADALUPE YAM CHAN

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2025

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Jessica Guadalupe Yam Chan titulado **Aprovechamiento de un residuo agrícola: valoración de la cáscara de las semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*) como fuente de metabolitos bioactivos**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, dentro de la línea de investigación de Biotecnología de Productos naturales, en el laboratorio Química Orgánica del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la codirección del Dr. Raúl Tapia Tussell, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 01 de julio de 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Jessica Guadalupe Yam Chan

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Aprovechamiento de un residuo agrícola: valoración de la cáscara de las semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*) como fuente de metabolitos bioactivos” en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y el Dr. Raúl Tapia Tussell.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca otorgada con el número de CVU 1265397 para los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por las facilidades para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, a la Dra. Glendy Marilú Polanco Hernández por recibirme y brindarme acceso a los equipos e instalaciones del laboratorio. Al QFB. Luis Pablo López López y la IQ. Yessica Beatriz Moo Pisté por la capacitación y asesoramiento técnico para las pruebas de hemólisis, por su amistad en estos años y por compartirme su conocimiento.

Al Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma de Yucatán, al Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta y a la Dra. Gabriela Mancilla Montelongo por recibirme en mi estancia académica y ser unos mentores excelentes. Dra. Gaby le agradezco mucho estar presente desde mi primer día hasta el último y enseñarme las técnicas necesarias para llevar a cabo los experimentos de la actividad nematocida. Al M. C. Juan José Ríos Verdugo, a la Dra. Cindy Goretti Marín Tun y a la MVZ. Dilcia Yobed Miranda Miranda por el apoyo, acompañamiento y asesoramiento durante los experimentos. Gracias por las enseñanzas en el laboratorio y compartirme su conocimiento de veterinarios cuando era el tiempo del almuerzo. Fue un privilegio haberlos conocido y pasar tiempo con cada uno de ustedes. Gracias a Merari Sarai Calan May, Beatriz Alejandra Balam Chan y Mirley por su apoyo en los experimentos y en la toma de muestras, les deseo lo mejor a las tres. Y en general gracias a todo el equipo por brindarme su compañerismo, fue una estancia enriquecedora de manera profesional y personal.

A los miembros de mi Comité Tutorial, al Dr. Gonzalo Canché Escamilla y a la Dra. Séverine Derbré por su tiempo dedicado a mi formación. Sus valiosos comentarios en cada tutorial, que no solo enriquecieron mi proyecto sino también fueron fundamentales para mi crecimiento académico y personal.

A mi comité revisor, al Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta y Dr. Gonzalo Canché Escamilla por sus comentarios y observaciones al trabajo, así como el tiempo dedicado a la revisión del trabajo.

A la técnica, Lic. Karlina García Sosa por el apoyo académico y en las pruebas de laboratorio.

A la Dra. Mariana Ruesgas Ramón por su asesoría y acompañamiento en la preparación de los DES.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio por compartirme sus conocimientos y experiencias, por las risas en las reuniones y ayudarme en el crecimiento de mi proyecto. A la M. en C. Gabriela Tapia, gracias por aconsejarme y responder todas las dudas que tenía. Fuiste una gran mentora para mí.

A mis directores de tesis, al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, le agradezco el haberme propuesto realizar este proyecto y brindarme la confianza para llevarlo a cabo. Aprecio profundamente su guía en los momentos donde sentía que los experimentos no salían bien y por motivarme a presentar mis tutorales en inglés. Gracias por el asesoramiento y por compartirme sus conocimientos durante estos años. Al Dr. Raúl Tapia Tussell por escucharme y animarme en cada tutorial, por llevarme a conocer los plantíos de ramón y retroalimentar mi trabajo.

DEDICATORIA

A mi familia por apoyarme siempre y motivarme a estudiar la maestría. Por ser un ejemplo de resiliencia, bondad y superación.

A Miguel por tu apoyo, ser mi ejemplo de confianza, autodeterminación, valentía y guiarme en cada paso que doy.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	4
1.1. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.....	4
1.2. COMPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.....	5
1.3. USOS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.....	5
1.4. CONTENIDO FITOQUÍMICO EN LA CÁSCARA DE SEMILLAS	6
1.5. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS	8
1.6. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES).....	9
1.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES	10
1.8. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DE PLANTAS FORRAJERAS DE LA PENINSULA DE YUCATÁN	11
1.9. FITOQUÍMICA DE FAMILIA MORACEAE.....	13
1.10. <i>BROSIMUM ALICASTRUM</i>	13
1.10.1. FRUTO Y SEMILLA DE <i>B. ALICASTRUM</i>	14
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPITULO II	
2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1.1. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES CONVENCIONALES	20
2.1.2. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES).....	20
2.2. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA CUALITATIVA DE LOS EXTRACTOS	21
2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	21
2.3.1. ENSAYO CUALITATIVO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	21
2.3.2. ENSAYO CUANTITATIVO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	21
2.4. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES (CPT) EN EXTRACTOS DE DISOLVENTES CONVENCIONALES	22

2.5. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES (CPT) EN EXTRACTOS DE DES	22
2.6. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL DESENVAINA LARVAL (LEIA).....	23
2.7. PRUEBA DE ECLOSIÓN DE HUEVOS (EHT)	24
2.8. PRUEBA PVPP	25
CAPITULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. EVALUACION DE LOS METODOS DE EXTRACION.....	26
3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS CON DISOLVENTES TRADICIONALES.....	29
3.3 EXTRACCION DE POLIFENOLES CON DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES).....	29
3.4. ACTIVIDAD ANTIHELMITICA DE LOS EXTRACTOS	30
CAPITULO IV	
CONCLUSIONES	37
PESPECTIVAS.....	37
REFERENCIAS	38

LISTADO DE ABREVIATURAS

AH	Antihelmíntica
ChCl	Cloruro de colina
CPT	Contenido de polifenoles totales
DES	Disolventes eutécticos profundos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EHT	Inhibición de la eclosión de huevos
HBA	Aceptor de enlace de hidrógeno
HBD	Donante de enlace de hidrógeno
HL	Huevo larvado
HM	Huevo morulado
IL	Líquidos iónicos
LEIT	Inhibición de exposición de larvas
MAE	Extracción asistida por microondas
NGI	Nematodos gastrointestinales
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
PSE	Extracción acelerada con disolventes presurizados
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
UAE	Extracción por ultrasonido de potencia

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de la generación de residuos agroindustriales y aplicaciones potenciales. (Salazar et al. 2022).	4
Figura 2. Principales polifenoles en cáscaras de semillas de <i>Myrciaria dubia</i> y <i>Pisum sativum</i> L.....	7
Figura 3. Distribución de <i>Brosimum alicastrum</i> en México y Centroamérica (CICY, 2023).	14
Figura 4. Imagen del fruto y las semillas de <i>Brosimum alicastrum</i>	15
Figura 5. Cáscara de la semilla de <i>B. alicastrum</i>	16
Figura 6. Diagrama general del procedimiento de análisis de las semillas de <i>Brosimum alicastrum</i> en el presente estudio	19
Figura 7. Cáscara de la semilla de ramón colectada y secada en un horno de madera.	19
Figura 8. Larvas envainadas (a) y desenvainada (b) de <i>H. contortus</i>	24
Figura 9. Prueba de eclosión de huevos de <i>H. contortus</i> a 10X a) huevo morulado (HM), b) huevo larvado (HL), c) larva 1	25
Figura 10. Análisis cromatográfico (TLC) del extracto crudo de la cáscara de la semilla de ramón y las fracciones semipurificadas.	22
Figura 11. Comparación del contenido de Polifenoles Totales de los extractos con disolventes convencionales y DES.....	23
Figura 12. Resultados del cribado (promedio de las seis réplicas) de la evaluación de extractos de la cáscara de la semilla de ramón (2500 µg/ml) en la prueba de inhibición de la eclosión de huevos (EHT) de <i>H. contortus</i> . HM: Huevo morulado- HL: Huevo larvado- L1:larva 1.....	25
Figura 13. Resultados de lo de la inhibición del desenvaine de larvas (LEIT) de <i>H. contortus</i> , de los extractos de cáscara de semillas de ramón a 1200 µg/ml.	26
Figura 14. Porcentaje medio de inhibición de la desenvaine de larvas infectivas de <i>H. contortus</i> resultante de incubaciones con extractos de a una concentración de 1200 µg/mL de PBS con y con PVPP. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$).	28

Figura 15. Actividad hemolítica de los extractos de la cascara de la semilla de ramón con actividad nematicida frente a <i>H. contortus</i>	29
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Disolventes Eutécticos Profundos preparados para la extracción de la cáscara de la semilla de ramón.....	20
Tabla 2. Rendimientos de extracción y contenido de fenoles totales de la cáscara de la semilla de ramón	21
Tabla 3. Valores de CPT de extractos obtenidos por extracción sucesiva de la cáscara de la semilla de ramón.....	21
Tabla 4. Concentración efectiva al 50% (CE ₅₀) y 90% (CE ₉₀) con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%) de los extractos de etanol y etanol:agua (80:20) contra a huevos de <i>H. contortus</i>	26
Tabla 5. Concentración efectiva al 50% (CE ₅₀) y 90% (CE ₉₀) con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%) de los extractos de etanol y etanol:agua (80:20) contra a larvas de <i>H. contortus</i>	27

RESUMEN

La cáscara de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*), es un subproducto generado en la producción de harina de ramón y considerado hasta ahora como residuo agroindustrial de escaso valor. En este estudio, este material fue evaluado como fuente potencial de compuestos bioactivos mediante un enfoque integral que incluyó la caracterización de su capacidad antioxidante (DPPH), su contenido de polifenoles totales, su actividad nematocida *in vitro* contra *Haemonchus contortus*, el parásito abomasal más importante de rumiantes, y su seguridad biológica mediante pruebas de hemólisis. El estudio comparó métodos de extracción (maceración vs sonicación) utilizando diversos disolventes, incluyendo mezclas hidroalcohólicas y disolventes eutécticos profundos (DES), para caracterizar su perfil fitoquímico.

Aunque la mayoría de los extractos mostraron una actividad antioxidante limitada, los extractos de EtOH y EtOH:H₂O (80:20) mostraron una potente actividad nematocida, con capacidad para inhibir tanto la eclosión de huevos como el desarrollo larval del parásito, mostrando una potencia comparable a la de fármacos de referencia. La naturaleza de los extractos sugiere que los metabolitos responsables de la actividad son de alta polaridad y/o hidrofílicos.

Los análisis de seguridad revelaron que el extracto etanólico presentó menor citotoxicidad que el extracto hidroalcohólico en bajas concentraciones, sugiriendo un perfil adecuado para su posible uso como suplemento alimenticio en ovinos.

Estos resultados posicionan a la cáscara de ramón como un recurso promisorio para el desarrollo de alternativas naturales en el control de nematodos gastrointestinales en rumiantes, ofreciendo ventajas ecológicas frente a los antiparasitarios químicos convencionales. El estudio no solo contribuye a la valorización de este residuo agroindustrial, sino que también establece las bases para investigaciones futuras orientadas a identificar los compuestos activos específicos y optimizar su aplicación práctica en sistemas de producción animal sostenible.

ABSTRACT

The ramon seed coat (*Brosimum alicastrum*) is a by-product generated in the production of ramón flour and has been considered until now as an agroindustrial waste of little value. In this study, this material was evaluated as a potential source of bioactive compounds through a comprehensive approach that included the characterization of its antioxidant capacity (DPPH), its total polyphenol content, its in vitro nematicidal activity against *Haemonchus contortus*, the most important abomasal parasite of ruminants, and its biological safety through hemolysis tests. The study compared extraction methods (maceration vs. sonication) using various solvents, including hydroalcoholic mixtures and deep eutectic solvents (DES), to characterize their phytochemical profile.

Although most of the extracts showed limited antioxidant activity, the EtOH and EtOH:H₂O (80:20) extracts showed potent nematicidal activity, with the ability to inhibit both egg hatching and larval development of the parasite, showing potency comparable to that of reference drugs. The nature of the extracts suggests that the metabolites responsible for the activity are of high polarity and/or hydrophilic.

Safety analyses revealed that the ethanolic extract presented lower cytotoxicity than the hydroalcoholic extract at low concentrations, suggesting a suitable profile for possible use as a feed supplement in sheep.

These findings position ramon seed coat as a promising resource for the development of natural alternatives in the control of gastrointestinal nematodes in ruminants, offering ecological advantages over conventional chemical antiparasitics. The study not only contributes to the valorization of this agroindustrial waste but also establishes the basis for future research aimed at identifying specific active compounds and optimizing their practical application in sustainable animal production systems.

I. INTRODUCCIÓN

Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido generados a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, que no son de utilidad para el proceso que los genera, pero que pueden ser aprovechados o transformados para obtener otro producto con valor económico (Saval, 2012). Los residuos más utilizados comprenden cáscaras, semillas, tallos, bagazo, mazorcas, hojas, salvado, pastas de semillas de la extracción de aceites, entre otros. Dichos restos comúnmente son descartados durante las etapas de pre y post cosecha, almacenamiento, manejo, transporte, procesamiento o por el consumidor final. Este tipo de residuos son también los de mayor producción a nivel mundial y representan una fuente importante de contaminación ambiental (Bhat, 2021).

La generación de residuos agroindustriales constituye focos potenciales de contaminación y riesgo para la salud (Guerrero y Valenzuela, 2011), si no son dispuestos o procesados apropiadamente. Algunos de estos residuos son quemados o vertidos en rellenos sanitarios, lo que produce una gran liberación de dióxido de carbono (CO₂), contaminación de cursos de aguas, molestias por presencia de olores, proliferación de ratas, moscas y otros insectos, entre otros efectos negativos (Barragán *et al.*, 2008). La generación de estos residuos puede ocurrir durante los procesos relacionados con el cultivo u obtención de materia prima o en las actividades de procesamiento de esta. Si no son reciclados o dispuestos apropiadamente, tales residuos producen diversos impactos ambientales adversos, lo que genera, según Guerrero y Valenzuela (2011), contaminación principalmente en el suelo y el agua, tanto en fuentes superficiales como subterráneas.

Los residuos agroindustriales son un tipo de biomasa generada principalmente por el procesamiento de materiales orgánicos, que provienen del manejo de animales, cultivo de plantas y procesamiento de frutas y verduras (Rojas *et al.*, 2019). Según datos de la Comisión para la Cooperación Ambiental la generación total anual per cápita de residuos orgánicos en México es de 327.3 millones de toneladas, de los cuales, solo el 7% es aprovechada por medio de actividades como su combustión para la producción de energía, digestión anaeróbica para la producción de biogás y compostaje industrial

(CCA, 2017). Estos residuos, que afectan negativamente al medio ambiente por su disposición final inadecuada, pueden ser aprovechados para reducir el impacto ambiental y favorecer a la economía industrial.

