

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL



**Actividad antioxidante de extractos de plantas del
semidesierto mexicano y su efecto sobre *Erwinia
amylovora***

Por:

Joaquín Hernández Escamilla

TESIS

**Presentada como Requisito Parcial para Obtener el
Título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Febrero de 2013

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Actividad antioxidante de plantas del semidesierto Mexicano y su
efecto sobre *Erwinia amylovora***

Presentado por:

JOAQUIN HERNANDEZ ESCAMILLA

Tesis

**Que se somete a la consideración del comité H. Jurado Examinador como
requisito parcial para Obtener el Título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité

Director Interno



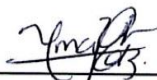
Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

Director externo



Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Asesor Interno



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor externo



M.C. Emilio Ochoa Reyes

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Actividad antioxidante de plantas del semidesierto Mexicano y su
efecto sobre *Erwinia amylovora*

Presentado por:

JOAQUIN HERNANDEZ ESCAMILLA

Tesis

Que se somete a la consideración del comité H. Jurado Examinador como
requisito parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

En virtud de haber cumplido íntegramente los requisitos de la comisión de
tesis y monografías.

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité

Presidente

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Vocal

Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

Vocal

Dr. Cristóbal Noé Aguilar Gonzales

Vocal suplente

Dr. Antonio Aguilera Carbó

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Dr. Ramiro Lopez Trujillo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico,
Febrero de 2013



El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas en el proyecto “***Desarrollo de un producto antifúngico de origen orgánico e inductor de resistencia en cultivos hortícolas***” con clave **171365**, elaborado en el programa de cooperación entre las empresas **Biorganix Mexicana SA de CV**, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y la Universidad Autónoma de Coahuila. El proyecto fue financiado por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la convocatoria de FONDO DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA, SECRETARÍA DE ECONOMÍA-CONACYT-2011-C02.

Los evaluadores de esta investigación fueron los siguientes.

Dr. Heliodoro De La Garza Toledo

Dr. Cristóbal Noé Aguilar Gonzales

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

M.C. Emilio Ochoa Reyes

“La vida es una oportunidad, aprovéchala.

La vida es un sueño, hazlo realidad.

La vida es un desafío, enfréntalo.”

Madre Teresa de Calcuta

Agradecimientos

Siempre soñé con ser alguien en la vida, una persona de bien, que pudiera ser tomado como ejemplo por los demás, hoy es una realidad. A lo largo de este camino se presentaron diversos momentos algunos alegres otros tristes y difíciles pero al final y con la ayuda de varias personas logre esta meta la cual me llena de satisfacción, por tal motivo a continuación ofrezco mi gratitud a quienes de diversas formas me ayudaron a alcanzar esta meta.

*En primer lugar a **Díos** porque siempre ha estado conmigo cuidando de mí, siendo mi guía, mi fortaleza y mi soporte ante las adversidades que se han presentado a lo largo de mi vida, gracias señor Jesús.*

*A mi **Alma Mater** por haberme acogido durante estos cuatro años y medio, por ser parte mi formación profesional, por proporcionarme alimentos y hogar, fueron muchos los momentos que me regalo esta magnífica casa de estudios a quien siempre pondré en alto y la llevare en mi corazón, eternamente agradecido. Buitre por siempre.*

*Al **Dr. Heliodoro de la Garza Toledo**, por todo su apoyo y por depositar la confianza en mí para la realización de este trabajo, además por todos sus consejos, enseñanzas en el aula, pero más que eso por ser más que mi profesor sino por el gran amigo que es para mí lo cual es más importante, muchas gracias Doc.*

Al Dr. Cristóbal Noé Aguilar González por haberme dado la oportunidad de trabajar dentro de su grupo de investigación, gracias por su apoyo incondicional durante este tiempo, pero más que nada gracias por su asesoría, paciencia, comprensión y gran ayuda para poder culminar este trabajo.

Al MC. Emilio Ochoa Reyes por todo el apoyo moral, económico cuando lo necesite, por sus consejos, asesoría y ayuda para este trabajo, por la confianza depositada en mí, pero más que nada por su amistad, muchas gracias INGE. Siempre estaré agradecido con usted y que siga la bohemia, los proyectos y nuestra amistad.

A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez por brindarme su apoyo en la realización de este trabajo. Por haberme transmitido sus conocimientos a lo largo de la carrera. Gracias doctora por su apoyo y su amistad.

A la MC. Karina Cruz Aldaco por su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo, muchas gracias Karina.

Al Dr. Francisco Castillo Reyes por su gran apoyo y asesorías para la elaboración de este trabajo, porque con gran profesionalismo me dedico parte de su tiempo y espacio para darme valiosos consejos de cómo seguir con este trabajo buscando que saliera muy bien. Muchas gracias Doc.

Al MC. Romeo Rojas Molina por su gran apoyo y asesorías en la realización de este trabajo, muchas gracias maestro.

Al Dr. Claudio Ríos Velasco por su apoyo técnico y proporción de material de trabajo, muchas gracias doctor.

Al MC, David Ignacio Berlanga por su apoyo técnico y proporción de material de trabajo, muchas gracias maestro.

Al Dr. Antonio Aguilera Carbo (Doc. Tony) por su apoyo y amistad en momentos importantes. Muchas gracias Doc.

Al MC. Oscar Noé Reboloso Padilla por compartirme parte de sus conocimientos a lo largo de la carrera, pero más que eso por su amistad, gracias por todo mi estimado Químico.

Al MC. Gerardo Sánchez Martínez por impartirme sus conocimientos matemáticos, pero sobre todo por su amistad, consejos y pláticas, gracias carnal.

Al Ing. Favian Hernández Ángel (Campeón) porque a lo largo de la carrera forjamos una amistad verdadera y un gran equipo de trabajo. Además por ser mi acompañante de bohemias y parrandas. Amigo muchas gracias.

A mis amigas Ing. Cecilia García, Ing. Anayeli Jiménez y Leticia García (Ceci, Naye y Lety) por su amistad, porque cuando las necesite siempre estuvieron ahí conmigo para darme ánimos, además de que a lo largo de la carrera logramos construir un sólido y exitoso equipo de trabajo. Gracias amigas.

A Cesar Tígerina Guerrero (el Tíge) por su valiosa amistad, por todos los momentos en los que convivimos, por darme su apoyo en momentos complicados, por andar en la bohemia, carnes asadas, parrandas. Gracias carnal.

A mi prima Luz Ariana Sedano Morales por su cariño, apoyo y por haberme prestado su computadora para la realización de este trabajo, muchas gracias hija. Te quiero mucho.

A mi primo Aarón Hernández Andrade (Chuvila) por su apoyo, cariño y por ser un gran hermano y el primo que cualquiera quisiera tener, gracias miyo.

A mi novia Claudia Gómez Santiago por su amor, apoyo y comprensión, porque a pesar de la distancia nuestra relación aún sigue, te quiero mucho amor.

A mis amigos con quienes más conviví a lo largo de la carrera: Ulises Solís Naranjo, María Elena Velázquez Arellano (Malé), Salvador Vega Vicente (Chava), Miguel jaguey Hernández (Miguelito), Luis Bartolo (Luisillo), Catalina de Jesús (Katy), Karol Imelda (Karito). Gracias amigos.

A la Srta. María Dolores Sifuentes Hilarío (+) (Mama lolita), quien me brindó su apoyo en momentos difíciles, me abrió las puertas de su hogar, por sus consejos. Hoy aunque ya no esté en físico con nosotros en mi corazón siempre la llevare y estaré por siempre agradecido. Muchas gracias.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos y a quienes estuvieron encargados de mi formación profesores (María, Xóchitl, Mario, Gabriela) y los laboratoristas que contribuyeron a mi formación como ingeniero (Carlos “Sensey”, Carlos “Gallero”).

*A mis compañeros de la generación 2008-2012 de **Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos** por todos los momentos en los que me mostraron su gran compañerismo.*

*Al Departamento de Investigación en Alimentos (DIA) por permitirme usar sus laboratorios para la realización de este trabajo, y a mis amigos que estudian en este lugar en especial a **Vale, Juan, Abril y Jorge**.*

*A la empresa **Bioingenio S.C.** por haber confiado en mí para la realización de este trabajo.*

*A mis profesores de secundaria: **Joaquín Hernández, Crisogono Melo** y en especial a mi maestra **Adelina Domínguez** por su apoyo moral y sus consejos cuando más los necesite.*

*A mis profesores de la preparatoria CBT.a No. 57: **Ing. Carlos Zaleta, Ing. Carlos Cruz, Ing. Víctor Garcés, Ing. Luz Elena, Profa. Rosa, Teacher Miríam, Profe. Mario, Biólogo Ugalde** muchas gracias por sus enseñanzas.*

Dedicatorias

A Dios por permitirme llegar a esta instancia tan especial de mi vida, por estar junto a mí en mis triunfos, fracasos, llantos y alegría, por darme inteligencia y sabiduría para tomar las mejores decisiones. Y por darme la oportunidad de terminar esto que algún día solo era un sueño y hoy es una realidad.