Se ha reportado en la literatura que algunos residuos agroindustriales se utilizan como fuentes de productos como la pectina, el xilitol y el ácido acético, o se usan para la elaboración de papel y biomateriales, la extracción de metabolitos fermentables y/o antioxidantes, la obtención de aceites esenciales, la producción de alimentos funcionales, la fabricación de bebidas no alcohólicas, la generación de energía renovable, así como para el compostaje, el lombricultivo, los biocombustibles, los biofertilizantes, biofermentos y como aditivo en alimentación de ganado (Sharma, 2024; Yafetto, *et al.*, 2023; Rojas *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2016). Para esto, se han utilizado técnicas biotecnológicas, procesos químicos y procesos termoquímicos.

Los residuos agroindustriales también representan una fuente poco utilizada de moléculas bioactivas en las que se encuentran, pigmentos, pectinas, oligosacáridos, flavonoides, carotenoides, y vitaminas, entre otros (Rojas *et al.*, 2019). Entre estas moléculas destacan los polifenoles, reconocidos por sus propiedades antioxidantes, que les permite modular el sistema inmune, disminuir el riesgo de cáncer, y de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Ciupei *et al.*, 2024; Quiñones *et al.*, 2012). Dadas sus propiedades, este tipo de metabolitos son de interés para la industria farmacéutica, de alimentos o cosméticos (CIATEJ, 2021).

Actualmente, la industria alimenticia de la península de Yucatán explora la posible utilización de la semilla del ramón (*Brosimum alicastrum* L) para la producción de harina de ramón que es utilizada como insumo para la producir tortillas y otros subproductos (Subiria *et al.*, 2019). En el proceso de obtención de la harina de la semilla de ramón, se obtiene la cáscara de la misma como un residuo que, hasta el momento, no tiene aplicación alguna. Con base a lo anterior, en el presente trabajo se pretende evaluar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de la cáscara de la semilla de ramón, así como su potencial uso como un producto de valor agregado de interés para la industria farmacéutica o veterinaria, como parte de una estrategia de aprovechamiento integral del ramón en el sector agrícola y de disminución del impacto ambiental que los residuos generados en la obtención de harina.

Este proyecto está alineado a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) los cuales constituyen un llamamiento universal a la acción para poner fin a la pobreza, proteger el planeta y mejorar las vidas y las perspectivas de las personas en todo el mundo (Naciones Unidas, 2023); en particular está relacionado al ODS 12: Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles, y el aprovechamiento de residuos agroindustriales, promocionando la economía circular y un desarrollo más sostenible en consonancia con los objetivos de la Agenda 2030.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

De acuerdo con Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos en México, es “material o producto cuyo propietario desecha y que puede ser susceptible de ser valorizado o someterse a tratamiento o disposición final conforme a lo previsto en la misma ley” (DOF, 2003). Este marco referencial permite enunciar que los residuos agroindustriales son productos orgánicos sólidos, semisólidos y líquidos generados a partir del uso directo de productos primarios o de su industrialización, no útiles para el proceso que los generó, pero si susceptibles de un aprovechamiento o transformación que genere otro producto de interés comercial y/o social.

Una de las estrategias para aprovechar los residuos agroindustriales es mediante su incorporación a la línea de producción o su uso en una segunda cadena de producción. Dentro de las posibles alternativas de su uso se encuentran la obtención de productos bioactivos o nutrientes, los cuales se pueden utilizar como ingredientes para la formulación de alimentos funcionales y nutraceuticos o con funcionalidad tecnológica (Figura 1). Además, existen otras opciones como fuentes de proteína alternativa o para la generación de energía. También pueden tener aplicación en la industria farmacéutica y cosmética (Belmonte, *et al.*, 2022; Salazar, *et al.*, 2022).



Figura 1. Ruta de la generación de residuos agroindustriales y aplicaciones potenciales. (Salazar *et al.* 2022)

1.2. COMPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Las características químicas y físicas de los residuos agroindustriales dependen del proceso de transformación y de la materia prima utilizada. La mayoría de los residuos agroindustriales son materiales lignocelulósicos; es decir, los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina representan sus mayores porcentajes de composición (Cabrera *et al.*, 2016; Saval, 2012). Sin embargo, los residuos obtenidos como subproducto de procesos agroalimentarios también contienen pectina, polisacáridos no estructurales, aceites esenciales y otras moléculas con propiedades aprovechables como materias primas para la obtención de nuevos productos (Aguiar *et al.*, 2022). Un número importante de residuos agroindustriales son reconocidos como fuentes de productos fenólicos como ácido elágico, catequina, quercetina, ácido gálico, vainillina, antocianinas, flavonoles, entre otros (Perra *et al.*, 2022; Manasa *et al.*, 2021; Bouazzaoui *et al.*, 2018). Se ha reportado que este tipo de polifenoles pueden ser benéficos para la salud, principalmente debido a sus propiedades antioxidantes (Salazar *et al.*, 2023).

1.3. USOS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Actualmente existen, reportadas en la literatura, una gran cantidad de soluciones biotecnológicas, químicas y termoquímicas que pueden aplicarse para coadyuvar a solucionar el problema de los residuos agroindustriales, incluyendo la producción de biogás, bioplásticos y la biorrefinación de lignocelulosa, así como la obtención de pectina, lignina entre otros productos (Bertrán *et al.*, 2024; Prado *et al.*, 2024; Álvarez *et al.*, 2019). Cuando estos procesos se desarrollan a escala industrial, el aprovechamiento de residuos o subproductos de la industria agroalimentaria reduce los costos de producción, dado que los residuos comúnmente no tienen un aparente uso potencial. El aprovechamiento de residuos y subproductos agroindustriales como materia prima para la producción de productos con mayor valor ha creado nuevas oportunidades que contribuyen a la preservación del medio ambiente. El uso de residuos y subproductos agroindustriales como sustrato de algún tipo reduce sustancialmente el gasto global del proceso, haciendo la producción más respetuosa con el medio ambiente y acorde con el principio de una bioeconomía circular. Este escenario favorece cualquier bioproceso que

utilice residuos o subproductos de la agricultura o de la industria alimentaria, al tiempo que reduce los costos de producción y la generación de desechos.

En las últimas décadas, se ha trabajado activamente para encontrar soluciones que permitan aprovechar los residuos y desechos agroindustriales, mediante la mejora y el desarrollo de procesos biotecnológicos que permitan la obtención de productos de alto valor a partir de los mismos. Actualmente, residuos, desechos y subproductos agroindustriales como hojas, tallos pulpas de frutas o la melaza de soja son utilizados para la producción de bioproductos como bioetanol (Rončević *et al.*, 2019), biogás y polímeros extracelulares (Rodríguez *et al.*, 2021), así como ácido láctico, bioetanol, biohidrógeno y biogás a partir de paja de trigo (Vučurović *et al.*, 2024). Así también como el uso de los residuos de las hojas y fibras del agave para generar resinas termoplásticas y de la cascarilla de arroz para generar bloques de concreto no estructural (Mejías *et al.*, 2016). Los residuos agroindustriales han demostrado ser una alternativa prometedora en la ganadería para el control de parásitos como es el caso de la cáscara de y hojas de *Theobroma cacao* (Mancilla *et al.*, 2021a).

1.4. CONTENIDO FITOQUÍMICO EN LA CÁSCARA DE SEMILLAS

Aun cuando existen diversos estudios sobre el contenido fitoquímico de las cáscaras de frutas, por ejemplo aguacate, sandía, plátano, y uva, entre otras (Islam *et al.*, 2023; Zaldivar *et al.*, 2023; Neglo *et al.*, 2020; Ordoñez *et al.*, 2019), el conocimiento fitoquímico de las cáscaras de las semillas es limitado, reportándose la presencia de alcaloides, glucósidos, fenoles y taninos, terpenos y flavonoides en el extracto etanólico de la cáscara de la semilla de *Vigna mungo* L. (Arockianathan *et al.*, 2019) y de flavonoides, alcaloides, terpenoides, taninos, fenoles, saponinas y quinonas en el extracto acuoso de la cubierta de semilla de *Gnetum gnemom* L (Addina, 2022).

Los polifenoles son metabolitos secundarios producidos por las rutas metabólicas de Shikimato/fenilpropanoide (Ruales *et al.*, 2017; Valencia *et al.*, 2017), comúnmente encontrados en diferentes partes de las plantas, incluyendo las cáscaras de las semillas; su estructura química se caracteriza por la presencia de al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos oxhidrilo que frecuentemente se encuentran como derivados de ésteres, éteres y glucósidos (Gil, 2012). En la cáscara de las semillas de camu-camu

(*Myrciaria dubia*) se ha reportado la presencia de vescalagina, la castalagina y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Figura 2), en tanto que en la cáscara de *Pisum sativum* L. se reporta la presencia de ácido gálico, epigallocatequina, naringenina y apigenina (Willemann *et al.*, 2020; Stanisavljević, *et al.*, 2016).

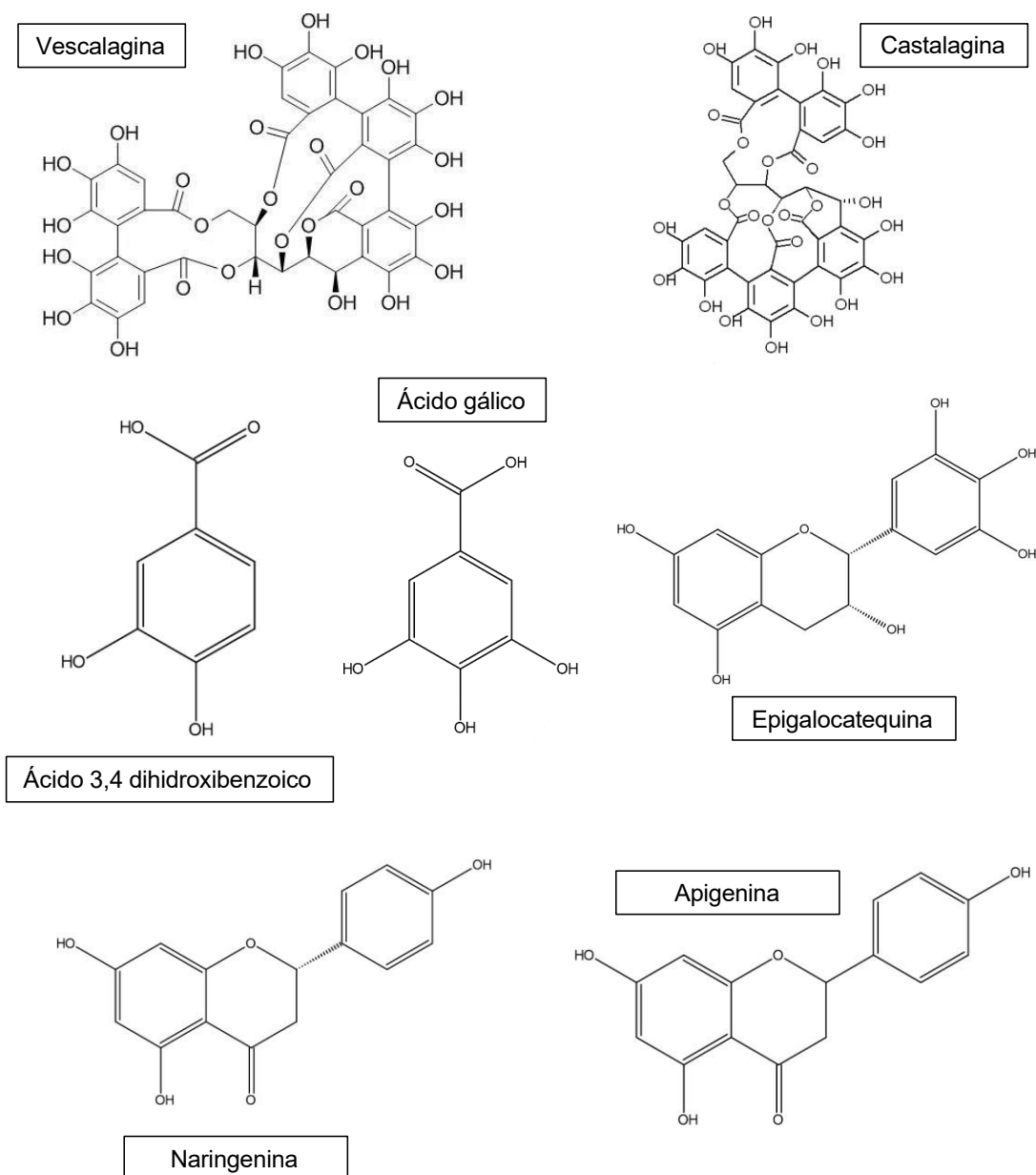


Figura 2. Principales polifenoles en cáscaras de semillas de *Myrciaria dubia* y *Pisum sativum* L.

1.5. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS

El proceso de extracción es uno de los pasos más importantes en la purificación, identificación y obtención de compuestos bioactivos. La extracción de un compuesto bioactivo es una técnica que implica la obtención del analito de interés, separando el compuesto de interés de la muestra, con el uso del correspondiente disolvente teniendo en cuenta que la muestra, puede estar en estado sólido o líquido (Gharibzahedi *et al.*, 2019).

El proceso de extracción es el primer paso para estudiar el contenido fitoquímico de las plantas, por lo que elegir un método adecuado es fundamental para obtener resultados confiables. Idealmente, el método de extracción debe ser rápido, seguro, no destructivo, económico y eficiente (Moreira, *et al.*, 2019). Los métodos de extracción se dividen en dos tipos: convencionales o tradicionales y no convencionales que, a pesar de ser diferentes en sus metodologías, tienen objetivos en común, tales como presentar una alta eficiencia de extracción, ser factibles tecnológicamente, ser reproducibles y conservar tanto la estabilidad como la bioactividad de los extractos (Smith, 2003). Los métodos de extracción convencionales suelen usarse frecuentemente porque son fáciles de operar debido a que no utilizan equipos sofisticados. Sin embargo, estos métodos utilizan principalmente procesos de calentamiento que, aunque facilitan la transferencia de materia entre las diferentes fases del sistema y la solubilidad de los productos, consumen mucha energía y pueden provocar la degradación de componentes termolábiles (Barba *et al.*, 2016), además de que el tiempo de procesamiento suele ser extenso y se requieren de grandes cantidades de disolventes, lo que aumenta el costo del proceso. Ante estas desventajas y/o limitaciones, se han buscado alternativas que permitan descubrir o diseñar procesos de extracción que requieran niveles mínimos de energía, con tiempos de operación reducidos y que generen un mejor rendimiento, evitando la degradación térmica de los componentes de interés (Goyeneche *et al.*, 2018), utilizando disolventes alternativos no peligrosos que garanticen la obtención de extractos seguros y de alta calidad (da Silva *et al.*, 2016). Por otra parte, los métodos no convencionales han atraído la atención como opción para reemplazar a los métodos convencionales debido a su gran potencial para recuperar, de manera eficiente,

sostenible y económica, metabolitos bioactivos presentes en muestras de origen vegetal (Ghafoor, *et al.*, 2009).

Entre las técnicas empleadas para la extracción rápida y eficiente de metabolitos bioactivos a partir de matrices naturales se encuentran la extracción asistida por microondas (MAE) (Ganzler *et al.*, 1986), por ultrasonido de potencia (UAE) (Kaufmann y Christen, 2002), la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción acelerada con disolventes presurizados (PSE) documentada por Puértolas *et al.*, 2016 y la extracción con disolventes eutécticos profundos (DES). Estos últimos, han tenido diversas aplicaciones como síntesis, extracción, biocatálisis, nanomateriales, electroquímica, alimentos, cosméticos, entre otros (Lomba, *et al.*, 2021). Las tecnologías de extracción verde, como las extracciones que utilizan DES, se han destacado como una excelente alternativa para obtener productos de alto valor agregado a partir de residuos agroindustriales (Soquetta *et al.*, 2018) y por su naturaleza “amigable” con el medio ambiente debido a su menor consumo energético, a la disminución en el uso de disolventes orgánicos y a la reducción en los tiempos de operación (Putnik *et al.*, 2017).

1.6. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES)

En la actualidad, factores como el costo, la seguridad y la sostenibilidad del disolvente son importantes para cumplir los doce principios de la química verde (Anastas y Eghbali, 2010). Inicialmente, los líquidos iónicos (IL), formados por combinaciones de aniones y cationes y definidos como compuestos líquidos que presentan estructuras cristalinas iónicas-covalentes, se consideraron como posibles sustitutos de los disolventes convencionales como la acetona, el acetato de etilo, el metanol y el cloroformo, debido a sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, y aunque se ha calculado que es posible sintetizar más de un centenar de IL diferentes, su escasa biodegradabilidad, la dificultad para sintetizarlos y su elevado coste han limitado su aplicación (Dupont *et al.*, 2002). Una alternativa al uso de IL está dada por los disolventes eutécticos profundos (DES), que se forman al combinar, en proporciones molares definidas, dos o más componentes comúnmente conocidos como HBA (aceptor de enlace de hidrógeno) y HBD (donante de enlace de hidrógeno) que interactúan principalmente a través de enlaces de hidrógeno

intermoleculares (Huang *et al.*, 2019). Actualmente, las formulaciones de DES más populares incluyen cloruro de colina (ChCl) en combinación con urea, etilenglicol y glicerol, así como otros alcoholes, aminoácidos, ácidos carboxílicos y azúcares (Ruesgas *et al.*, 2017).

1.7. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Diversos residuos agroindustriales como la cascarilla de cacao, cáscara de granada, banana, naranja, semillas de papaya, bagazo de manzana y uvilla han demostrado poseer actividad antioxidante mediante el ensayo de ABTS y DPPH. En el caso de los residuos de cacao se identificaron epicatequina, teobromina y catequina como los principales metabolitos bioactivos (Gabbay *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2019).

Además de su actividad antioxidante, las cascaras de naranja, banana y granada han sido evaluados por su actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión de pocillos. La cáscara de naranja exhibe actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus* (*B. cereus*), y Gram negativas como *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) y *Escherichia coli* (*E. coli*), y actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* (*A. niger*) y *Aspergillus flavus* (*A. flavus*). Por su parte, la cáscara de banana presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*S. aureus* SARM) y *S. typhimurium*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). La cáscara de granada, por otro lado, ha demostrado una notable actividad antibacteriana frente a *B. cereus*, *S. aureus*, *S. aureus* (SARM) y *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) y *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, además de actividad antifúngica frente a *A. niger* y *A. flavus* (Hanafy *et al.*, 2021).

También se ha evaluado el potencial uso de ligninas de residuos agroindustriales de cáscaras de avellana y nuez, midiendo contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH y ABTS y actividad citotóxica frente a una línea de fibroblastos de ratón 3T3 donde no hubo un comportamiento citotóxico (Gordobil *et al.*, 2020)

Se han empleado bioproductos derivados de hongos comestibles, así como extractos de cáscara y hojas de mazorca de *Theobroma cacao* (cacao), para combatir nematodos. Además, se ha utilizado residuos de café, incluidos los posos, como tratamiento efectivo

contra el parásito *Haemonchus contortus*. Asimismo, se han investigado otros subproductos agroindustriales con potencial antihelmíntico en rumiantes, como los derivados del cacahuate, el plátano y la yuca. (Aguilar *et al.*, 2024; Hoste *et al.*, 2022; Mancilla *et al.*, 2021a; Mancilla *et al.*, 2021b; Castañeda *et al.*, 2020; Ortiz *et al.*, 2016). Y la obtención de polifenoles a partir de residuos de cáscaras de frutas como el plátano, la piña y el coco (Rojas *et al.*, 2019). Así como de semillas de frijol, cilantro, comino, entre otros y cáscaras de semillas como la del frijol mungo (Yaneva *et al.*, 2024; Sahu *et al.*, 2022).

1.8. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DE PLANTAS FORRAJERAS DE LA PENINSULA DE YUCATÁN

Entre estas las plantas usadas como forraje para ganado en la Península de Yucatán, especies como *Havardia albicans* han demostrado capacidad antiparasitaria al reducir significativamente el tamaño y fecundidad de hembras de *Haemonchus contortus* asociado al consumo de forraje rico en taninos cuando se administran como suplemento alimenticio en ovinos infectados (Galicia *et al.*, 2012). Estudios posteriores han ampliado este conocimiento, demostrando que los extractos foliares de especies como *Acacia pennatula*, *Lysiloma latisiliquum* y *Leucaena leucocephala* presentan un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la viabilidad larval (LEIT) de este nematodo. Indica que los taninos de *A. pennatula*, *L. latisiliquum* y *L. leucocephala* participan en la actividad AH contra *H. contortus*. Además del CT, otros compuestos, como los glucósidos flavonoides, pueden interactuar con el NGI. (Alonso *et al.*, 2008). Más recientemente, Santiago *et al.*, (2023) demostraron que los extractos hidroalcohólicos de *L. leucocephala*, *Guazuma ulmifolia*, *Brosimum alicastrum* y *Enterolobium americana* son capaces de inhibir eficientemente la eclosión de huevos (EHT) de *H. contortus*. En este estudio, el análisis fitoquímico cualitativo de los extractos hidroalcohólicos reveló reportó la presencia de flavonoides, taninos y esteroides en las cuatro especies. Sin embargo, no se cuantificó el contenido específico de estos compuestos, lo que impidió establecer una correlación directa con la actividad antihelmíntica observada.

La actividad antihelmíntica de estas plantas forrajeras y sus extractos ha sido ampliamente documentada en la literatura científica. Este efecto biológico, asociado al contenido de metabolitos secundarios en su follaje y a su disponibilidad en regiones tropicales, las convierte en alternativas promisorias para el control de nematodos gastrointestinales (NGI) en rumiantes menores. Las investigaciones abarcan diversas especies parasitarias, desde *Strongyloides* spp. (Carvalho *et al.*, 2012) y *Trichostrongylus* spp. (Moreno *et al.*, 2012, 2013) hasta infecciones mixtas por *Trichostrongylus colubriformis*, *T. axei*, *Oesophagostomum columbianum*, *Strongyloides papillosus* y *Trichuris ovis* (Hussain *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2006). Sin embargo, *H. contortus* sigue siendo el modelo parasitario más utilizado en estos estudios debido a su relevancia económica en los sistemas de producción ganadera tropical.

La evaluación de la actividad antihelmíntica se realiza principalmente mediante dos ensayos in vitro estandarizados. El primero es la prueba de eclosión de huevos (EHA), que implica un protocolo riguroso que comienza con la recolección de heces directamente del recto animal y su procesamiento dentro de las primeras tres horas post-muestreo. Tras la homogeneización de 10 g de heces en 100 mL de agua purificada, se realiza filtración con gasa y centrifugación a $168 \times g$ durante 5 minutos. El sedimento resultante se somete a flotación en solución saturada de sacarosa (densidad 1.28), permitiendo la recuperación de huevos desde la interfase para su posterior cuantificación y ajuste a una concentración estándar de 150 huevos/mL de PBS, lista para su uso en placas de 96 pocillos (Castañeda *et al.*, 2018).

El segundo método clave es el ensayo de inhibición del desenvainado larval (LEIA), técnica que requiere el cultivo de heces en cámaras húmedas durante cinco días a 28°C, seguido del aislamiento de larvas infectivas (L3) mediante la técnica de Baermann. Para evaluar la actividad antihelmíntica, se induce artificialmente el desenvainado larval mediante una solución que combina hipoclorito de sodio (concentración final 0.006%) y cloruro de sodio (16.5% p/v) en PBS. El proceso se monitorea microscópicamente con objetivo 10X, registrando el porcentaje de desenvainado a intervalos específicos (0, 20, 40 y 60 minutos) manteniendo una temperatura constante de 24°C (Castañeda *et al.*, 2017; Jackson y Hoste, 2010).

Estos hallazgos in vitro han sido complementados con estudios in vivo que validan la eficacia antihelmíntica en condiciones reales de producción. Entre ellos destacan investigaciones sobre el consumo directo de follaje de *Gymnopodium floribundum* en corderos experimentalmente infectados (Hoste *et al.*, 2022), así como la incorporación estratégica de subproductos agroindustriales como la borra de café en dietas para ovinos y caprinos (Méndez *et al.*, 2019), demostrando el potencial de estos recursos vegetales como alternativas sostenibles para el control parasitario en sistemas ganaderos tropicales.

1.9. FITOQUÍMICA DE FAMILIA MORACEAE

Esta familia está conformada por árboles, arbustos y, rara vez, plantas herbáceas, terrícolas o hemiepifíticas, dioicas o monoicas; poseen hojas por lo general alternas, dispuestas en espiral o dísticas, con látex presente por lo común de color blanquecino (Carvajal, 2007). El género más estudiado de esta familia es el género *Ficus* dado que su fruto, raíz y hojas se utilizan en la medicina tradicional para tratar diversas dolencias como problemas gastrointestinales, respiratorios, cardiovasculares, inflamatorios y espasmódicos (Duke, *et al.*, 2002). Se ha reportado que los frutos secos de las especies de este género son fuente de vitaminas, minerales, carbohidratos, azúcares, ácidos orgánicos y polifenoles (Mawa, *et al.*, 2013). Asimismo, se ha reportado que la actividad antioxidante de *F. hirta* está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos como la luteolina, apigenina, psoraleno y bergapteno (Yi, *et al.*, 2013). Por otro lado, los extractos foliares de *Brosimum alicastrum* con actividad antihelmíntica contra *H. contortus*, con un perfil químico de taninos y saponinas (Santiago *et al.*, 2023).

1.10. *BROSIMUM ALICASTRUM*

Brosimum alicastrum Swartz o ramón, como es conocido en el sur de México, pertenece a la familia de Moraceae con amplia distribución en Mesoamérica (Figura 3), de donde se considera endémico y donde crece de manera silvestre en selvas perennifolias y caducifolias (Hernández *et al.*, 2014; Carter, 2015). Su nombre científico viene de la

palabra griega “brosimos”, que significa comestible. Es un árbol perennifolio o subperennifolio, de 20 a 30 m (hasta 45 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 50 a 90 cm y hasta 1.5 m y es predominante en la península de Yucatán (Berg, 1972). Es un elemento sumamente importante de las selvas, ya que es tolerante a la sequía y próspero en micrositios húmedos. Prolifera a lo largo de las costas del Golfo de México y del Océano Pacífico con excepción de la Península de Baja California. También se encuentra en algunos estados de la Cuenca del Río Balsas, se extiende por Centroamérica y llega hasta Colombia, Perú y Venezuela; además de Cuba, Jamaica y Trinidad y Tobago en el Caribe (CICY, 2023).

Es un árbol multipropósito, la madera sirve para construcción, artesanías y herramientas, mientras que sus hojas sirven como excelente forraje para el ganado (Peters y Pardo, 1982; Ortiz *et al.*, 1995). Además, tiene un alto valor en programas de restauración, agroforestería y reconversión de sistemas ganaderos por su adaptabilidad y resistencia a condiciones extremas como inundaciones y sequías (Mendoza *et al.*, 2020).



Figura 3. Distribución de *Brosimum alicastrum* en México y Centroamérica (CICY, 2023).

1.10.1. FRUTO Y SEMILLA DE *B. ALICASTRUM*

El fruto del ramón, conocido como capomo o nuez maya, es carnoso y comestible, con un diámetro aproximado de 2cm, un color verde amarillento que cambia a naranja en su madurez se encuentra cubierto por diminutas escamas y contiene una sola semilla de textura lisa, opaca y de color marrón. Por sus propiedades, en algunas comunidades la semilla de ramón ha sustituido al maíz en épocas de escasez; también tiene usos en

rituales, y tradicionalmente se le atribuyen cualidades medicinales, primando el tratamiento del asma y la bronquitis en estados de la península de Yucatán (BDMTM, 2009).

La semilla se encuentra dentro de una baya comestible (2 a 3 cm), cuyo color varía de verde cuando es inmadura a café cuando madura. Cuando la baya se seca puede removerse la cutícula y extraer la semilla esférica y aplanada (Figura 4). La composición química de la semilla del árbol ramón incluye principalmente materia seca (92%), seguida por almidón y azúcares (71.2%), proteína cruda (12.8%), y en menor medida cenizas (3.4%), fibra cruda (3.2%) y extracto etéreo (3.1%) (Sarmiento *et al.*, 2022).

Se estima que un árbol de ramón puede producir entre 60 y 75 kg de semillas/año, sin embargo, un estudio en Yucatán indicó que árboles de más de 25 años producen 95.5 kg de semilla/año (peso fresco) y 163.4 kg/ha/año de follaje (Hernández *et al.*, 2014), por lo que se ha calculado que una plantación comercial de 250 árboles/ha produce entre 20 y 25 ton/ha/año de semilla y 48.9 ton/ha/año de follaje (Larqué, 2014a). Sus semillas hervidas o tostadas tienen un sabor parecido a las castañas, en tanto que las semillas tostadas y molidas se usan como sustituto del café. Y también son usadas para producción harina de ramón (Larqué, 2014b).

Se ha reportado que la harina no contiene gluten, pero si un 11% de proteína, 70% de carbohidratos y 1.5% de grasas; cuenta también con un alto contenido de fibra, vitaminas, B1, B2 y ácido fólico, además de ser rica en minerales como calcio, hierro, zinc y sodio, y aportar 318 Kcal por cada 100 g de harina (Ramírez, *et al.*, 2017; Carter, 2015).



Figura 4. Imagen del fruto y las semillas de *Brosimum alicastrum*.