Con todo mi amor, cariño, respeto y admiración, a mis padres

Sra. Saret Escamilla Sedano

Sr. Benjamín Hernández Rivera

Quienes son los mejores padres, amigos, confidentes y consejeros que con su amor y cariño me educaron bajo valores y principios siempre deseando que yo fuera un hombre de bien para la sociedad y un ejemplo a seguir. Hoy se ve reflejado parte de ese trabajo por el cual ellos se desvelaron, preocuparon y lo dieron y dan todo por mí y mis hermanos. Gracias por esas llamadas de atención cuando han sido necesarias, por estar conmigo en los buenos y malos momentos de mi vida, viviendo junto a mí mis triunfos y fracasos, y por darme su confianza. Los amo mucho y con nada del mundo pagaría todo lo que han hecho por mí.

A mi hermano Benjamín y a mi hermana Iridian porque son los mejores hermanos que pudiera tener, por creer en mí y permitirme ser su ejemplo.

A mis abuelitos paternos María y Joaquín (+) y maternos Bruna (+) y Felipe, por su amor y consejos.

Índice general

	Pág.
RESUMEN.....	XVI
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Objetivos	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Extractos de plantas.....	5
2.2 Métodos de extracción empleados para la obtención de compuestos ricos en fotoquímicos.....	12
2.3 Influencia de los extractos de plantas sobre los Microorganismos.....	18
2.4 Bacterias Fitopatogenas	19
2.5 <i>Erwinia amylovora</i>	20
2.6 El fuego bacteriano enfermedad causada por <i>Erwinia amylovora</i>	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Acondicionamiento del material vegetal en estudio	30
3.2 Etapa I: Obtención de los Extractos	31
3.3 Etapa II: Determinación de actividad antioxidante	33
3.4 Etapa III: Influencia de los extractos de Eucalipto y Mejorana sobre el crecimiento de <i>Erwinia amylovora</i>	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Evaluación de los métodos de extracción	39
4.2. Efecto de los extractos de Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus Labill</i>) y Mejorana (<i>Origanum majorana</i>) contra el crecimiento de <i>Erwinia amylovora</i>	45
5. CONCLUSIONES.....	51
6. RECOMENDACIONES	52
7. BIBLIOGRAFÍA	53
8. ANEXOS.....	66

Índice de cuadros

Pág.

1. Especies de plantas que afecta el fuego bacteriano causado por <i>E. amylovora</i>	23
2. Distribución mundial del fuego bacteriano (según la EPPO, 2006).....	25
3. Extractos, solvente y concentraciones empleadas.....	35
4. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm), equivalentes a ácido gálico, determinados en <i>Turnera diffusa</i>	38
5. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm), equivalentes a ácido gálico, determinados en <i>Origanum majorana</i>	39
6. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm), equivalentes a ácido gálico, determinados en <i>Eucaliptus globulus Labill</i>	39
7. Concentración de polifenoles en partes por millon (ppm), equivalentes a ácido gálico, determinados en <i>Rosmarinus oficina</i>	40
8. Concentración de polifenoles en partes por millon (ppm), equivalentes a „ácido gálico, determinados en <i>Ruta graveolens</i>	40
9. Efecto del extracto de <i>E. globulus</i> L. contra <i>E. amylovora</i>	47
10. Efecto del extracto de <i>O. majorana</i> contra <i>E. amylovora</i>	48
11. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 0%.....	49
12. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 0.25%.....	50
13. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 0.5%.....	50
14. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 1.0%.....	51

Índice de figuras

	Pág.
1. Equipo de reflujo.....	13
2. Equipo de destilación simple.....	15
3. Equipos experimentales utilizados en la extracción asistida por ultrasonido.....	17
4. Morfología de las colonias de <i>E. amylovora</i> en diferentes medios de cultivo.....	20
5. Factores condicionantes de la enfermedad del fuego bacteriano causado por <i>E. amylovora</i>	24
6. Flores, brotes y frutos jóvenes afectados por el fuego bacteriano.....	26
7. Frutos de pera en diferentes etapas afectados por <i>E. amylovora</i>	27
8. Chancro en ramas de pera y manzano causado por <i>E. amylovora</i>	27
9. Coloraciones rojizas en el interior de ramas y troncos de manzano y peral.....	28
10. Exudados bacterianos en brotes de peral y manzano.....	28
11. Molienda y tamizado de muestras vegetales.....	30
12. Equipo de reflujo empleado para el experimento.....	31
13. Método de infusión.....	32
14. Método de ultrasonido, equipo sonicador (Bransonic 2510-MTH).....	32
15. Lector de microplacas (Epoch).....	34
16. Equipo de rotavapor.....	34
17. Medio B de King.....	35
18. Parrilla de agitación y calentamiento.....	36

19. Incubadora con agitación.....	37
20. Espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys).....	37
21. Comparación entre extractos y solventes con el método de reflujo.....	41
22. Comparación entre extractos y solventes con el método de infusión.....	42
23. Comparación entre extractos y solventes con el método de ultrasonido.....	43
24. Porcentaje de inhibición con el extracto de <i>Eucaliptus globulus</i> <i>Labill</i>	45
25. Porcentaje de inhibición con el extracto de <i>Origanum majorana</i>	46

RESUMEN

Los microorganismos fitopatógenos causan importantes pérdidas a la agricultura mundial, estos patógenos son importantes porque causan enfermedades devastadoras, cuando se presentan las condiciones ambientales adecuadas. Esto ha llevado a una aplicación excesiva e indiscriminada de bactericidas químicos para su control ocasionando un sin número de problemas de resistencia, afectación del medio ambiente y daños a la salud humana, lo que ha generado una nueva búsqueda de estrategias, técnicas y métodos que permitan mantener un equilibrio ecológico y que ayuden a reducir estos problemas agrícolas. Existe un grupo de compuestos denominados fitoquímicos producidos por diferentes plantas y que se caracterizan por tener componentes bioactivos, estos compuestos son obtenidos de diversas partes de las plantas y con la ayuda de diferentes métodos de extracción y solventes. En el presente trabajo se evaluaron tres métodos de extracción (reflujo, infusión y ultrasonido), con tres solventes diferentes (agua, etanol y acetato de etilo) en cinco especies vegetales (*Turnera diffusa*, *Origanum majorana*, *Eucaliptus globulus* Labill, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens*) la evaluación se hizo en base a la concentración de polifenoles presentes para cada extracto. Se realizó una prueba in-vitro contra una bacteria fitopatógena (*Erwinia amylovora*) empleando para dicha prueba los dos extractos que obtuvieron las concentraciones más altas de polifenoles. Las mayores concentraciones de polifenoles hidrolizables las mostraron la especies *O. majorana* y *E. globulus* L., donde la relación etanol/reflujo fue la mejor. En la prueba in-vitro *E. globulus* L. mostro un efecto contra el crecimiento de la bacteria, mientras que el extracto de *O. majorana* no mostro ningún efecto en contra de la bacteria.

Palabras clave: Bacteria fitopatógena, fitoquímico, compuesto bioactivo, extracto.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las frutas y hortalizas constituyen una gran variedad de alimentos de enorme interés por los beneficios que aporta su ingesta. Debido a su riqueza en vitaminas, principalmente A y C, elementos minerales como el potasio, alto contenido de fibra soluble e insoluble, compuestos funcionales y gran cantidad de agua, el consumo de estos productos es imprescindible para conseguir una alimentación sana y equilibrada. Los alimentos de origen vegetal, además de los frutos, incluyen semillas (cereales, legumbres, frutos secos), inflorescencias, tubérculos, raíces, bulbos, tallos, hojas, yemas vegetativas y florales, poseen en general las propiedades antes mencionadas (Cano y col., 2005).

Las pérdidas debidas a las enfermedades causadas por diversos microorganismos como hongos, bacterias y virus en cosecha y postcosecha se estiman de un 10 al 30% del total de la producción agrícola de pudriciones y en algunos cultivos perecederos no son raras las pérdidas superiores al 50 %, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Mendoza, 1996).

Las bacterias causan importantes pérdidas a la agricultura mundial, estos patógenos son importantes porque causan enfermedades devastadoras, cuando se presentan las condiciones ambientales adecuadas; entre los géneros de importancia agrícola se encuentran las bacterias *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Aranda, 2002). La aplicación excesiva e indiscriminada de bactericidas para el control de enfermedades agrícolas ha ocasionado un sin número de problemas de resistencia, afectación del medio ambiente y graves complicaciones a la salud humana. La búsqueda de estrategias, técnicas y métodos que incrementen la productividad agrícola y mantengan el equilibrio ecológico sin agredir los ecosistemas y sin arriesgar las salud humana constituye hoy en día un gran reto para la agricultura y su desarrollo (Gallegos y col., 2004).

Ante esta situación, el nuevo enfoque en el combate de bacterias trata de integrar nuevas opciones encaminadas a la protección y aumento de cosechas pero con alternativas no perjudiciales; en este caso la utilización de sustancias de origen natural, que las mismas plantas han desarrollado a través de la evolución pueden ser una alternativa para limitar el uso de agroquímicos (Tanaka y Andomuro, 1993).