La remoción de las cáscaras que cubren las semillas es un proceso crítico para la producción de harina, ya que múltiples pruebas realizadas han señalado que estas reducen la calidad de sabor de la harina (Larqué, 2014c). Estudios realizados en la Unidad de Energía Renovable del CICY sobre el análisis elemental de la cáscara de la semilla de ramón (Figura 5) revela que este residuo posee un 44.17% de carbono (C), 5.47% de hidrógeno (H) y un 1.75% de nitrógeno y azufre combinados (N + S). Comparado con otros residuos de semillas, la cáscara de la semilla de ramón presenta la menor cantidad de carbono fijo (C) y oxígeno (O), pero un contenido relativamente mayor de N + S. Con respecto a su composición química, se reportó un contenido de lignina (30.52%), cenizas (5.59%), holocelulosa (63.89), glucosa (37.79), xilosa (6.63), arabinosa (1.45%), y otros carbohidratos (16.02%). Canto y colaboradores (2024) reportaron el análisis proximal de la cáscara de la semilla de ramón; humedad (9.91%), ceniza (6.79%), lípidos (1.43%), proteína cruda (11.36%), fibra cruda (28.01%) y carbohidratos (42.47%).



Figura 5. Cáscara de la semilla de *B. alicastrum*.

JUSTIFICACIÓN

Los residuos agroindustriales representan una preocupación ambiental debido a que, por su volumen y composición orgánica, a menudo son fuente de contaminación si no se manejan correctamente. En las últimas décadas ha surgido un creciente interés por explorar el aprovechamiento de estos residuos como recursos renovables. El avance en el aprovechamiento de los residuos agroindustriales se ha visto impulsado por investigaciones llevadas a cabo en países desarrollados, donde los desechos han dejado de ser meramente productos residuales para transformarse en valiosas materias primas. Este enfoque no solo maximiza su potencial de utilización, sino que también añade valor a estos materiales, contribuyendo así a la prevención de problemas ambientales. Recientemente, los subproductos agrícolas están recibiendo una gran atención debido al concepto de una economía circular, donde se propone el uso de éstos como ingredientes alimenticios u otros tipos de aplicaciones que le otorguen un valor agregado. En este contexto, el caso de *Brosimum alicastrum* (ramón) adquiere especial relevancia, particularmente si se tiene en cuenta que, recientemente, la empresa Agrolef, en colaboración con el Centro de Investigación Científica de Yucatán, estableció el proyecto “Establecimiento de un vivero y manejo de las plantaciones comerciales de un cultivo energético (*B. alicastrum*)”, bajo un concepto de biorrefinería y agricultura sustentable, habiéndose sembrado aproximadamente 20 hectáreas de esta especie.

Con base a lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo principal el estudio de la cáscara de la semilla del árbol de ramón (*Brosimum alicastrum*), con el fin de explorar alternativas para su aprovechamiento sostenible que permitan generar valor agregado.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Explorar el aprovechamiento de la cáscara de la semilla de ramón como fuente de metabolitos bioactivos y/o como posible suplemento funcional en la alimentación de ganado caprino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la eficiencia de diferentes métodos para la extracción de metabolitos de la cáscara de la semilla de ramón.
- Caracterizar los extractos de la cáscara de la semilla de ramón mediante el Contenido de Polifenoles Totales (CPT).
- Evaluar la actividad biológica del extracto crudo de la cáscara de la semilla de ramón mediante ensayos de actividad antioxidante (DPPH), actividad nematicida contra el parásito gastrointestinal *Haemonchus contortus* y prueba de hemólisis.

CAPITULO II

2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Como primer paso se planteó el procesamiento del material vegetal, seguido de la extracción de la cáscara de las semillas, la cuantificación del contenido de polifenoles totales (CPT) y la actividad antioxidante del extracto, seguido de la determinación de la actividad hemolítica y antihelmintica (Figura 6).

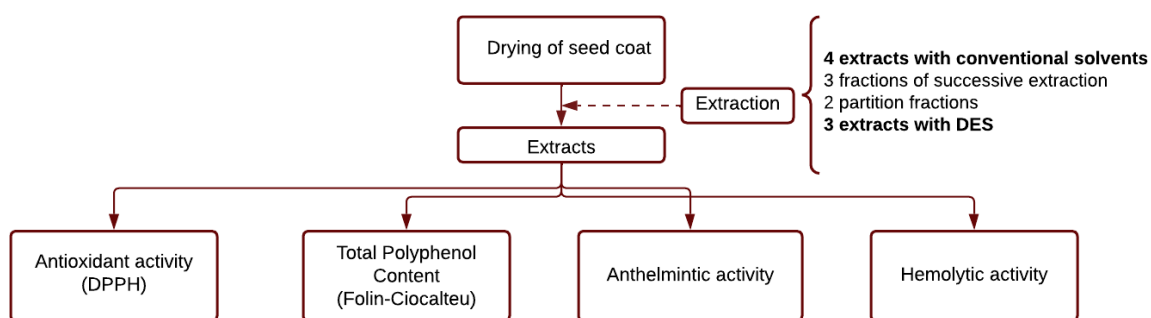


Figura 6. Diagrama general del procedimiento de análisis de las semillas de *Brosimum alicastrum* en el presente estudio.

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

La cáscara de la semilla de ramón, proporcionada por el Dr. Raúl Tapia Tussell, investigador de la Unidad de Energía Renovable (UER) del CICY, fue secada a 60°C en un horno, durante 48 h (Figura 7).



Figura 7. Cáscara de la semilla de ramón colectada y secada en un horno de madera.

2.1.1. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES CONVENCIONALES

Maceración. Se pesaron 100 g de cáscara de ramón y se agregaron 900 ml del disolvente o la mezcla de disolventes. Se realizaron extracciones sucesivas dejando reposar el material vegetal con el disolvente durante 24 horas a temperatura ambiente. El disolvente se filtró primero a través de algodón y posteriormente a través de papel filtro; el disolvente se eliminó a presión reducida utilizando un rotaevaporador, obteniéndose el extracto crudo correspondiente.

Sonicación. Se pesaron 100 g de cáscara de ramón y se agregaron 900 ml del disolvente o la mezcla de disolventes correspondientes. Se realizaron cuatro extracciones sucesivas de 30 min cada una en un sonificador BRANSON SF-250 equipado con una sonda ultraalta de 1/8" a temperatura ambiente. El disolvente se filtró primero a través de algodón y posteriormente a través de papel filtro; el disolvente se evaporó a presión reducida utilizando un rotaevaporador, obteniéndose el extracto crudo correspondiente.

2.1.2. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES)

Tres DES diferentes se prepararon mezclando, agitando y calentando los constituyentes en matraces de vidrio inerte (Tabla 1), según el procedimiento reportado por Durand *et al.*, (2013) con modificaciones en el protocolo. Posteriormente se añadió el 10% (v/v) de agua y el DES hidratado se calentó y agitó (250 rpm, 60° C) durante dos horas, hasta conseguir la mezcla de fases. El pH del DES recién preparado se midió a temperatura ambiente, usando un potenciómetro (sensION™).

Tabla 1. Disolventes Eutéticos Profundos preparados para la extracción de la cáscara de la semilla de ramón.

HBA	HBD	Radio Molar	pH
ChCl	Urea	1:2	6.53
ChCl	Glucosa	2.5:1	3.11
ChCl	Ácido láctico	1:2	0.47

Para las extracciones, por triplicado, se utilizó 1 g de cáscara de ramón y 5 mL de cada uno de los DES. Para las extracciones asistidas por ultrasonido se utilizó un sonicador BRANSON SF-250, equipado con una sonda ultra alta de 1/8", durante 30 min a 50°C con un ciclo de trabajo constante (200 W).

2.2. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA CUALITATIVA DE LOS EXTRACTOS

Para la determinación de los perfiles cromatográficos de los extractos con disolventes convencionales se utilizó cromatografía en capa fina (CCF), usando placas de aluminio impregnadas con gel de sílice (E.M. Merck, 0.2 mm) y una mezcla de hexano:acetona (8:2) como eluyente. Los perfiles cromatográficos se visualizaron a la luz visible y se revelaron utilizando ácido fosfomolibdico (H_2SO_4 5%, ácido fosfomolibdico, sulfato cérido).

2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

2.3.1. ENSAYO CUALITATIVO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Una solución al 1% de cada extracto en $CHCl_3/MeOH$ 75:25 se aplicaron en el origen de placas para CCF, utilizando hexano:acetona (8:2 v/v) como eluyente. Una vez concluida la elución, la placa cromatográfica se reveló por aspersion con el reactivo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los componentes con actividad anitoxidante se visualizaron por decoloración del radical DPPH.

2.3.2. ENSAYO CUANTITATIVO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La cuantificación de la actividad antioxidante se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Castillo *et al.*, (2009), con modificaciones en el protocolo. Se preparó una solución a 0.1 mM de DPPH en EtOH minutos antes de su uso para evitar la descomposición. El experimento se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y se agregó una combinación de 180 μL de solución de DPPH y 20 μL de la muestra de prueba a cada pocillo. La mezcla se agitó e incubó durante 30 minutos en la oscuridad, luego se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm; los valores de absorbancia se

extrapolaron a una curva de calibración preparada con ácido ascórbico (vitamina C) a diferentes concentraciones (1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} y 1×10^{-1} mg/mL), para determinar la actividad antioxidante de las muestras. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES (CPT) EN EXTRACTOS DE DISOLVENTES CONVENCIONALES

La cuantificación de CPT se realizó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Huber y Rupasinghe en 2009, usando diferentes concentraciones de ácido gálico en etanol (10, 20, 40, 80, 100, 150 y 250 mM) para preparar la curva estándar. Se agregaron 20 μ L del extracto diluido en etanol, o del estándar de ácido gálico, y se combinaron con 100 μ L de reactivo de Folin (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) en microplacas de poliestireno transparente de 96 pocillos. Después de 5 min, se añadieron 80 μ L de solución de carbonato sódico al 7,5% (p/v) a cada pocillo y la mezcla se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, para después medir la absorción a 760 nm con el lector de placas (lector de microplacas Tecan Infinite™ M200 PRO; Morrisville, NC, EE. UU.). Los resultados se expresan como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de peso seco (mg GAE/g PS).

2.5. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES (CPT) EN EXTRACTOS DE DES

El contenido de polifenoles totales de los extractos se determinó mediante el método de Folin–Ciocalteu (con algunas modificaciones), siguiendo el procedimiento descrito por Singleton *et al.*, 1999. Primeramente, se mezclaron 25 μ L del extracto seguido de la adición de 250 μ L de reactivo de Folin (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Después de 5 min se añadieron 375 μ L de carbonato de sodio al 20% (Na_2CO_3 , Sigma Aldrich) y 1975 μ L de agua destilada y la mezcla se dejó reposar durante 2 h. Posteriormente, se tomaron 300 μ L del sobrenadante y se colocaron en una placa de 96 pocillos. Las muestras se analizaron a una absorción a 760 nm utilizando el lector de placas (lector de microplacas Tecan Infinite™ M200 PRO; Morrisville, NC, EE. UU.). Los resultados se expresan como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de peso seco (mg GAE/g PS).

2.6. ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL DESENVAINÉ LARVAL (LEIA)

El LEIA se llevó a cabo siguiendo el procedimiento por Jackson y Hoste (2010). Se preparó una solución madre utilizando los respectivos extractos de EtOH, acetato de etilo, acetona: H₂O:ácido acético y EtOH:H₂O. Los controles negativos consistieron en larvas L3 solo con PBS y los controles positivos consistieron en larvas L3 expuestas a levamisol (20 µg de la solución madre con 3000 µg de levamisol/mL de agua). Se realizó primeramente un cribado a una sola concentración (1200 g/mL) para conocer cuáles eran los extractos con actividad biológica a una mayor concentración para posteriormente realizarlas a las concentraciones de 1200, 800, 600, 400, 200 y 100 g/mL de PBS. A cada concentración se le añadieron 1000 µL de una solución que contenía 1000 L3 (1-5 semanas de edad) envainadas de *Haemoncus contortus* (cepa clínica, aislada en FMVZ) para obtener las concentraciones finales del extracto. Las larvas infecciosas se incubaron con el extracto durante 3 h a 24 °C. Después de ese tiempo, las L3 se centrifugaron durante 3 min a 168 g y se lavaron tres veces con una solución de PBS. Luego, alícuotas de cada solución de larvas se colocaron en viales Eppendorf (200 µL cada uno). Se realizaron cuatro réplicas para cada concentración y el control PBS. El proceso del desenvainé se indujo artificialmente por contacto con una solución madre de hipoclorito de sodio (2% p/v) y cloruro de sodio (16,5% p/v) diluido a 1/300, 1/400, 1/480, 1/600 o 1/800 en PBS. Para elegir qué dilución de hipoclorito de sodio se debía utilizar, el desenvainé óptimo se determinó antes de cada prueba para asegurar que se encontrara > 95 % de desenvainé después de 60 min en los respectivos controles negativos. La cinética del desenvainé se evaluó con un microscopio utilizando el objetivo 10X y se registró a los 0, 20, 40 y 60 min a 24 °C (Jackson y Hoste 2010). Mientras tanto, el porcentaje de inhibición de desenvainé (IE) se calculó para cada extracto de planta como lo describen Chan Pérez *et al.*, (2017): el proceso de desenvainé se detuvo en cada punto de tiempo flameando los portaobjetos respectivos que contenían el L3. Luego se registró el número de larvas envainadas y desenvainadas.