Los fitoquímicos son un diverso grupo de compuestos químicos naturales producidos por diferentes plantas, y se caracterizan por ser componentes bioactivos. En la actualidad existen diversos tipos identificados y clasificados; en la zona noroeste del país, considerada zona árida, se cuenta con más de 3500 especies de plantas identificadas, los productos de dichas plantas son almacenados en fibras granulares (tricomas), e incluyen polifenoles, aminas, alcaloides, flavonoides, saponinas, terpenos, benzofuranos, benzopiranos, vitaminas, carotenoides, ácidos orgánicos, entre otros. Algunos de estos componentes rodean la hoja y la superficie madre y previenen la pérdida de agua a través de la cutícula y probablemente protegen a la planta del daño excesivo por radiación. Se sabe que existen muchas fitomoléculas que protegen a los alimentos del ataque de diferentes bacterias y hongos; aunque el conocimiento científico de los compuestos activos que tienen dicha actividad es desconocido en muchas de ellas (Jasso y col. 2006).

Cabe destacar que la mayoría de los fitoquímicos naturales son obtenidos por extracciones, diversos estudios han demostrado que la actividad de los extractos sobre los microorganismos es variable, en función del método de extracción, solvente de extracción utilizado, parte de la planta empleada para la extracción (hojas, raíces, tallos, etc.), fenología de la planta, época del año en que se realiza la colecta así como de la latitud y altitud de donde se realiza ésta (Hernández y col. 2011).

1.2 Justificación

Actualmente en México el gasto destinado para el combate de plagas y enfermedades representa hasta un 20% del costo de producción en la industria agrícola y de alimentos. Las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos en árboles frutales que son de gran importancia en la alimentación tales como peras y manzanas pueden controlarse con el uso de bactericidas, fungicidas, nematocidas e insecticidas; sin embargo, su eficacia puede ser de corta duración y su empleo ha provocado no solamente intoxicaciones crónicas y agudas a la población (Balvantín y col., 2009), sino también la aparición de tolerancia por parte de los microorganismos y daños ecológicos (Larkin y col., 1998; Rey y col., 2000). La resistencia adquirida a fungicidas se da como respuesta al uso repetitivo del fungicida o de fungicidas química y/o bioquímicamente relacionados (Brentk y col., 2007).

Es por eso que se ha incrementado el interés para encontrar productos que presenten ventaja sobre los tradicionalmente empleados específicamente en eficiencia, selectividad y sobre todo que tengan un menor impacto sobre el medioambiente. Existen antecedentes que indican el potencial antimicrobiano que presentan los componentes de extractos vegetales distribuidos a lo largo de la zona semidesértica de México. Entre algunas de estas especies destacan la gobernadora (*Larrea tridentata*) (Lira, 2003), la nuez (*Carya illinoensis*), la damiana (*Turnera diffusa*) (Castillo, y col. 2010), el orégano (*Lippia berlandieri Shauer*) (Ruiz-Bustos y col., 2009), estas especies se caracterizan por tener una gran cantidad y variedad de polifenoles dentro de los cuales se encuentran los galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados. Los extractos vegetales han resultado efectivos para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Koduru y col., 2006).

Con este proyecto se pretende identificar compuestos presentes en especies vegetales del semidesierto mexicano, que presenten una alternativa para el control de flora fitopatógena presente en frutales de peral y manzano, empleando metodologías y técnicas eficientes.

1.3 Hipótesis

Es posible obtener extractos ricos en compuestos bioactivos de plantas del semidesierto mexicano que influyan sobre microorganismos fitopatógenos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Obtener compuestos bioactivos a partir de extractos de plantas que permitan el control de bacterias causantes de alteraciones en plantas y frutos de manzanas y peras.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar diversos métodos de extracción para definir las condiciones de obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas.
- Determinar la cantidad de polifenoles hidrolizables por el método Folin-Ciocalteu en microplaca en los extractos vegetales.
- Evaluar el efecto *in-vitro* de los extractos ricos en polifenoles hidrolizables sobre *Erwinia amilovora* y observar el efecto que ejercen sobre la misma.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Extractos de plantas

Un extracto se define como el producto obtenido de los vegetales por maceración, percolación, destilación u otros procedimientos que permitan extraerles los principales compuestos presentes en la planta (NOM-139., 2012).

Las plantas, tanto en su ambiente natural como en ambientes de cultivo, necesitan defenderse en condiciones adversas y enemigos naturales, es por eso que como parte de su metabolismo producen una diversidad de compuestos orgánicos, de los cuales la mayoría no parece tener participación directa en su crecimiento y desarrollo. A estos compuestos se les conoce como metabolitos secundarios y sus propiedades químicas se han investigado ampliamente desde mediados del siglo XIX (Croteau y col., 2000).

De acuerdo con Pitman y Jorgensen (2002), se estima que en el mundo existen entre 310,000 y 422,000 especies de plantas, encontrándose en los bosques tropicales cerca de 125,000 especies (Mendelsohn y Balick, 1995). Dentro de esta vasta diversidad, existen especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y el descubrimiento de nuevos productos. Sin embargo, se calcula que menos del 10 % de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de alguna actividad de interés como, antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, anticancerígeno, entre otras (Harvey, 2000).

Según (Rodríguez y Lagunés, (1992); Jacobson y Crosby, (1971), los primeros agroquímicos que se usaron fueron polvos y extractos de plantas, los cuales se utilizaron antes del surgimiento de los compuestos orgánicos sintéticos en la primera mitad de siglo XX; entre estas plantas estuvieron el tabaco, el crisantemo y la rotenona que fueron usados contra distintas plagas de insectos.

Existen varios reportes en donde se registran plantas con actividad antimicrobiana y antifúngica, como es el caso de *Allium sativum*, el cual contiene como compuesto activo aliína un aminoácido sulfurado con funciones fungicidas;

el aceite esencial de hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), presenta los fenoles timol y carvacol que son los principales componentes que le confieren poder antibacteriano y antifúngico. El aceite esencial obtenido de hojas de zacate limón (*Cymbopogon citratus*), que es rico en citral, myreceno, dipenteno, methylheptenona, ciertos alcoholes, y ácidos volátiles, ha presentado características antifúngicas y antimicrobianas (Obledo y col. 2004).

Otros estudios donde emplearon extractos de plantas contra microorganismos fitopatógenos, como es el caso de evaluaciones *in-vitro* realizadas por Arciniegas (2002) y Arciniegas y col. (2002), donde seleccionaron 20 plantas que revelaron porcentajes superiores al 30% de actividad inhibitoria, de las cuales sobresalieron *Syzygium aromaticum* quien presento un mayor poder inhibitorio, seguido por *Commelina diffusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia sp.*, *Plenax sp.*, *Piper hispidum*, *P. peltatum* y *Sida rhombifolia*. Así mismo Polanco (2004), validó en campo diez productos obtenidos de extractos vegetales, mediante el método de ventana de inoculación, los cuales fueron previamente seleccionados como “promisorios” por Arciniegas (2002) y que mostraron actividad inhibitoria contra microorganismos fitopatógenos a concentraciones de 100 y 200 ppm, estos extractos fueron obtenidos de *Momordica charantia*, *Plenax sp.*, *Syzygium aromaticum*, *Sida rhombifolia* y *Piper hispidum*.

Recientemente se han reportado estudios realizados con extractos etanólicos de *Turnera diffusa*, *Origanum vulgare*, *Larrea tridentata* *Lippia graveolens*, *A. lechuguilla*, *F. cernua* y *Y. filifera*, los cuales presentaron inhibición contra microorganismos fitopatógenos (Méndez y col. (2011); Hernández-Castillo y col. (2011).

2.1.1 Damiana (*Turnera diffusa*)

2.1.1.1 Distribución

La damiana perteneciente a la familia de las *Turneraceas*, se encuentra en California, Texas, Las Antillas y Sudamérica. En México se localiza en los estados de Baja California Sur, San Luis Potosí, Coahuila, Sinaloa, Nayarit, Tamaulipas, Querétaro, Zacatecas y Guerrero (Alcaraz, 1999).

Se encuentra en laderas y mesetas, en pendientes no mayores al 5%, en suelos de textura ligera de migajón arenoso a arena migajosa, con pH ligeramente alcalino a alcalinidad alta y pobres en nitrógeno (Sandoval, 1982; Alcaraz, 1999 y Arriaga, 1999).

2.1.1.2 Características físicas y químicas

Arbusto caducifolio de hasta 2.0 m de altura; tallos ramosos, lisos y derechos, amarillos o pardos rojizos, ramillas pubescentes cuando jóvenes. Hojas simples, alternas o en racimos oblongas a espatuladas, de peciolo corto, ápice obtuso a agudo, márgenes dentados con 2 a 10 dientes en cada lado, miden de 10 a 25 cm de longitud, de color verde olivo brillante, envés blanquecino y muy aromáticas. Flores axilares pequeñas de 8 a 12 mm, cáliz sésil de unos 13 mm, sépalos 5, corola amarilla de 5 pétalos de 6 a 8 mm de longitud, estambres 5, ovario libre unilocular, su fórmula floral es $K(5), C5, A5, G(3)$ (Arriaga y col., 1999).