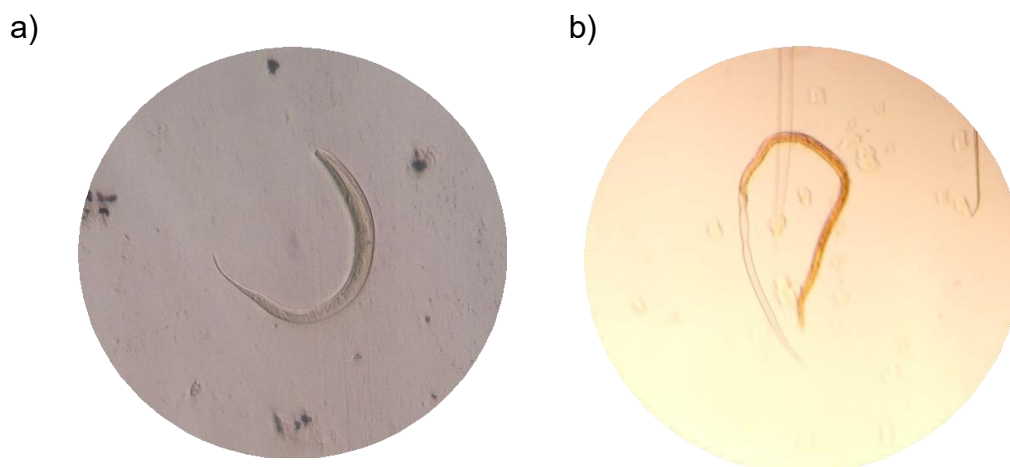


Figura 8. Larvas envainadas (a) y desenvainada (b) de *H. contortus*

2.7. PRUEBA DE ECLOSIÓN DE HUEVOS (EHT)

El ensayo de eclosión de huevos se realizó siguiendo el procedimiento descrito por von Samson *et al.*, (2009) y Jackson y Hoste (2010). Se prepararon soluciones madre (10 000 $\mu\text{g/mL}$) en PBS de cada extracto. Se utilizó PBS como control negativo y tiabendazol como control positivo (10 μg de tiabendazol tomados de la solución madre con 1000 μg de tiabendazol/mL de PBS). Se utilizó una placa multipocillo (24 pocillos) donde se agregaron 0.5 mL de solución madre para cada extracto. Se realizó primeramente un cribado a una sola concentración (3600 $\mu\text{g/mL}$) para conocer cuáles eran los extractos con actividad biológica a una mayor concentración para posteriormente realizarlas en diferentes concentraciones (3600, 2400, 1200, 600, 300 y 150 $\mu\text{g/mL}$ de PBS). A cada pocillo se le agregaron 0.5 mL de la suspensión de huevos (150 huevos/mL), Cada pocillo tuvo un volumen final de 1 mL. Se utilizaron seis réplicas para cada concentración de extracto. Después de 48 h de incubación a 28 °C, se añadieron dos gotas de solución de lugol® a cada pocillo para matar y teñir los huevos y larvas. Enseguida se contabilizó todo el contenido en portaobjetos McMaster en el microscopio (Figura 9), contando el número de huevos que no formaron larvas como huevos morulados (HM). El número de huevos que

formaron larvas, pero no completaron su eclosión se contabilizó como huevos larvados (HL). Finalmente, también se contabilizó el número de larvas libres presentes en cada pocillo según lo descrito por Vargas *et al.*, (2014). Se calculó el porcentaje de eclosión ($H\% = (L1 / (HM + HL + L1)) \times 100$) para los controles negativos y solo se incluyeron en el estudio aquellos con $H\% \geq 70\%$.

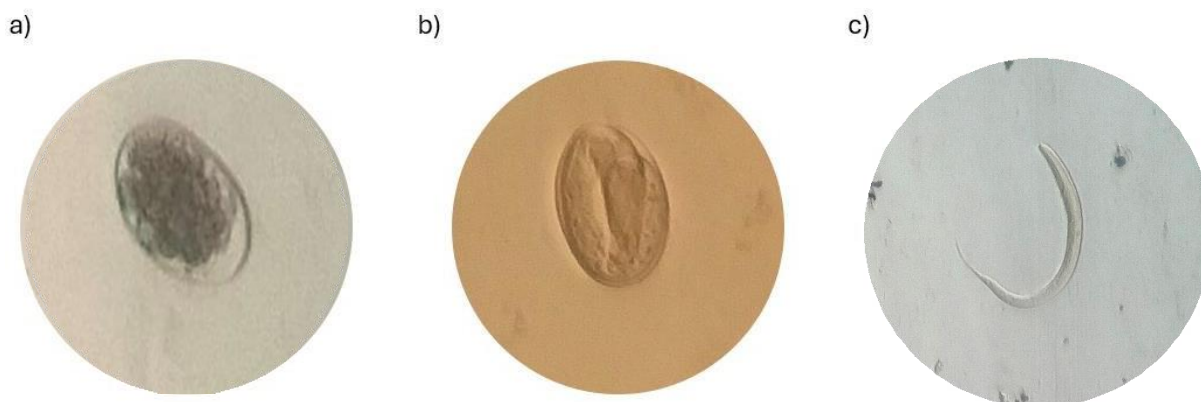


Figura 9. Prueba de eclosión de huevos de *H. contortus* a 10X a) huevo morulado (HM), b) huevo larvado (HL), c) larva 1.

2.8. PRUEBA PVPP

Se incubaron con el reactivo polivinilpolipirrolidona (PVPP) (0.05 g de PVPP/ml de la respectiva solución de extracto) durante 2 h a 24°C. Tras las incubaciones, las soluciones se centrifugaron a 378 g durante 5 min. El sobrenadante se utilizó en el bioensayo de LEIA a una concentración de 1200 µg/mL de PBS con o sin PVPP (cuatro réplicas para cada extracto).

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACION DE LOS METODOS DE EXTRACION

Para evaluar la eficiencia de diferentes métodos para la extracción de la cáscara de la semilla de ramón, se evaluaron dos métodos de extracción: ultrasonido y maceración, ambos usando etanol como disolvente. Ambos métodos resultaron en la obtención del extracto crudo con valores muy similares en cuanto a rendimiento, i.e. 5.97 g por 100 g de cáscara de la semilla por el método de ultrasonido y 5.90 g por 100 g de cáscara de la semilla por el método de maceración. Sin embargo, el extracto obtenido mediante el uso de ultrasonido mostró un mayor contenido de CPT (5.37 mg EAG/g ps) en comparación con el obtenido por maceración (3.98 mg EAG/g ps). Este resultado sugiere que la maceración, que depende principalmente de la difusión pasiva del disolvente, resulta en una menor extracción de productos fenólicos debido a los tiempos prolongados de exposición que podrían favorecer procesos de oxidación o degradación de estos metabolitos (Quiroz *et al.*, 2013). La sonicación optimiza la interacción entre el solvente y la matriz de la cáscara de la semilla, permitiendo una extracción más completa y rápida usando volúmenes menores de disolvente, por lo que no solo extrae una mayor cantidad de material, sino que también contribuye a una extracción más eficiente de los productos fenólicos. Con base a lo anterior, el método de ultrasonido fue el elegido para evaluar la eficiencia de extracción de la cáscara de ramón usando cuatro disolventes convencionales.

Al comparar la capacidad de extracción de los disolventes convencionales elegidos (Tabla 2), se encontró que la mezcla hidroalcohólica de EtOH:H₂O (80:20 v/v) produjo el mayor rendimiento de extracto (9.08%) y también el mayor contenido de fenoles totales (CPT) [5.09 mg EAG/g ps], seguido del extracto obtenido con utilizando únicamente etanol. Estos resultados pueden explicarse con base a la polaridad de los disolventes. Aunque el EtOH es considerado un solvente polar, la mezcla de EtOH:H₂O (80:20 v/v) posee una mayor polaridad y capacidad para extraer componentes polares o de naturaleza hidrofílica. Por otra parte, mientras que la extracción con la mezcla de acetona:H₂O:ácido acético produjo el segundo mejor rendimiento de extracto crudo, su

contenido de fenoles totales fue inesperadamente bajo dada la naturaleza ácida de la mezcla; lo anterior sugirió que el extracto obtenido no es rico en polifenoles y que su contenido fitoquímico incluye otro tipo de metabolitos secundarios, los cuales no se midieron en este estudio. El disolvente que resultó en la obtención del extracto con el menor rendimiento y el menor CPT fue el acetato de etilo, lo que puede explicarse por su polaridad media.

Los resultados obtenidos en este trabajo son menores que los reportados recientemente por Canto *et al.*, (2024) quienes encontraron un CPT de 7.19 mg GAE/g al extraer la cáscara de la semilla de ramón usando una mezcla de EtOH:H₂O 1:1 como disolvente. Lo anterior puede deberse a la diferencia de polaridades entre los disolventes utilizados para la extracción. Además, cabe destacar que las semillas de ramón, de las cuales se obtuvo la cáscara utilizada en este estudio, fueron previamente sometidas a tratamiento térmico a altas temperaturas. Y se ha reportado que las temperaturas de secado superiores a 80 °C causan una disminución en el rendimiento de polifenoles (Anila y Mohammed, 2022; Lang *et al.*, 2019; Al *et al.*, 2018)

Ante los bajos niveles de CPT detectados en los cuatro extractos crudos obtenidos con disolventes convencionales en comparación con otros residuos como el orujo de uva (33.88 mg EAG g⁻¹ ps), cáscara de cítricos (19.595 mg EAG/g), cáscara de tomate (208,2 mg EAG/100 g) reportados en la literatura (Goula *et al.*, 2016; Valdez *et al.*, 2014; Londoño *et al.*, 2010). Se llevó a cabo una extracción sucesiva de la cáscara de la semilla de ramón y una partición líquido-líquido del extracto de EtOH: H₂O (80:20 v/v) de la cáscara de la semilla, con el fin de explorar la posible obtención de una fracción rica en polifenoles. La extracción sucesiva con hexano, acetato de etilo y EtOH:H₂O (80:20 v/v) produjo los resultados esperados, i.e. las fracciones obtenidas con los disolventes de baja (hexano) y mediana (acetato de etilo) polaridad mostraron un nivel bajo de CPT, en tanto que la fracción hidroalcohólica mostró un enriquecimiento (9.16 mg EAG/g ps) en su CPT. El proceso secuencial permite un fraccionamiento selectivo: las etapas iniciales con hexano y acetato de etilo remueven preferentemente componentes no polifenólicos y polifenoles de menor polaridad, mientras que la extracción final con el sistema hidroalcohólico concentra específicamente los polifenoles nativos presentes en la matriz

vegetal al tener menor cantidad de compuestos no fenólicos. Este comportamiento diferencial justifica la marcada diferencia cuantitativa observada entre las fracciones sumadas de hexano y acetato de etilo con la fracción hidroalcohólica (1.5 mg EAG/g ps vs 9.16 mg EAG/g ps). Sin embargo, y aun cuando esta cantidad de CPT en la fracción hidroalcohólica es mayor al reportado previamente por Canto *et al.*, (2024), los valores de CPT siguen siendo insuficientes para atribuirle una actividad biológica relevante, especialmente en cuanto a su potencial antioxidante el cual fue evaluado tanto cualitativa y cuantitativamente. De la misma forma, el proceso de partición líquido-líquido del extracto crudo (EtOH:H₂O, 80:20 v/v) utilizando disolventes de polaridad ascendente, resultó en la obtención de dos fracciones (hexano y acetato de etilo) con contenidos de CPT menores (3.35 y 3.84 mg EAG/g ps) a los obtenidos para el extracto crudo.

Tabla 2. Rendimientos de extracción y contenido de fenoles totales de la cáscara de la semilla de ramón.

Solvente	Rendimiento (g) por cada 100 g de cáscara de la semilla	CPT (mg EAG/g ps)
EtOH	5.97	4.41
Acetato de etilo	2.49	1.10
Acetona:H₂O:ácido o acético (80:19:1)	7.20	1.35
EtOH:H₂O (80:20)	9.08	5.09

Tabla 3. Valores de CPT de extractos obtenidos por extracción sucesiva de la cáscara de la semilla de ramón.

Solvente	CPT (mg EAG/g ps)
Hexano	0.58
Acetato de etilo	0.86
EtOH:H₂O 8:2	9.16

3.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS CON DISOLVENTES TRADICIONALES

El bajo contenido de polifenoles totales en los extractos de la cáscara de ramón y las fracciones semipurificadas se comprobó al evaluar cualitativamente por CCD la presencia de metabolitos con actividad antioxidante, utilizando una solución de DPPH como revelador (Figura 10). La ausencia de actividad antioxidante se confirmó también al llevar a cabo el análisis cuantitativo de actividad antioxidante utilizando DPPH.

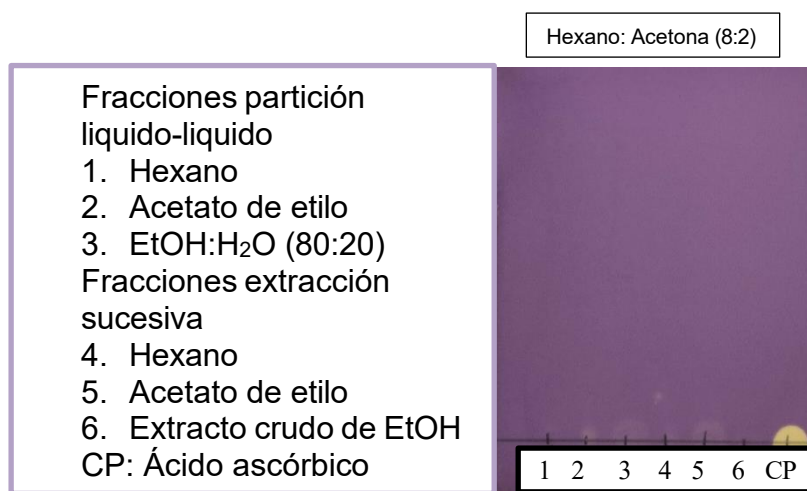


Figura 10. Análisis cromatográfico (TLC) del extracto crudo de la cáscara de la semilla de ramón y las fracciones semipurificadas.

3.3 EXTRACCION DE POLIFENOLES CON DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES)

Recientemente se reportó que el uso de disolventes eutécticos profundos (DES por sus siglas en inglés) favorece la extracción de polifenoles presentes en residuos agroindustriales, en comparación con disolventes convencionales (Ruesgas *et al.*, 2019). Con base a lo anterior, en este trabajo se evaluó la extracción de la cáscara de las semillas de ramón con tres mezclas de DES. Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los DES evaluados en el presente trabajo produjo un valor de CPT mayor utilizando disolventes convencionales polares como EtOH y EtOH:H₂O

(80:20). Sin embargo, los DES mostraron mayor eficiencia extractiva que disolventes de baja polaridad (hexano y acetato de etilo) y de polaridad intermedia (acetona:H₂O:ácido acético 80:19:1), como se detalla en las Tablas 2 y 3. y de mediana polaridad como la mezcla de acetona:H₂O:ácido acético (80:19:1). Aunque los tres sistemas DES incrementaron significativamente la extracción de CPT en comparación con los métodos menos polares, las concentraciones finales permanecieron notablemente inferiores a las alcanzadas con los disolventes hidroalcohólicos (Figura 11). Este comportamiento podría atribuirse a la alta viscosidad de la mezcla de DES pudiendo restringir la difusión de los polifenoles desde la matriz vegetal y reduciendo la eficiencia del proceso de extracción, así como también a la precipitación parcial de la muestra al añadirle el reactivo Folin-Ciocalteu lo que sugiere posibles interacciones no deseadas entre los componentes del DES y el reactivo.