En condiciones silvestres florece de julio a noviembre. El fruto es una capsula ovoide de 4 a 6 mm de longitud, dehiscente, trivalar, de color café, la semilla es curva, café algunas blanquecinas o cremosas, de 2 mm de longitud y 1 mm de ancho, testa dura, con aproximadamente 850 semillas por gramo (Sandoval, 1982).

Alcaraz-Meléndez y col., (2004), analizaron extractos de damiana en los que encontraron la presencia de algunos aceites (0.5-1%) con cineol, alfa y beta-pinenos, p-cimeno, timol, sesquiterpenos (alfa-copaeno, delta-cadineno, calameno). Taninos (4%), heterosidos hidroquinonicos (0.2-0.7%): arbutosido;

heterosidos cianogenicos, alcaloides (7%); beta-sitosterol, damianina (principio amargo), resina (6- 14%), goma (13.5%), proteínas (15%). López-Guerra (2006), reporto que la planta contiene aceites esenciales, terpenos que proporcionan el aroma característico, además de resinas, flavonoides, terpenos, fenoles y derivados cianógenos.

2.1.2 Mejorana (*Origanum majorana*)

2.1.2.1 Distribución

Es una planta perteneciente a la familia *Lamiaceae* originaria del norte de África y cultivada ampliamente en Grecia, Libia, Siria, España y Egipto. También se encuentra distribuida por el sur de Europa y suroeste de Asia, donde es ampliamente cultivada. En México se encuentra ampliamente en el estado de Veracruz en la sierra de los Tuxtla (Crespo., 1989).

Crece en zonas secas, no cultivadas, preferentemente en suelos calizos, en climas cálidos, es una planta perenne, pero en condiciones frías debe considerarse una anual semirresistente de exteriores, puesto que no soporta los inviernos (Vaga., 1976).

2.1.2.2 Características físicas y químicas

Es una planta bienal de 20-25 cm de altura. Presenta unos brotes aterciopelados o tomentosos de color verde grisáceos a blanquecinos y a veces con manchas rojizas. Las hojas aparecen en falsos verticilos protegidos por brácteas verdes grisáceas. Las hojas tienen un peciolo corto y son espatuladas, redondeadas y de margen entero. Son tomentosas tanto en haz como en envés. Las inflorescencias son sésiles y pequeñas y aparecen sobre las brácteas de las hojas. Las flores son blancas, rosas o lilas pálidas (Crespo., 1989).

Contiene sustancias tánicas, pentonasas y principios amargos, además de minerales, pero la sustancia principal es la esencia aromática (0,6-1%), de color amarillo verdoso compuesta por terpenos, terpineno y origanol (alrededor del

40%), sabineno y sesquiterpenos en pequeñas cantidades (Botanic Gardens., 2010). Aceite esencial (0,7 a 3%), rico en terpineol, con timol, carvacrol e hidrocarburos terpénicos; ácidos fenólicos: caféico, clorogénico, rosmarínico; flavonoides derivados del apigenol, luteolol, kenferol y diosmetol (Crespo., 1989).

2.1.3 Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill)

2.1.3.1 Distribución

Pertenece a la familia *Myrtaceae*, aparece de forma natural en el sur de Australia (Victoria), Tasmania y las islas del estrecho de Bass. Se extiende entre las latitudes 38° 26' a 43° 30' Sur. En México se encuentra ampliamente distribuido en los estados de Baja California, Durango, Chihuahua, Guerrero, Sinaloa, Tamaulipas y Tabasco, (SEMARNAP, 1996). Crece en gran variedad de substratos si bien es muy común en zonas graníticas y arenosas. En general no se presenta en suelos calcáreos o fuertemente alcalinos ni en zonas mal drenadas. Es una especie muy sensible a la competencia de otras plantas, tanto por los nutrientes como por la luz (Montoya-Oliver., 1995).

2.1.3.2 Características físicas y químicas

Es un árbol de talla elevada, llega a alcanzar los 70 m de altura y los 2 m de diámetro. Se caracteriza y reconoce fácilmente por su corteza, que se desprende en tiras que cuelgan en el tallo del árbol, las cuales acaban por caer al suelo después de un tiempo. Una de sus características más llamativas es su "heterofilia"; es decir, el hecho de presentar en el mismo árbol distintas y diferentes hojas jóvenes (opuestas, sentadas y acorazonadas) respecto de las adultas (alternas, pecioladas, falciformes y acuminadas). Las hojas que se agrupan agolpadas en los extremos de las ramillas, producen una copa poco frondosa (Montoya-Oliver., 1995).

Según Pappas (2000) el eucalipto contiene hasta un 80% de eucaliptol, aldehídos, hidrocarburos, pineno, canfeno, azuleno, taninos y resina. otros

componentes son el alfa-tujeno 4.25%, alfa-pineno 1.36%, sabineno 1.43%, beta-pineno 0.10%, myrceno 0.87%, alfa-fellandreno 0.32%, alfa-terpineno 0.20%, para-cimeno 34.99%, beta-phellandreno 5.94%, 1,8-cineol 2.71%, 1,2 gamma-terpineno 0.47%, trans-sabineno hidrato 0.35%, oxido cis-linalool 0.13%, terpinoleno 0.13%, alfa-o-dimetilestireno 0.10%, hidrato de cis-Sabineno 0.43%, linalool 3.39%, beta-tujon 0.25%, trans-p-ment-2-en-1-ol 1.11%, terpinen-4-ol 5.72%, cripton 13.70%, p-cimen-8-ol 0.50%, alfa-terpineol 1.21%, cuminaldehído 3.65%, linalil acetato 2.33%, cuminil alcohol 0.95%, carvacrol 0.47%, alfa-terpinil acetato 0.19%, geranil acetato 0.16%, allo-aromadendreno 0.35%, (E)-beta-farneseno 0.28%, espatulenol 4.30% y óxido de cariofileno 0.43%.

2.1.4 Romero (*Rosmarinus officinalis*)

2.1.4.1 Distribución

Pertenece a la familia de las *Lamiaceae* originaria de las costas del Mediterráneo, se cultiva en varios estados de la república, principalmente en el centro del país. En México se tiene conocimiento de que se utiliza como planta medicinal en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Sonora, Tlaxcala, Veracruz y Distrito Federal. Se encuentra distribuida en zonas templadas y cálidas. Es originaria de la Región Mediterránea y crece en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados. (Argueta, 1994).

2.1.4.2 Características físicas y químicas

Es un arbusto salvaje, perenne y dentro de sus características más destacadas resaltan las flores de color azul pálido hasta llegar al blanquecino, reunidas en pequeños racimos que pueden estar insertadas en las axilas o ser terminales con bractecillas de poco desarrollo y difíciles de visualizar, el cáliz de forma acampanada está compuesto de dos labios, el superior de una sola pieza y el inferior separado en dos secciones bien definidas; la corola presenta un labio

superior en forma de casco, hundido en dos partes, bífido, en cuanto al inferior se destacan tres lóbulos y el tubo saliente (Vaga,. 1976).

Entre los principales compuestos presentes en romero están la diosmetina, diosmina, luteolina, hispidulina, apigenina, circimaritina, naringina; los ácidos vainílico, rosmarínico, labiático, clorogénico, neoclorogénico, cafeico, carnósico, ursólico, oleanílico; rosmaricina, isorosmaricina, carnosol, rosmanol, epirosmanol, 7-metil-epirosmanol (Madsen, 1995; Leung y Foster, 1996; Masuda y col., 2001; Zheng y Wang, 2001), rosmadial, metilcarnosato y rosmariquinona, entre otros (Hopia y col., 1996).

En las hojas en estado fresco el ácido carnósico es el que se encuentra en mayor proporción; en los troncos en menor cantidad y prácticamente nada en raíces (Okamura y col., 1994); es el principal compuesto que le confiere actividad antioxidante al extracto, otros diterpenos que actúan como antioxidantes son el carnosol (Aruoma y col., 1992; Hopia y col., 1996), rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmaridifenol y rosmariquinona (Jadhav y col., 1996; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996). También se ha reportado que los ácidos vainílico, cafeico (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996) y labiático (Leung y Foster, 1996) contribuyen a esta actividad.

2.1.5 Ruda (*Ruta graveolens*)

2.1.5.1 Distribución

La planta ruda es nativa de Europa, especialmente en la región del Mediterráneo, está ampliamente distribuida en todas las zonas templadas y las regiones tropicales. Es un muy popular y atractiva en los jardines del sur de América, donde se cultiva no sólo para uso ornamental y medicinal (Gleason,. 1968).

2.1.5.2 Características físicas y químicas

De la familia *Rutaceae* es una hierba perenne, de matorral, siempre verde, de unos 50 a 80 cm de altura, lampiña, de olor nauseabundo, perteneciente a la familia de las Rutáceas. La raíz es leñosa y sinuosa. El tallo es erecto y ramificado, las hojas esparcidas, compuestas por segmentos en forma de cuña, son ovales, densas, carnosas y punteadas. Las flores son de color amarillo-verdoso y están reunidas en un corimbo terminal (Crespo,. 1989).

La especie *Ruta graveolens*, conocida comúnmente como ruda, contiene sustancias como la rutina y la inulina (Shah et al. 1988). Además, se ha reportado que las hojas y las flores contienen alcaloides y flavonoides con propiedades insecticidas y fungicidas (Hnatyszyn y col. 1975, Gros y col. 1985, Ulubelen y Teren 1988, Srivastava y col. 1998, Springob y col. 2000, Mancebo y col. 2001, De Mendoça y col. 2005, González y col. 2007).

Otros compuestos presentes en la planta son glucosidos, como rutina, flavonoides, los alcaloides (quinolonas), coquisagenine, graveoline, furocoumarins (psoralenos): bergaptene (3-metoxipsoraleno) y xantotoxine (8-metoxipsoraleno), los aceites esenciales: metil-nonil-cetona, metil-n-octil-cetona y heptil-metil-cetona, alcoholes: metil-etil-carbinol, pimeno, limenenes (Vaga., 1976).

2.2 Métodos de extracción empleados para la obtención de compuestos ricos en fotoquímicos

La extracción de compuestos fitoquímicos en plantas empleando un procedimiento solido-liquido, solventes y diferentes métodos de extracción presenta una opción para la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos (Castillo y col. 2010).

Para la obtención de un extracto, primero se debe identificar la hierba deseada y la parte que contiene los constituyentes útiles. Adicionalmente, determinar una técnica correcta de cosecha es de crucial importancia para obtener

extractos ricos en compuestos bioactivos. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto con la ayuda del método y solvente empleado (Vinatoru, 2001).

Existen varios métodos para la extracción de sustancias como reflujo, infusión, extracción por solventes (Gao y Liu, 1997), destilación (Vinatoru, 2001), extracción por métodos no tradicionales como la extracción asistida por microondas, extracción por fluidos supercríticos, extracción turbo, extracción eléctrica y extracción asistida por ultrasonido (Vinatoru, 2001; Gao y Liu, 2005).

2.2.1 Extracción por reflujo

Se emplea material de vidrio generalmente utilizado para la extracción de compuestos de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, por medio de un solvente afín. El equipo está integrado por un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz (figura 1). Funciona cíclicamente, cuando se evapora el solvente sube hasta el área donde es condensado, aquí, al caer y regresar a la cámara de solvente, va separando los compuestos, hasta llegar a una concentración deseada (Viantoru, 2001).



Figura 1. Equipo de reflujo

2.2.2 Extracción por Infusión

Se logra por el agregado de agua a la temperatura adecuada a las hojas. Éste método es beneficioso debido a que las mismas no corren peligro de que sus componentes se desnaturalicen. En algunos casos se utiliza una corriente de reflujo la cual permite un mayor tiempo de contacto entre el material expuesto y el solvente. (Macia y Monesterolo, 2008).

2.2.3 Extracción por solventes

Se basa principalmente en la selección de solventes, temperatura o agitación, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa (Gao y Liu, 1997). Se separan los compuestos con base en sus solubilidades por dos líquidos inmiscibles, usualmente agua y un solvente orgánico. En la industria, este proceso se realiza continuamente bombeando una corriente orgánica y otra acuosa dentro de una mezcladora, donde se mezclan ambos componentes y se permite el intercambio iónico hasta que se logra el equilibrio. La introducción de un transductor ultrasónico dentro de la unidad de extracción, puede incrementar considerablemente la eficiencia del método, debido a que, por lo general, se utilizan solventes fríos (Vinatoru, 2001).

2.2.4 Extracción por destilación

Este método se basa en la operación de separar, mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla, aprovechando las diferencias de volatilidades de los compuestos por separar. El aparato utilizado para la destilación en el laboratorio (figura 2), consta de un recipiente donde se almacena la mezcla, a la que se le aplica calor, un condensador donde se enfrían los vapores generados, llevándolos de nuevo al estado líquido y un recipiente donde se almacena este líquido concentrado (Vinatoru, 2001).

En este método, los materiales vegetales son mezclados con agua, seguidos por el calentamiento o la introducción de una corriente de vapor. Durante la destilación, el uso de ultrasonido no tiene ningún efecto debido a las

temperaturas de ebullición, pero puede ser utilizado para mejorar la extracción cuando se utilizan solventes de punto de ebullición bajo y la temperatura de extracción se mantiene por debajo del punto de ebullición de la mezcla (Vinatoru, 2001).

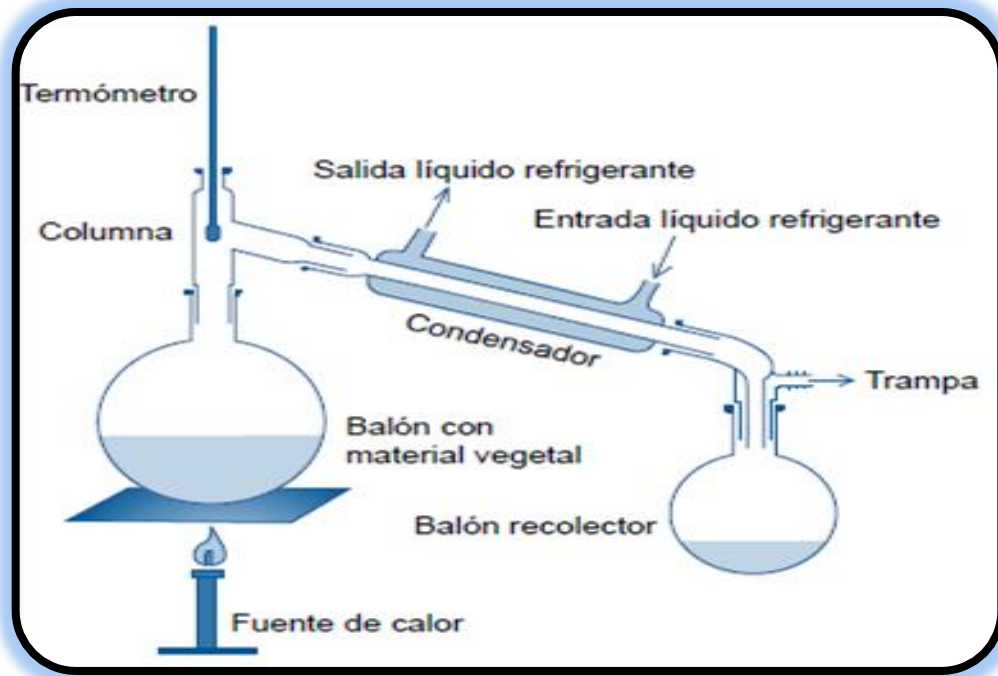


Figura 2. Equipo de destilación simple

2.2.5 Extracción asistida por microondas

La irradiación de microondas causa movimiento de las moléculas por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y materia vegetal (Gao y Liu, 2005).

2.2.6 Extracción por fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico. Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido, generando solvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial. Se utilizan, principalmente, dióxido de carbono y agua. Se puede

realizar una extracción selectiva de diferentes compuestos utilizando distintas presiones del fluido supercrítico (Vinatoru, 2001).

2.2.7 Extracción turbo

Utiliza un agitador de alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando el rendimiento de extracción, ya que se aumenta el contacto entre el material vegetal y el solvente y el proceso de difusión a través de las paredes celulares se incrementa (Vinatoru, 2001).

2.2.8 Extracción eléctrica

En este método se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción, incrementando la extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación (Vinatoru, 2001).

2.2.9 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal (figura 3). Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Gao y Liu, 2005). Según Rostagno y col., (2003), esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas.