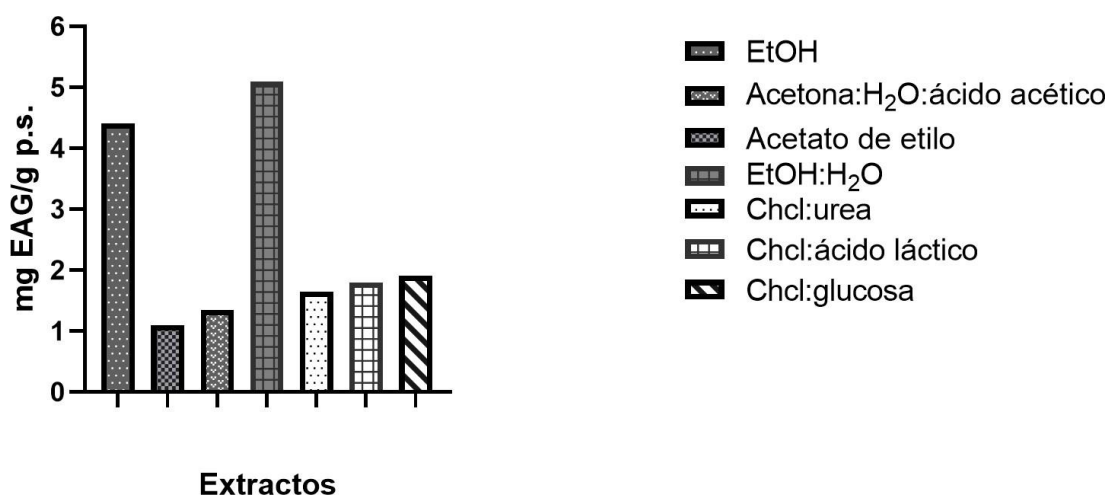


Figura 11. Comparación del contenido de Polifenoles Totales de los extractos con disolventes convencionales y DES.

3.4. ACTIVIDAD ANTIHELMITICA DE LOS EXTRACTOS

Se ha reportado que los extractos de residuos agroindustriales con polifenoles en su composición se han utilizado en la medicina veterinaria para el control de larvas (Mancilla *et al.*, 2021a). debido a lo anterior, se decidió evaluar la actividad antihelmíntica del extracto de la cáscara de la semilla de ramón utilizando dos modelos de *Haemonchus*

contortus in vitro: Prueba de Eclosión de Huevos (EHT) y Ensayo de Inhibición del Desenvaine Larval (LEIA).

El cribado de los diferentes extractos en la prueba de EHT mostró que, a una concentración de 3600 µg/ml, los extractos de EtOH y EtOH:H₂O (80:20) inhiben la eclosión de huevos de *H. contortus* en un 98% y 95% respectivamente (Figura 12), por lo que al cumplir con el parámetro de Mancilla *et al.*, 2021a del porcentaje de eclosión $\geq$ 70% estos extractos se tomaron en cuenta para la medición a concentraciones más bajas para medir su CE₅₀, lo que indicó que los dos extractos hidroalcohólicos provocaban que los huevos del parásito no continuaran a su fase larvaria. En cuanto a los extractos de acetato de etilo y acetona:H₂O:ácido acético (80:19:1) fueron descartados del ensayo dado que el %H fue menor a 70%, es decir había mayor presencia de L1. Estos valores son similares a los observados para el control positivo (benzimidazol; 99%) y mayores que los reportados por Santiago *et al.*, 2023 donde se evaluaron los extractos de plantas forrajeras como *B. alicastrum* y *Guazuma ulmifolia* frente a huevos de *H. contortus* a una concentración de 50 mg/ml donde se reportó 81.4% y 99.5% de porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos respectivamente, Aunque *G. ulmifolia* mostró un mayor porcentaje de inhibición (%H), la concentración empleada fue más alta que la de este estudio, lo que sugiere una mayor eficiencia de nuestro tratamiento. Estos resultados son particularmente relevantes considerando que los extractos evaluados mostraron baja actividad antioxidante y bajo contenido de polifenoles, lo que sugiere que la actividad antihelmíntica observada se debe a metabolitos secundarios no fenólicos como saponinas las cuales han mostrado eficacia contra huevos de NGI (Pérez *et al.*, 2014).

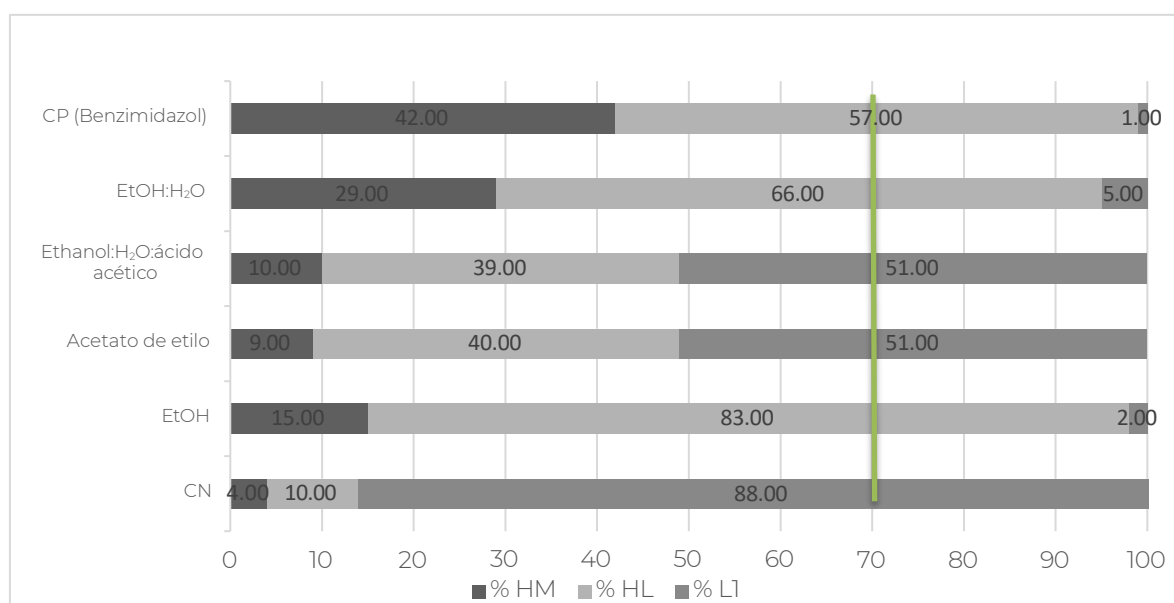


Figura 12. Resultados del cribado (promedio de las seis réplicas) de la evaluación de extractos de la cáscara de la semilla de ramón (2500 µg/ml) en la prueba de inhibición de la eclosión de huevos (EHT) de *H. contortus*. HM: Huevo morulado- HL: Huevo larvado- L1:larva 1.

De la misma forma, la evaluación de la actividad antihelmíntica de los extractos en la prueba de LEIT, mostró nuevamente que los extractos de EtOH y EtOH:H₂O (80:20), a 1200 µg/ml, inhiben el desenvaine de larvas de *H. contortus* en un 93% y 95%, respectivamente (Figura 13). El proceso de desenvaine larvario es un paso crítico en el ciclo de vida de *H. contortus*, ya que representa la transición de la fase de vida libre a la fase parasitaria dentro del hospedero. La inhibición de este proceso por parte de los extractos de cáscara de ramón podría traducirse en una reducción significativa de la carga parasitaria en condiciones *in vivo*, lo que representaría una ventaja potencial para el control de nematodos gastrointestinales en rumiantes. La actividad comparable con el control positivo sugiere un potencial considerable para el desarrollo de antihelmínticos alternativos a partir de productos naturales, especialmente en contextos donde la prevalencia de parásitos resistentes a los tratamientos existentes es una preocupación creciente.

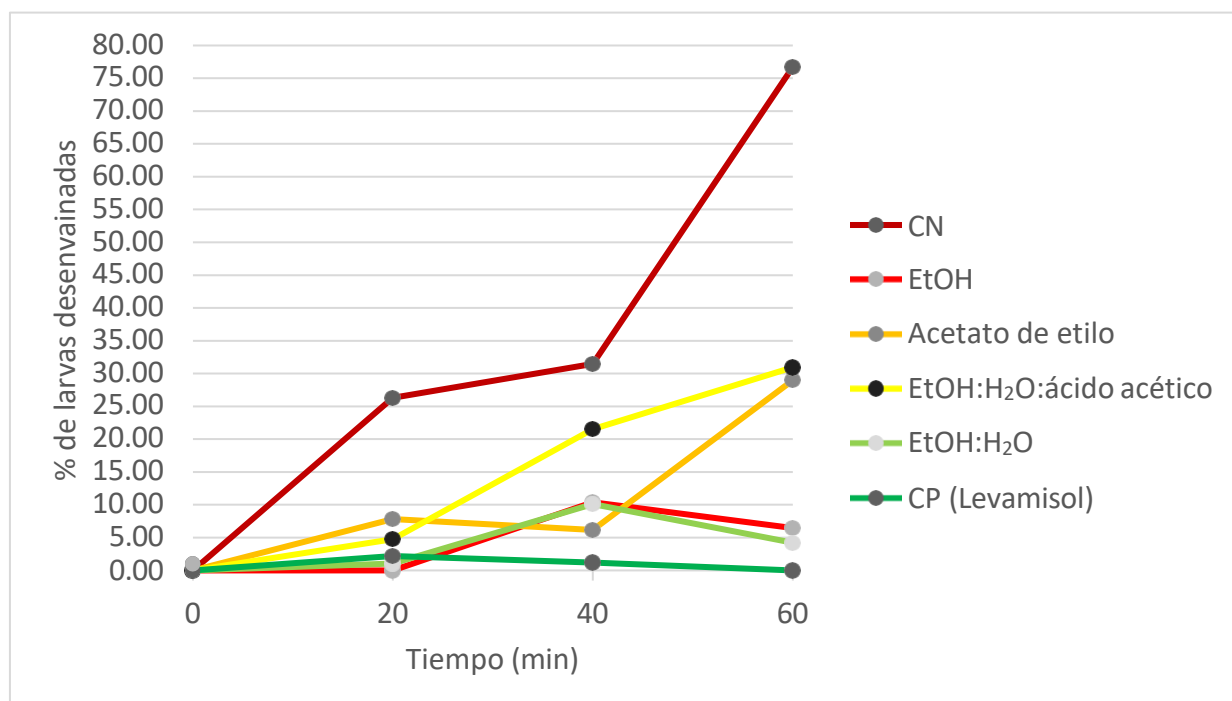


Figura 13. Resultados de lo de la inhibición del desenvaine de larvas (LEIT) de *H. contortus*, de los extractos de cáscara de semillas de ramón a 1200 µg/ml.

Con base en los resultados anteriores y debido a que los extractos de EtOH y EtOH:H₂O (80:20) presentaron una buena actividad antihelmíntica, se realizaron las pruebas y cálculos para la determinación de la CE₅₀ y CE₉₀ de ambos extractos.

Los resultados de las evaluaciones de EHT (Tabla 4) y LEIT (Tabla 5) demostraron que la actividad antihelmíntica del extracto de EtOH:H₂O (80:20) presenta una mayor actividad antihelmíntica en comparación con el extracto de EtOH puro, evidenciado por su menor CE₅₀. Esto indica que la mezcla hidroalcohólica es más efectiva a menores concentraciones. Esto puede deberse a que la adición de agua podría permitir una extracción completa de metabolitos sinérgicos que podrían no estar presentes en el extracto de etanol puro. El presente estudio demuestra que la cáscara de la semilla de ramón posee propiedades biológicas significativas contra *H. contortus*, con valores de CE₅₀ para la inhibición del desenvaine larvario mayores que los reportados para otros residuos agroindustriales, incluyendo la cáscara de *Theobroma cacao* variedades Azteca y Ceilán (CE₅₀ de 2171.6 y 1074.8 µg/mL, respectivamente) (Mancilla *et al.*, 2021), sugiriendo un mayor potencial antihelmíntico para el control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes.

Tabla 4. Concentración efectiva al 50% (CE₅₀) y 90% (CE₉₀) con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%) de los extractos de etanol y etanol:agua (80:20) contra huevos de *H. contortus*.

Extractos	CE ₅₀ (µg/mL)	95% CI (µg/mL)	CE ₉₀ (µg/mL)	95% CI (µg/mL)
EtOH	761.7 ^A	721.3-802.0	1670.0 ^A	1548.3-1791.7
EtOH:H ₂ O	454.6 ^B	425.2-484.1	1236.8 ^B	1119.5-1354.2

^{A,B} Las diferentes letras hacen una diferencia significativa (P < 0,05).

Tabla 5. Concentración efectiva al 50% (CE₅₀) y 90% (CE₉₀) con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%) de los extractos de etanol y etanol:agua (80:20) contra larvas de *H. contortus*.

Extractos	CE ₅₀ (µg/mL)	95% CI (µg/mL)	CE ₉₀ (µg/mL)	95% CI (µg/mL)
EtOH	291.5 ^A	244.5-338.5	1139.5 ^A	762.3-1516.7
EtOH:H ₂ O	225.0 ^A	193.1-256.7	905.8 ^A	663.8-1147.8

^{A,B} Las diferentes letras hacen una diferencia significativa (P < 0,05).

Para evaluar si la actividad antihelmíntica de los extractos está relacionada con la presencia de taninos, ambos extractos se evaluaron en presencia de polivinilpolipirrolidona (PVPP), un reconocido secuestrador de fenoles (Rojas, 1996). Los resultados de LEIT mostraron que mientras la actividad antihelmíntica del extracto etanol:agua (80:20) disminuía parcialmente, la actividad del extracto de etanol no tuvo diferencias significativas (Figura 14). Lo anterior sugiere que la actividad nematocida del extracto EtOH:H₂O (80:20) podría deberse al secuestro de fenoles como lo son los taninos condensados, que han sido ampliamente documentados como compuestos con actividad contra nematodos gastrointestinales (Quijada *et al.*, 2018); sin embargo, dado que la disminución de la actividad es solo parcial, la naturaleza química de los metabolitos responsables de la actividad antiparasitaria requiere más estudios para ser elucidada. En tanto que la actividad nematocida del extracto de EtOH se puede deber a metabolitos presentes en el extracto, diferentes a los taninos condensados. Ya han sido reportadas varias especies de plantas cuya actividad AH en la inhibición del desenvaine de *H. contortus* no está relacionada con los taninos condensados. Como ejemplo, *Annona spp.*, *Coffea arabica* y *Carya illinoensis* han demostrado actividad inhibitoria

aun después de un tratamiento con PVPP, indicando que existen otros metabolitos secundarios con actividad AH (Castañeda, 2014; Vargas, 2014).