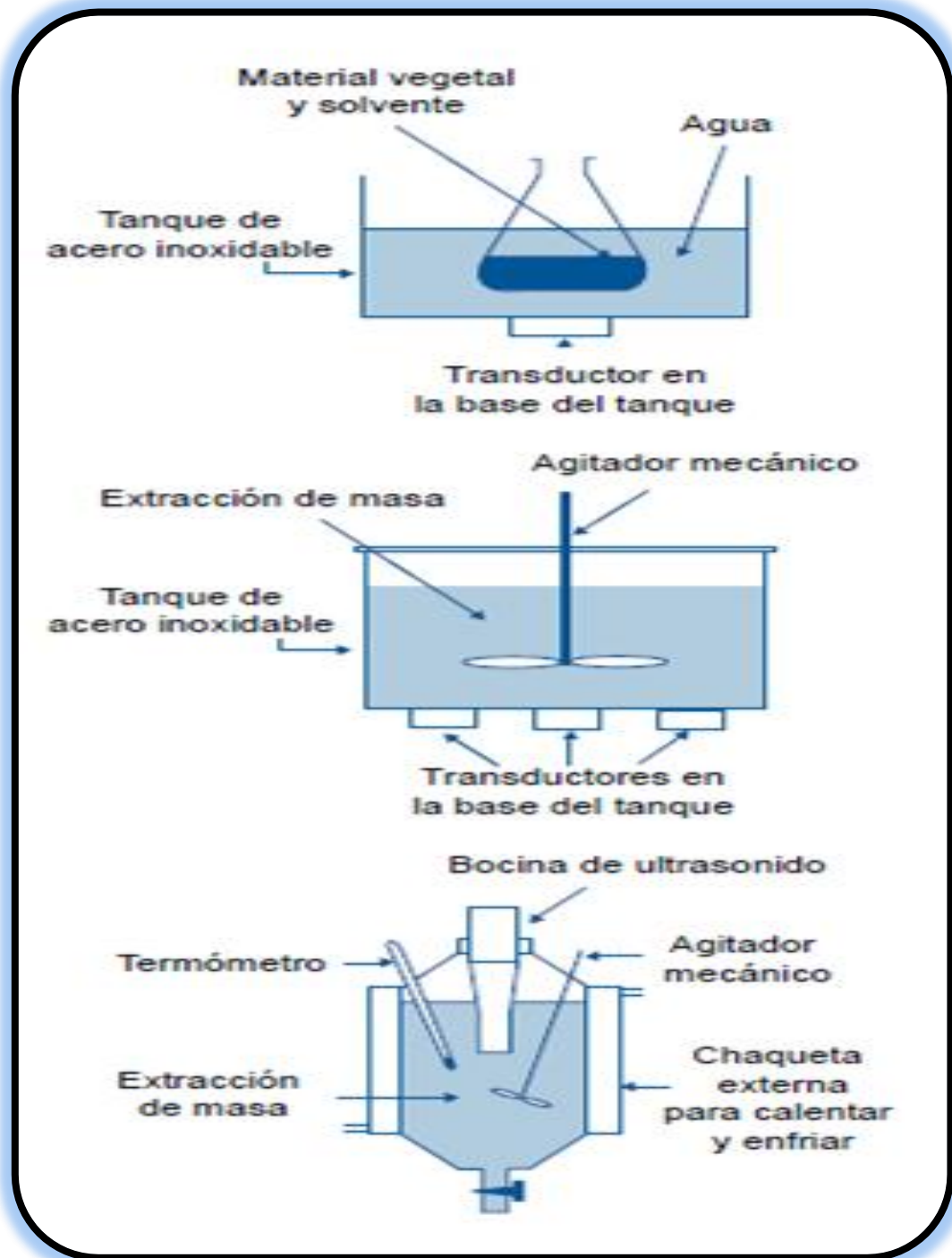


Figura 3. Equipos experimentales utilizados en la extracción asistida por ultrasonido.

2.3 Influencia de los extractos de plantas sobre los Microorganismos

La utilización de extractos vegetales para el control de microorganismos fitopatógenos representa una alternativa en el manejo integrado de cultivos de frutales, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente (Mosch y Klingauf, 1989).

Los polifenoles poseen reconocida actividad bacterisida debido a mecanismos que actúan sobre las células del microorganismo, ejerciendo parte de su actividad antimicrobiana mediante interacciones inespecíficas con componentes de la membrana plasmática (Mori y col., 1987; Haraguchi y col., 1998; Puupponen-Pimia y col., 2001; Funatogawa y col., 2004). Los polifenoles presentan actividad bactericida en base a sus diversos compuestos como es el ácido gálico, las saponinas, terpenos y los taninos encontrados en diversas especies vegetales y que a diferentes concentraciones se observa la influencia de los mismos sobre los microorganismos (Funatogawa y col., 2004).

Clemente-Constantino, (2010), demostró que extractos de *Larrea tridentata* de 10 a 4000 ppm de polifenoles, mostraron una inhibición del 68.1% en el crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi*. Por su parte Lipa y Jaros, (1989) encontraron que extractos de ajo (*Allium sativum*), mostraron inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. Mosch y Zeller (1989) evaluaron el efecto de los extractos de *Mahonia aquifolium* Nutt, *Berberis vulgaris* y *Rhus typhina* contra *Erwinia amylovora* (Burill), encontrando un efecto inhibitorio de 25.6% y 53.2% respectivamente.

Mosch y Klingauf, (1989), observaron inhibición de la bacteria *Erwinia amylovora* en pruebas *in-vitro* con agar B de King, empleando extractos acuosos de *Juglans nigra* L., *B. vulgaris* y *R. typhina* aplicados en concentraciones de 1.0%, 1.25% y 2%. Donde los extractos de *J. nigra* y *R. typhina* mostraron una mayor actividad a una temperatura de incubación de 20 °C. Posteriormente Mosch y col., (1990) trabajando con la misma bacteria (*Erwinia amylovora*), los mismos

extractos y las mismas concentraciones, aplicados en condiciones de campo a *C. salicifolius* var. *Floccosus*, lograron un 53% de control sobre la bacteria.

Por su parte Zaccheo (1990) informo que extractos, de meristemas apicales de pera cv. Bartlett al 1% tuvieron efectos bacteriostáticos *in-vitro* contra *E. amylovora*. Alstroem (1992) señalo que extractos de café poseen actividad bacterisida sobre *Pseudomonas syringae* pv. *psis*.

Recientemente se han reportado estudios realizados con extractos etanólicos de *Heliotropium indicum*, *Lippia organoides* y *Phyllanthus niruri*, para el control de la Sigatoka negra (Hernández y col. 2006).

2.4 Bacterias Fitopatógenas

Las bacterias fitopatógenas se definen como microorganismos unicelulares en forma de bastón, que carecen de clorofila, presentan pared celular y no tienen núcleo definido (Padilla y col., 2007)

La mayoría de las bacterias fitopatógenas tienen forma de bastones cortos de 0.6-3.5 µm de longitud y 0.5-1 µm de diámetro. De igual forma la mayor parte de las bacterias fitopatógenas se acumulan en el espacio extracelular o en el tejido vascular utilizando estos medios para colonizar diferentes órganos de la planta o fruto. Estas bacterias producen algunos compuestos bioquímicos que tienen función en la virulencia y colonización en el hospedero, algunos de estos compuestos son: fitotoxinas, proteínas nucleadoras, fitohormonas, bacteriosinas, exoenzimas, exopolisacáridos y sedideroforos (Padilla y col., 2007).

Las bacterias fitopatógenas pueden eliminar especies vegetales de una localidad o pueden impedir su establecimiento en un área nueva (Espinoza-García, 2001).

2.5 *Erwinia amylovora*

El género *Erwinia*, que debe su nombre a la memoria del fitopatólogo Erwin F. Smith, se creó inicialmente para agrupar a Enterobacterias asociadas a las plantas, Gram negativas, bacilares, no formadoras de esporas y móviles (Winslow y col., 1920). Los miembros de este género incluyen además de enterobacterias saprofitas ecológicamente asociadas a plantas, patógenos oportunistas del hombre y los animales (Brenner, 1984). Gracias al avance de las técnicas moleculares, las especies del género *Erwinia* se clasificaron en cuatro grupos basados en la comparación de secuencias de ADN ribosómico 16S (Hauben y col., 1998). Quedando *Erwinia amylovora* en el primer grupo, el cual representa a las verdaderas Erwinias, que producen necrosis o marchitamiento en plantas, o que pueden ser epifitas (Hauben y col., 1998) (figura 4).

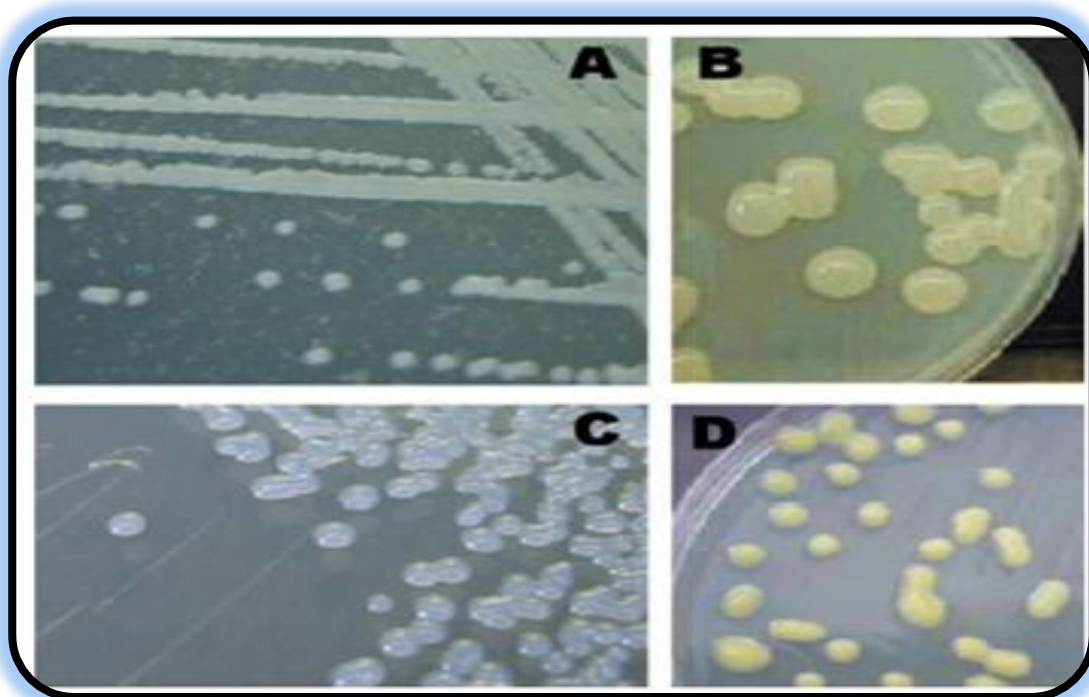


Figura 4. Morfología de las colonias de *E. amylovora* en diferentes medios de cultivo; A: Medio B de King; B: Medio SNA; C: Medio CCT; D: Medio MM₂Cu

2.5.1 Características fenotípicas de *E. amylovora*

E. amylovora fue la primera bacteria que se demostró era el agente causal de una enfermedad en plantas (Burrill, 1883) y la primera bacteria fitopatogena en la que se demostró la diseminación mediante insectos. Se trata de un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo, de flagelación peritrica y con exopolisacaridos formando una capsula (Paulin, 2000). Presenta un crecimiento anaeróbico débil, formación de colonias levaniformes en agar nutritivo con sacarosa, ausencia de crecimiento a 36 °C, producción de sustancias reductoras de sacarosa, requerimiento de ácido nicotínico en medio mínimo, producción de ácido a partir de compuestos orgánicos (ribosa, trealosa, glucosa y sacarosa), utilización de citrato, formato y lactato como fuentes de carbono y energía (Kim y col., 1999).

Las células de *E. amylovora* son bacilos con un tamaño de aproximadamente 0.3 y 1.3 µm, rodeadas de una capsula visible al microscopio óptico, es móvil por medio de dos a siete flagelos peritricos, sus valores óptimos de temperatura y pH son de 20 °C y 6.8 respectivamente (Raymundo y Ries, 1980a, b).

2.5.2 Factores de virulencia

A diferencia de otras bacterias fitopatógenas, *E. amylovora* no secreta enzimas pectinolíticas que degraden los polisacáridos de la pared celular de los tejidos vegetales ni tampoco metabolitos fitotóxicos (Seemüller y Beer, 1976). *E. amylovora* es la única bacteria capaz de inducir el fuego bacteriano en algunas rosáceas, pero aún se desconoce por qué solo este patógeno es capaz de causar dicha enfermedad y por qué afecta únicamente a ciertas especies de la familia *Rosaceae*. Sin embargo, los numerosos estudios realizados sobre la patogenicidad de *E. amylovora* han permitido identificar cuatro factores esenciales para su patogénesis.

a) Los genes *hrp* (del inglés, "hypersensitive response and pathogenicity"), se agrupan en una región cromosómica de 40 kb que constituye una isla de patogenicidad. Estos genes codifican tres tipos de proteínas: reguladoras, secretoras y secretadas. Las proteínas secretoras son componentes de un sistema de secreción tipo III, que libera proteínas al exterior de la célula bacteriana y las inyecta en las células vegetales. Entre ellas destacan las proteínas denominadas **harpinas**, que aplicadas a distintas plantas pueden inducir resistencia sistémica frente a patógenos (Kim y Beer, 2000). **b) Los genes *dsp*** ("disease specific"), que se requieren para el desarrollo de los síntomas, pero no para la reacción de hipersensibilidad (HR) (Bogdanove y col., 2000). **c) Los polisacáridos extracelulares o exopolisacaridos**, que forman la capsula alrededor de la célula bacteriana, protegiéndola así de las reacciones defensivas de la planta. Juegan un papel esencial en la patogenicidad y entre ellos destacan el amilovorano y el levano (Geider, 2000). **d) Los sideroforos (desferrioxiaminas)**, agentes quelantes transportadores del hierro que permiten al patógeno superar las condiciones de baja disponibilidad de este elemento existente en los tejidos del huésped (Dellagi y col., 1998).

2.6 El fuego bacteriano enfermedad causada por *Erwinia amylovora*

El fuego bacteriano es una enfermedad causada por la bacteria *Erwinia amylovora* que afecta principalmente a plantas de la familia de las rosáceas, en las que se incluyen los frutales de pera y manzano, diversas especies ornamentales y silvestres las cuales son de gran interés económico (López y col., 1987, 1996; Van der Zwet y Beer, 1995; López y Montesinos, 1996; Montesinos y López, 2000; Beer, 2002) (cuadro 1). Es la enfermedad bacteriana más devastadora del manzano y del peral (Krtizman y col., 2003), el patógeno causa daño en flores, brotes, ramas, frutos y raíces. (Van der Zwet y Keil, 1979) (Figura 6).

Cuadro 1. Especies de plantas que afecta el fuego bacteriano causado por *E. amylovora*.

Especies de plantas	
<i>Pyrus</i> (Peral)	<i>Amelanchier</i>
<i>Malus</i> (Manzano)	<i>Chaenomeles</i>
<i>Mespilus</i> (Nispero)	<i>Cotoneaster</i>
<i>Cydonia</i> (Membrillo)	<i>Crataegus</i> (Espini albar, acerolo)
	<i>Eriobotrya</i>
	<i>Photinia davidiana</i> (Stranvaesia)
	<i>Pyracantha</i>
	<i>Sorbus</i> (Serbal)

. El fuego bacteriano fue la primera enfermedad infecciosa de plantas en la que se demostró que el agente causal era *Erwinia amylovora* (Burril, 1883; Winslow y col., 1920). Es una enfermedad cuarentenaria con efectos devastadores y con un alto impacto económico, de rápida migración en las plantas es capaz de destruir arboles de variedades sensibles en un periodo vegetativo y tiene una gran capacidad de diseminación por distintos medios sobreviviendo en los tejidos de la planta. Actualmente no se conocen métodos eficaces en la lucha contra esta enfermedad (Montesinos y López, 2000).

Existen distintos factores interrelacionados que condicionan el desarrollo de la enfermedad (fuego bacteriano) (figura 5). Entre ellos los más importantes son: la cantidad de inóculo disponible, todos los factores que condicionan la receptividad y sensibilidad de la planta huésped y las condiciones climáticas. Por ello, la gravedad de la enfermedad puede ser variable de unos lugar a otro (Aldwinckle y Beer, 1978); Van der Zwet y Beer, 1995; Schroth y col., 1974).

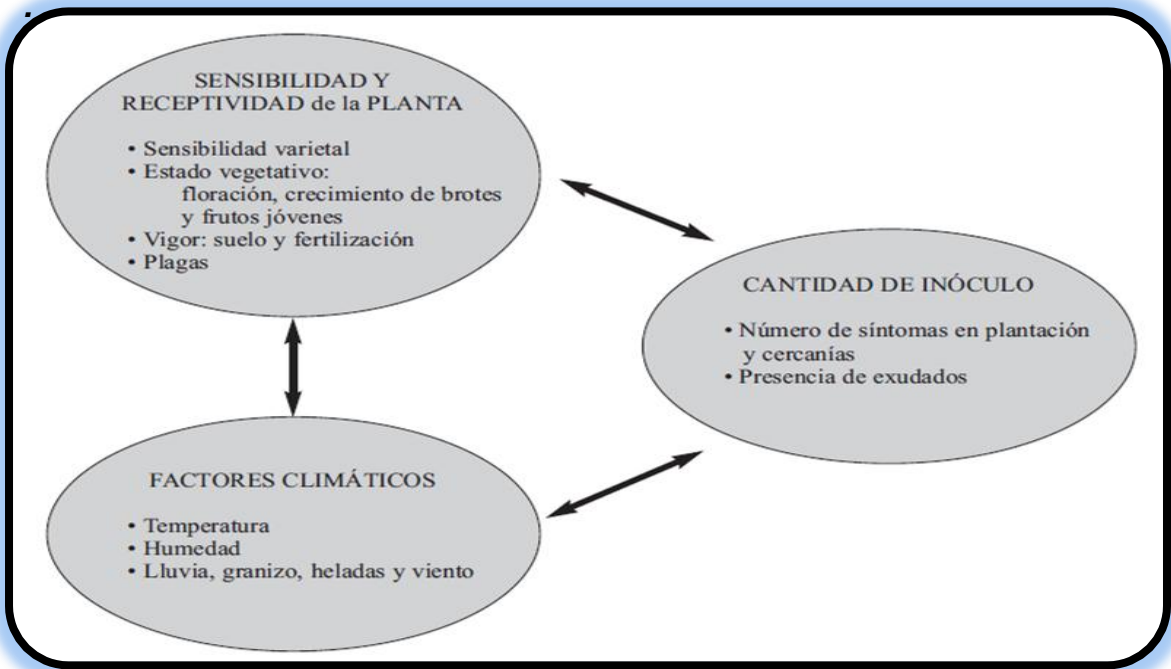


Figura 5. Factores condicionantes de la enfermedad del fuego bacteriano causado por *E. amylovora*.