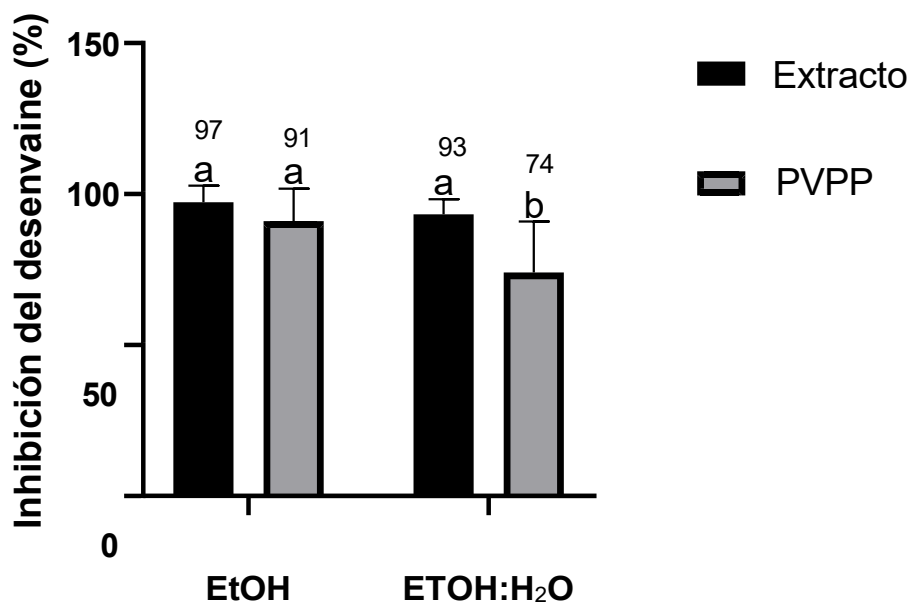


Figura 14. Porcentaje medio de inhibición de la desenvaine de larvas infectivas de *H. contortus* resultante de incubaciones con extractos de a una concentración de 1200 µg/mL de PBS con y con PVPP. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$).

Con base a los resultados de la actividad nematocida y considerando el posible uso de la cáscara de la semilla de ramón como suplemento en la alimentación de ovinos, se evaluó la actividad citotóxica a través de una prueba *in vitro* de actividad hemolítica de los extractos crudos, considerando en este estudio que un nivel de efecto no tóxico era inferior al 10 % de hemólisis. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto etanólico presenta una actividad hemolítica dependiente de la concentración y que en la concentración menor (25 µg/ml) la actividad hemolítica es menor al 10% (Figura 15). Por otra parte, el extracto EtOH:H₂O (80:20) mostró que su actividad hemolítica es independiente de la concentración evaluada, sugiriendo una posible actividad citotóxica que puede deberse a la presencia de saponinas.

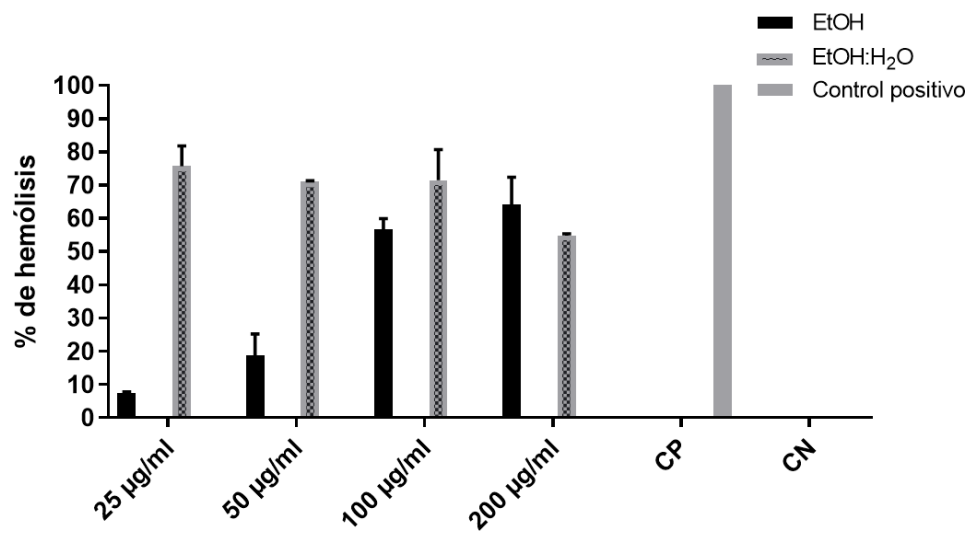


Figura 15. Actividad hemolítica de los extractos de la cascara de la semilla de ramón con actividad nematocida frente a *H. contortus*.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio evidencian que la extracción asistida por ultrasonido supera en eficiencia a la maceración convencional para la obtención de compuestos fenólicos totales (CPT) a partir de la cáscara de semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*), residuo agroindustrial de interés. Pese al bajo contenido polifenólico observado, corroborado por la escasa actividad antioxidante de los extractos y a la ausencia de ventajas significativas al emplear disolventes eutécticos profundos (DES), el material demostró un efecto nematocida destacable específicamente con los extractos de EtOH y EtOH:H₂O (80:20). Además de una baja citotoxicidad en el extracto etanólico, lo que sugiere su potencial como alternativa sostenible en el control de nematodos.

PESPECTIVAS

En estudios sucesivos se propone optimizar la extracción de metabolitos bioactivos de tipo fenol de usando diferentes mezclas de DES.

A pesar de su baja concentración de CPT se sugiere explorar diferentes métodos de análisis de actividad antioxidante como el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP) o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)).

Ante la buena actividad antihelmíntica en los extractos hidroalcohólicos se propone validar la eficacia de la actividad nematocida en condiciones reales de producción, evaluando dosis óptimas, efectos en la salud animal y posibles sinergias con otros nutraceuticos.

REFERENCIAS

- Addina, N. (2022). Determination of phytochemical in the seed and seed coat of *Gnetum gnemon* L. Melimjo fruit. *Journal of Agricultural Science*, 15(3), 45-60. Universiti Malaysia Kelantan.
- Aguiar, A., Andrade, N., da Gloria, Y., & Toledo Filho, R. (2022). Influence of the use of silicate-based sealer on the physical-mechanical properties of wood bio-concrete under natural aging. *Construction and Building Materials*, 320, 126234.
- Aguilar-Marcelino, L., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., et al. (2024). Research on chemical compounds from edible mushrooms for the control of gastrointestinal nematodes and phytoparasites. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27, Art No. 011.
- Al Juhaimi, F., Özcan, M.M., Uslu, N., & Ghafoor, K. (2018). The effect of drying temperatures on antioxidant activity, phenolic compounds, fatty acid composition and tocopherol contents in citrus seed and oils. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 190-197.
- Álvarez Valencia, L. H., García Reyes, R. B., Ulloa Mercado, R. G., Arellano Gil, M., & García González, A. (2019). Potencial biotecnológico para la valorización de residuos generados en granjas porcinas y cultivos de trigo. *Entreciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 7(21).
- Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: Principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., & Hoste, H. (2008). In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 155(3-4), 279-285.
- Anila, A., & Mohammed, F. (2022). Effect of temperatures on polyphenols during extraction. *Applied Sciences*, 12(4), 2107.

Arockianathan, P. M., Rajalakshmi, K., & Nagappan, P. (2019). Proximate composition, phytochemicals, minerals and antioxidant activities of *Vigna mungo* L. seed coat. *Bioinformation*, 15(8), 579-585.

Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109.

Barragán, B., Téllez, Y. & Laguna, A. (2008). Utilización de residuos agroindustriales. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 44-50.

Belmonte-Herrera, B. H., Domínguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Preciado-Saldaña, A. M., Salazar-López, N. J., López-Martínez, L. X., Yahia, E. M., Robles-Sánchez, R. M., & González-Aguilar, G. A. (2022). Lesser-consumed tropical fruits and their by-products: Phytochemical content and their antioxidant and anti-inflammatory potential. *Nutrients*, 14(17), 3663.

Berg, C. (1972). Olmediaeae Brosimeae (Moraceae). *Flora Neotropica*, 7, 1-228.

Bertrán-Llorens, S., Zhou, W., Palazzolo, M. A., Colpa, D. L., Euverink, G. J. W., Krooneman, J., & Deuss, P. J. (2024). ALACEN: A holistic herbaceous biomass fractionation process attaining a xylose-rich stream for direct microbial conversion to bioplastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12 (20), 7724-7738.

Bhat, R. (2011). The disease-preventive potential of some popular and underutilized seeds. In G. Paliyath, M. Bakovic, & K. Shetty (Eds.), *Functional foods, nutraceuticals, and degenerative disease prevention* (pp. 171-212). Wiley-Blackwell.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=b_rosimum-alicastrum [Acceso: 08 junio 2023].

Bouazzaoui, N., Bouajila, J., Camy, S., Mulengi, J. K., & Condoret, J. S. (2018). Fatty acid composition, cytotoxicity and anti-inflammatory evaluation of melon (*Cucumis*

melo L. *Inodorus*) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Separation Science and Technology*, 53(16), 2622–2627.

Cabrera Rodríguez, E., León Fernández, V., Montano, A., & Dopico, D. (2016). Caracterización de residuos agroindustriales con vistas a su aprovechamiento. *Centro Azúcar*, 43(4), 27-35.

Canto, J., Pat-Moreno, N., Moo-Huchin, V., Pérez-Pacheco, E., Chay-Canul, A., Estrada León, R., Sauri, E., & Rios-Soberanis, C. (2024). Comparison of proximate composition, phytochemical contents, antioxidant capacity and polyphenols in *Brosimum alicastrum* leaf, fruit and seed. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 34.

Carter, C. (2015). *Chemical and functional properties of Brosimum alicastrum seed powder (Maya nut, Ramón nut)*. Master's Thesis. Clemson University.

Carvajal, S. (2007). *Moraceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes* (Vol. 147). Instituto de Ecología A.C.

Carvalho, C. O., Chagas, A. C. S., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L. G., Chaves, F. C. M., Stephan, M. P., Bizzo, H. R., & Amarante, A. F. T. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*, 183, 260-268.

Castañeda-Ramírez, G. S. (2014). *Evaluación in vitro de Annona squamosa, A. muricata y A. reticulata contra Haemonchus contortus* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Castañeda-Ramírez, G. S., Rodríguez-Labastida, M., Ortiz-Ocampo, G. I., González-Pech, P. G., Ventura-Cordero, J., Borges-Argáez, R., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., & Mathieu, C. (2018). An in vitro approach to evaluate the nutraceutical value of plant foliage against *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, 117, 3979-3991.

Castañeda-Ramírez, G. S., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., González-Pech, P. G., Parra-Tabla, V. P., & Mathieu, C. (2017). Is there a negative association

between the content of condensed tannins, total phenols, and total tannins of tropical plant extracts and in vitro anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs? *Parasitology Research*, 116, 3341-3348.

Castañeda-Ramírez, G. S., Torres-Acosta, J. F. J., Sánchez, J. E., Mendoza-de-Gives, P., González-Cortázar, M., Zamilpa, A., Al-Ani, L. K. T., Sandoval-Castro, C., Soares, F. E. F., & Aguilar-Marcelino, L. (2020). The possible biotechnological use of edible mushroom bioproducts for controlling plant and animal parasitic nematodes. *BioMed Research International*, 2020, 6078917.

Castillo-Avila, G. M., García-Sosa, K., & Peña-Rodríguez, L. M. (2009). Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidaefolia*. *Natural Product Communications*, 4(1), 83-86.

Comisión para la Cooperación Ambiental. (2017). *Caracterización y gestión de los residuos orgánicos en América del Norte: Informe sintético*. Montreal: CCA. <https://www.cec.org/wp-content/uploads/2017/09/Caracterizacion-y-gestion-de-los-residuos-organicos-en-America-del-Norte.pdf>

Chan-Pérez, J. I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Castañeda-Ramírez, G. S., Vilarem, G., Mathieu, C., & Hoste, H. (2017). Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L3 larvae. *Veterinary Parasitology*, 240, 11-16.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. (2021). *Revalorización de residuos agroindustriales: Caso Jalisco*. <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Revalorizacion-de-residuos-agroindustriales--Caso-Jalisco/194> [Acceso: 26 abril 2023]

CICY. (2023). *Árbol de ramón*. <https://www.cicy.mx/sitios/arbol-de-ramon> [Acceso: 26 abril 2023]

Ciupei, D., Colişar, A., Leopold, L., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. M. (2024). Polyphenols: From classification to therapeutic potential and bioavailability. *Foods*, 13(24), 4131.

da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.

Diario Oficial de la Federación. (2003). *Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/131748/23_LEY_GENERAL_PARA_LA_PREVENCI_N_Y_GESTI_N_INTEGRAL_DE_LOS_RESIDUOS.pdf [Acceso: 11 abril 2023]

Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M. J., duCellier, J., & Duke, P. A. K. (2002). *Handbook of medicinal herbs* (2nd ed.). CRC Press.

Dupont, J., Souza, R. F. de, & Suarez, P. A. Z. (2002). Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. *Chemical Reviews*, 102(10), 3667-3692.

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Dubreucq, E., Lortie, R., & Villeneuve, P. (2013). Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chemistry*, 15(8), 2275-2282.

Galicia-Aguilar, H. H., Rodríguez-González, L. A., Capetillo-Leal, C. M., Cámara Sarmiento, R., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., & Torres-Acosta, J. F. J. (2012). Effects of *Havardia albicans* supplementation on feed consumption and dry matter digestibility of sheep and the biology of *Haemonchus contortus*. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 178-184.

Ganzler, K., Salgó, A., & Valkó, K. (1986). Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*, 371, 299-306.

Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988-4994.

Gharibzahedi, S. M. T., Smith, B., & Guo, Y. (2019). Ultrasound-microwave assisted extraction of pectin from fig (*Ficus carica* L.) skin: Optimization, characterization and bioactivity. *Carbohydrate Polymers*, 222, 114992.

Gil, J. (2012). *Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización* [Tesis de Maestría]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Gordobil, O., Olaizola, P., Banales, J. M., & Labidi, J. (2020). Ligninas de subproductos agroindustriales como ingredientes naturales para cosméticos: Estructura química y actividades de protección solar y citotóxica in vitro. *Molecules*, 25(5), 1131.

Goula, A. M., Thymiatis, K., and Kaderides, K. (2016). Valorization of grape pomace: drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. *Food Bioprod. Process.* 100, 132–144.

Goyeneche, R., Fanovich, A., Rodriguez Rodrigues, C., Nicolao, M. C., & Di Scala, K. (2018). Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from radish leaves: Yield, antioxidant capacity and cytotoxicity. *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 78-83.

Guerrero, R., & Valenzuela, L. (2011). Agroindustria y medio ambiente. *Trilogía: Ciencia, Tecnología y Sociedad*, 23(33), 63-83.

Hanafy, S. M., Abd El-Shafea, Y. M., Saleh, W. D., & Fathy, H. M. (2021). Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 80.

Hernández-González, O., Vergara-Yoisura, S., & Larqué-Saavedra, A. (2014). Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula. *Bothalia: A Journal of Botanical and Life Sciences Research*, 44(6), 70-81.

Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria, A., Morales, A. A., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2019). Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 325-333.

Hoste, H., Meza-Ocampos, G., Marchand, S., Sotiraki, S., Sarasti, K., Blomstrand, B. M., Williams, A. R., Thamsborg, S. M., Athanasiadou, S., Enemark, H. L., Torres-Acosta, J.

F. J., Mancilla-Montelongo, G., Sandoval-Castro, C., Costa-Junior, L. M., Louvandini, H., Sousa, D. M., Salminen, J.-P., Karonen, M., Engstrom, M., Charlier, J., Niderkorn, V., & Morgan, E. R. (2022). Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants. *Parasite*, 29, 10.

Huang, J., Guo, X., Xu, T., Fan, L., Zhou, X., & Wu, S. (2019). Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products. *Journal of Chromatography A*, 1598, 1-19.

Hussain, A., Khan, M. N., Iqbal, Z., Sajid, M. S., & Khan, M. K. (2011). Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), 92-99.

Huber, G. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2009). Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts. *Journal of Food Science*, 74(9), C693-C700.

Iqbal, Z., Lateef, M., Akhtar, M. S., Ghayur, M. N., & Gilani, A. H. (2006). In vivo anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(2), 285-287.

Islam, M. R., Kamal, M. M., Kabir, M. R., Hasan, M. M., Haque, A. R., & Hasan, S. M. K. (2023). Phenolic compounds and antioxidants activity of banana peel extracts: Testing and optimization of enzyme-assisted conditions. *Measurement: Food*, 10, 100085.

Jackson, F., & Hoste, H. (2010). In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In P. E. Vercoe, H. P. S. Makkar, & A. C. Schlink (Eds.), *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies* (pp. 25-45). Springer Science+Business Media.

Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113.

Lang, G. H., Lindemann, I. D. S., Ferreira, C. D., Hoffmann, J. F., Vanier, N. L., & de Oliveira, M. (2019). Effects of drying temperature and long-term storage conditions on black rice phenolic compounds. *Food Chemistry*, 287, 197-204.

Larqué-Saavedra, A. (2014a). *Brosimum alicastrum*. Ramón. *Gaceta*, 6(49), 6-33.

Larqué-Saavedra, A. (2014b). El sector forestal en apoyo a la "cruzada contra el hambre": La inclusión de *Brosimum alicastrum* (ramón) como estudio de caso. *Revista Forestal XXI*, 17(2), 1-15.

Larqué-Saavedra, A. (2014c). *Tecnología para la producción de harina de ramón*. Arbolramon.com. <https://arbolramon.com/index.php/noticias-y-articulos/87-tecnologia-para-la-produccion-de-harina-de-ramon> [Recuperado: 16 junio 2025].

Lomba, L., García, C. B., Ribate, M. P., Giner, B., & Zuriaga, E. (2021). Applications of deep eutectic solvents related to health, synthesis, and extraction of natural based chemicals. *Applied Sciences*, 11(21), 10156.

Londoño-Londoño, J., de Lima, V. R., Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., et al. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chem.* 119, 81–87. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.075

Manasa, V., Padmanabhan, A., & Anu Appaiah, K. A. (2021). Utilization of coffee pulp waste for rapid recovery of pectin and polyphenols for sustainable material recycle. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 120, 762–771.

Mancilla-Montelongo, M. G., Castañeda-Ramírez, G. S., Gaudin-Barbier, E., Canul-Velasco, M. L., Chan-Pérez, J. I., De La Cruz-Cortazar, A., Mathieu, C., Fourquaux, I., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Ventura-Cordero, J., González-Pech, P. G., & Torres-Acosta, J. F. J. (2021a). In vitro evaluation of the nutraceutical potential of Theobroma cacao pod husk and leaf extracts for small ruminants. *Acta Parasitologica*, 66, 1122-1136.

Mancilla-Montelongo, M. G., Sandoval-Castro, C. A., & Torres-Acosta, J. F. J. (2021b). Subproductos agroindustriales: alimentos nutraceuticos para cabras y borregos. *Bioagrociencias*, 14, 32-40.

Mawa, S., Husain, K., & Jantan, I. (2013). *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 974256.

Mejías, N., Orozco, E., & Galáan, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ingeniería y Tecnología*, 2, 27-41.

Méndez-Ortiz, F. A., Sandoval-Castro, C. A., Ventura-Cordero, J., Sarmiento-Franco, L. A., Santos-Ricalde, R. H., & Torres-Acosta, J. F. J. (2019). Gymnopodium floribundum fodder as a model for the in vivo evaluation of nutraceutical value against Haemonchus contortus. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6), 1591-1599.

Mendoza-Arroyo, G. E., Morón-Ríos, A., González-Espinosa, M., Alayón-Gamboa, J. A., & Macario-Mendoza, P. A. (2020). La supervivencia y desarrollo de plántulas de Brosimum alicastrum (Moraceae) y Psidium sartorianum (Myrtaceae) difieren en condiciones de inundación. *Acta Botánica Mexicana*, 127, e1548.

Moreira, S. A., Alexandre, E. M. C., Pintado, M., & Saraiva, J. A. (2019). Effect of emergent nonthermal extraction technologies on bioactive individual compounds profile from different plant materials. *Food Research International*, 115, 177-190.

Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L. M., Hoste, H., & Ferre, I. (2013). In vitro effect of heather extracts on Trichostrongylus colubriformis eggs, larvae and adults. *Veterinary Parasitology*, 197(3-4), 586-594.

Moreno, F. C., Gordon, I. J., Knox, M. R., Summer, P. M., Skerrat, L. F., Benvenuti, M. A., & Saumell, C. A. (2012). Anthelmintic efficacy of five tropical native Australian plants against Haemonchus contortus and Trichostrongylus colubriformis in experimentally infected goats (Capra hircus). *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), 237-243.

Naciones Unidas. (2023). *La Agenda para el Desarrollo Sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/development-agenda/> [Acceso: 26 abril 2023]

Neglo, D., Tettey, C. O., Essuman, E. K., Kortei, N. K., Boakye, A. A., Hunkpe, G., Amarh, F., Kwashie, P., & Devi, W. S. (2020). Comparative antioxidant and antimicrobial activities of the peels, rind, pulp and seeds of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. *Scientific African*, 11, e00582.

Ordoñez, E. S., Leon-Arevalo, A., Rivera-Rojas, H., & Vargas, E. (2019). Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 175-183.

Ortiz, M., Azañón, V., Melgar, M., & Elias, L. (1995). The corn tree (*Brosimum alicastrum*): A food source for the tropics. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 77, 135-146.

Ortíz-Ocampo, G., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Capetillo-Leal, C., González-Pech, P. G., & Santos-Ricalde, R. H. (2016). In vitro and in vivo anthelmintic effect of *Coffea arabica* residues against an *Haemonchus contortus* isolate with low susceptibility to tannins. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19(1), 41-50.

Pérez-Pérez, C., Hernández-Villegas, M. M., de la Cruz-Burelo, P., Bolio-López, G. I., & Hernández-Bolio, G. I. (2014). Efecto antihelmíntico in vitro del extracto metanolico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(1), 105-111.

Perra, M., Cuenca-Lombraña, A., Bacchetta, G., Manca, M. L., Manconi, M., Maroun, R. G., Muntoni, A., Tuberoso, C. I. G., Gil, K. A., & De Gioannis, G. (2022). Combining Different Approaches for Grape Pomace Valorization: Polyphenols Extraction and Composting of the Exhausted Biomass. *Sustainability*, 14(17), 10690.

Peters, C. M., & Pardo-Tejeda, E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): Uses and potential in Mexico. *Economic Botany*, 36(2), 166-175.

Prado-Acebo, I., Cubero-Cardoso, J., Lu-Chau, T. A., & Eibes, G. (2024). Integral multi-valorization of agro-industrial wastes: A review. *Waste Management*, 183, 42-52.

Puértolas, E., Koubaa, M., & Barba, F. J. (2016). An overview of the impact of electrotechnologies for the recovery of oil and high-value compounds from vegetable oil industry: Energy and economic cost implications. *Food Research International*, 80, 19-26.

Putnik, P., Bursać-Kovačević, D., Režek-Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., & Shpigelman, A. (2017). Innovative "green" and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from Citrus wastes: A review. *Molecules*, 22(5), 680.

Quijada, J., Drake, C., Gaudin, E., El-Korso, R., Hoste, H & Mueller-Harvey, I. (2018). Condensed Tannin Changes along the Digestive Tract in Lambs Fed with Sainfoin Pellets or Hazelnut Skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (9), 2136-2142.

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

Quiroz-Reyes, C. N., Aguilar-Méndez, M. A., Ramírez-Ortíz, M. E., & Ronquillo-De Jesús, E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 11-18.

Ramírez-Sánchez, S., Ibáñez, D., Gutierrez, M., Ortega, M., García, L., & Larqué, A. (2017). El ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) una alternativa para la seguridad alimentaria en México. *Agroproductividad*, 10(1), 80-83.

Rodríguez, B. C. G., de Mello, B. S., Araujo, M. L. G. C., da Silva, G. H. R., & Sarti, A. (2021). Melaza de soja como materia prima para la generación sostenible de biometano mediante un reactor anaeróbico de alta velocidad. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 105226.

Rojas, J. (1996). *Uso de la polivinilpolipirrolidona (PVPP) para eliminar fenoles que deterioran la calidad de vinos blancos [Sauvignon blanc y Sauvignonasse]* [Tesis de grado]. Universidad de Talca.

Rojas-González, A. F., Flórez-Montes, C., & López-Rodríguez, D. F. (2019). Prospectivas de aprovechamiento de algunos residuos agroindustriales. *Revista Cubana de Química*, 31(1), 31-52.

Rončević, Z., Bajić, B., Dodic, S., Grahovac, J., Pajović-Šćepanović, R., & Dodić, J. (2019). Optimización de la producción de bioetanol a partir de melaza de soja utilizando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Doblado Indiana*, 73, 1-12.

Ruales-Salcedo, A. V., Rojas-González, A. F., & Cardona-Alzate, C. A. (2017). Obtención de compuestos fenólicos a partir de residuos de uva isabella (*Vitis labrusca*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrias*, 2, 73-79.

Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591-3601.

Ruesgas-Ramón, M., Suárez-Quiroz, M. L., González-Ríos, O., Baréa, B., Cazals, G., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2019). Biomolecules extraction from coffee and cocoa by- and co-products using deep eutectic solvents. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 100(1), 81-91.

Sahu, P. K., Cervera-Mata, A., Chakradhari, S., Patel, K. S., Towett, E. K., Quesada-Granados, J. J., Martín-Ramos, P., & Rufián-Henares, J. A. (2022). Seeds as Potential Sources of Phenolic Compounds and Minerals for the Indian Population. *Molecules*, 27(10), 3184.

Salazar-López, N. J., Barco-Mendoza, G. A., Zuñiga-Martínez, B. S., Domínguez-Avila, J. A., Robles-Sánchez, R. M., Ochoa, M. A. V., & González-Aguilar, G. A. (2022). Single-Cell Protein Production as a Strategy to Reincorporate Food Waste and Agro By-Products Back into the Processing Chain. *Bioengineering*, 9(11), 623.

Salazar-López, N. J., Enríquez-Valencia, S. A., Zuñiga-Martínez, B. S., & González-Aguilar, G. A. (2023). Residuos agroindustriales como fuente de nutrientes y compuestos fenólicos. *Epistemos*, 17(34), 60-69.

Santiago, I., Lara, A., González, R., Mendoza, P., Delgado, E., Maldonado, E., Garedaghi, Y., & Olmedo, A. (2023). Evaluación antihelmíntica de cuatro extractos de árboles forrajeros contra el nematodo *Haemonchus contortus* bajo condiciones in vitro. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 14(4), 855-873.

Sarmiento-Franco, L., Montfort-Grajales, S., & Sandoval-Castro, C. A. (2022). La semilla del árbol ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz): alternativa alimentaria energética para animales de producción y seres humanos. *Bioagrociencias*, 14.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Bio-Tecnología*, 16(2), 14-16.

Sharma, R. (2024). Agro-industrial waste to energy - Sustainable management. *Sustainable Materials and Technologies*, 41, e01117.

Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Smith, R. M. (2003). Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 3-27.

Soquetta, M. B., Terra, L. D. M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 400-412.

Subiria-Cueto, R., Larqué-Saavedra, A., Reyes-Vega, M. L., De la Rosa, L. A., Santana-Contreras, L. E., Gaytán-Martínez, M., & Martínez-Ruiz, N. R. (2019). *Brosimum alicastrum* Sw. (Ramón): An alternative to improve the nutritional properties and functional potential of the wheat flour tortilla. *Foods*, 8(12), 613.

Stanisavljević, N. S., Ilić, M. D., Matić, I. Z., Jovanović, Ž. S., Čupić, T., Dabić, D. Č., & Tešić, Ž. Lj. (2016). Identification of phenolic compounds from seed coats of differently colored European varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and characterization of their antioxidant and in vitro anticancer activities. *Nutrition and Cancer*, 68(6), 988-1000.

Valdez-Morales, M., Espinosa-Alonso, L. G., Espinoza-Torres, L. C., Delgado-Vargas, F., and Medina-Godoy, S. (2014). Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5281–5289. doi: 10.1021/jf5012374

Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15-29.

Vargas-Magaña, J., Torres-Acosta, J., Aguilar-Caballero, A., Sandoval-Castro, C., Hoste, H., & Chan-Perez, J. (2014). Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology*, 206(3-4), 322-327.

von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., & Wirtherle, N. (2009). Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research*, 105(3), 825-834.

Vučurović, D., Bajić, B., Trivunović, Z., Dodić, J., Zeljko, M., Jevtić-Mučibabić, R., & Dodić, S. (2024). Utilización biotecnológica de residuos y subproductos agroindustriales: producción sostenible de biosurfactantes. *Foods*, 13(5), 711.

Willemann, J. R., Escher, G. B., Kaneshima, T., Furtado, M. M., Sant'Ana, A. S., Vieira do Carmo, M. A., Azevedo, L., & Granato, D. (2020). Response surface optimization of phenolic compounds extraction from camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed coat based on chemical properties and bioactivity. *Journal of Food Science*, 85(8), 2358-2367.

Yafetto, L., Odamtten, G., & Wiafe-Kwagyan, M. (2023). Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. *Heliyon*, 9(4), e14814.

Yaneva, T. G., Wiczowski, W., Marchev, A. S., Iserliyska, D., Georgiev, M. I., & Tomlekova, N. B. (2024). Evaluación de polifenoles sintetizados en semillas maduras de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de líneas mutantes avanzadas. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5638.

Yi, T., Chen, Q., He, X., So, S., Lo, Y., Fan, L., Xu, J., Tang, Y., Zhang, J., Zhao, Z., & Chen, H. (2013). Chemical quantification and antioxidant assay of four active components in *Ficus hirta* root using UPLC-PAD-MS fingerprinting combined with cluster analysis. *Chemistry Central Journal*, 7, 115.

Zaldivar-Ortega, A. K., Barrera-Jiménez, J. A., Cenobio-Galindo, A. de J., Pérez-Soto, E., Franco-Fernández, M. J., & Campos-Montiel, R. G. (2023). Potencial uso de la cáscara y semilla de aguacate como fuente de compuestos bioactivos con actividades funcionales para un desarrollo sustentable. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 9(18), 30-33.