2.6.1 Distribución mundial del fuego bacteriano

El fuego bacteriano se describió por primera vez en 1780 en el estado de New York (EE.UU.) (Burril, 1883; Winslow y col., 1920), extendiéndose posteriormente a todas las zonas circundantes de Canadá y a otros estados de la costa atlántica, así como a la costa del Pacífico. En 1919 se detectó en Nueva Zelanda, en Europa se detectó en el sur de Inglaterra en 1957. En 1964 se identificó en África, en el valle del Nilo en Egipto, y en los Países Bajos en 1966, en España se detectó por primera vez en 1995, sobre manzanos de sidra cultivados (Butrón, 1995).

En México se identificó en 1974 en la región manzanera de Chihuahua, por personal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Durante esta época se estimó que el 10% de los árboles plantados en la región presentaba algún daño ocasionado por la bacteria *Erwinia amylovora* (Ramirez-Legarreta y col., 2003).

Según la *Organisation Européene et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes/ European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO)* (2007), aún permanecen zonas frutícolas libres del fuego bacteriano en el hemisferio sur, como Sudáfrica, Chile, Argentina ,Brasil y Australia, los cuales son hoy en día importantes exportadores de frutas de pera y manzana. Tampoco hay citas de su existencia en ninguna país de América del Sur, África (exceptuando Egipto y Marruecos), China y Japón (cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución mundial del fuego bacteriano (según la EPPO, 2006). A: Presente, ampliamente distribuido; B: Presente, distribución restringida; C: Presente, poco frecuente; D: Detectado recientemente (2005-2007). Se han aplicado medidas de erradicación; X: Presente, sin detalles.

DISTRIBUCIÓN					
EUROPA		Italia	B	AFRICA	
Albania	B	Letonia	D	Egipto	B
Alemania	B	Luxemburgo	B	Marruecos	D
Armenia	B	Macedonia	A		
Austria	C	Noruega	C		
Bélgica	B	Polonia	B		
Bielorrusia	D	Reino Unido	B	NORTE AMERICA	
Bosnia-Herzegovina	B	Republica Checa	B	Bermudas	X
Bulgaria	B	Rumania	C	Canadá	A
Chipre	A	Suecia	B	Estados Unidos	B
Croacia	B	Suiza	B	México	B
Dinamarca	B	Turquía	A		
Eslovaquia	C				
Eslovenia	B			CENTROAMERICA	
España	B	ASIA		Guatemala	X
Francia	B	Siria	D		
Grecia	A	Irán	B		
Holanda	A	Israel	B		
Hungría	B	Jordania	A	OCEANIA	
Irlanda	B	Líbano	B	Nueva Zelanda	B

2.6.2 Síntomas de la enfermedad

La sintomatología varía según la especie y la sensibilidad varietal y se puede confundir con otros agentes infecciosos, por eso, para tener la certeza de que la planta está afectada por la enfermedad, es necesaria la confirmación mediante análisis en laboratorios especializados.

Todos los órganos de la planta pueden verse afectados por la bacteria. El síntoma más característico de la enfermedad es el aspecto quemado de las hojas y brotes de la planta afectada, así como el secado de las flores, el curvado de los brotes jóvenes en forma de cayado, la aparición en el fruto de manchas de color marrón (figura 8) y la formación de chancros en tronco y ramas (figura 10), así como el recubrimiento del órgano atacado de gotitas de exudado de color pardo (Rosen, 1935; Hildebrand, 1937) (figura 9).

De todas las especies afectadas, el peral (figura 7) es quien presenta los síntomas más espectaculares, ya que el follaje aparece con un aspecto negruzco como quemado y los arboles pueden morir en un solo periodo vegetativo y, en todo caso, la producción se reduce de forma importante (Butrón, 1995) (figura 6).



Figura 6. Flores, brotes y frutos jóvenes afectados por el fuego bacteriano



Figura 7. Frutos de pera en diferentes etapas afectados por el fuego *E. amylovora*



Figura 8. Chancro en ramas de pera y manzano causado por *E. amylovora*.



Figura 9. Coloraciones rojizas en el interior de ramas y troncos de manzano y peral



Figura 10. Exudados bacterianos en brotes de peral y manzano

2.6.3 Control del fuego bacteriano

Evitar heridas en los árboles porque además de la transmisión por insectos, la bacteria puede entrar a través de heridas o grietas en la corteza causadas por heladas. Después de podar las ramas infectadas, se recomienda desinfectar las herramientas con una solución de cloro al 10%. Las ramas infectadas deben cortarse por lo menos a 30 cm de distancia de donde el tejido presenta síntomas visibles. Esto debido a que la bacteria ya se ha movido a tejidos nuevos aunque aún no presente síntomas (Evans y col., 2008).

Para un control químico, la estreptomycinina ha sido el producto más eficaz hasta ahora, aunque ya se han aislado cepas de *Erwnia amylovora* resistentes en huertos de Estados Unidos. La estreptomycinina tiene que ser aplicada durante la floración cuando la temperatura oscila entre los 16-17 °C, el tratamiento debe realizarse cada 4 o 5 días. Otro producto empleado es la oxitetraciclina la cual no es tan eficaz (Evans y col., 2008).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro., así como en los laboratorios del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila ubicados todos en la Ciudad de Saltillo Coahuila, México.

3.1 Acondicionamiento del material vegetal en estudio

El material vegetal evaluado fue colectado en regiones del estado de Coahuila, México, por la empresa Biorganix Mexicana, S.A. de C.V. Las partes vegetales se depositaron en bolsas de plástico negro, y fueron etiquetadas. Las especies vegetales en estudio fueron, Damiana (*Turnera diffusa*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*), Mejorana (*Origanum majorana*), Romero (*Rosmarinus Officinalis*) y Ruda (*Ruta graveolenes*).

Las muestras fueron deshidratadas a una temperatura de 60 °C en una estufa de secado por un tiempo de 24 hrs y pulverizadas en un molino de cuchillas (pulvex mini 100 de martillos dentados hecho en México) y se tamizaron en malla de numero 20 para el control de la partícula, posteriormente se almacenaron en bolsas de polietileno (figura 11).



Figura 11. Molienda y tamizado de muestras vegetales

3.2 Etapa I: Obtención de los Extractos

Los extractos de las plantas se realizaron por tres diferentes métodos; reflujo, infusión y ultrasonido, empleando tres solventes diferentes agua, etanol y acetato de etilo, en una proporción 1:4 (peso/volumen).

3.2.1 Reflujo

La muestra pulverizada se colocó en el equipo de reflujo en una proporción 1:4 (sólido líquido), y empleando cada uno de los solventes, se mantuvo a goteo lento, con una temperatura de 60 °C por un tiempo de 2 hrs (figura 12).

Posteriormente se filtró el extracto empleando tela de manta de poro fino y se recuperó en recipientes no transparentes para evitar contacto directo con la luz.



Figura 12. Equipo de reflujo empleado en el experimento

3.2.2 Infusión

Se aplicó el método empleado por (Ventura-Sobrevilla y col., 2011). El solvente se calentó a fuego directo, se esperó a que alcanzara hasta el punto de ebullición y se adiciono la parte solida dejando reposar por un tiempo de 10 minutos (figura 13).

Posteriormente se filtró el extracto empleando tela de manta de poro fino y se recuperó en recipientes no transparentes para evitar contacto directo con la luz.



Figura 13. Método de infusión

3.2.3 Ultrasonido

Se aplicó el método empleado por Gao y Liu., (2005). Se colocó la muestra en un vaso de precipitados, proporción 1:4 (peso/volumen), posteriormente con la mezcla (solvente-planta) se colocó en un Sonicador (Bransonic 2510-MTH) por un tiempo de 15 minutos (figura 14).

La muestra se filtró en tela de manta de poro fino y se recuperó en recipientes no transparentes para evitar contacto directo con la luz.



Figura 14. Método de ultrasonido, equipo Sonicador (Bransonic 2510-MTH).

3.3 Etapa II: Determinación de actividad antioxidante

3.3.1 Dilución de los extractos

Se realizaron diluciones de cada uno de los extractos vegetales en base a la cantidad de sólidos presentes y con la finalidad de que las muestras tuvieran concentraciones bajas y pudieran ser leídas por el equipo Epoch en la cuantificación de polifenoles. Se empleó la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, para el cálculo de las concentraciones donde C_1 =Concentración 1, V_1 = Volumen 1, C_2 = Concentración 2 y V_2 =Volumen 2.

3.3.2 Cuantificación de polifenoles hidrolizables por el método de Folin-Ciocalteu en microplaca

Se empleó la técnica de cuantificación de polifenoles hidrolizables por el método de Folin-Ciocalteu en microplaca descrita por Wong-Paz., (2012).

Se colocaron 20 μ L de la muestra (concentración conocida) en un pozo de la microplaca. Posteriormente se añadieron 20 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló correctamente y se dejó reaccionar por 5 minutos. Posteriormente se colocaron 20 μ L de carbonato de sodio (0.01 M), se mezclaron y dejaron reaccionar por 5 minutos. Por último la mezcla fue diluida con 125 μ L de agua destilada y se leyó absorbancia a 790 nm en un lector de microplacas (Epoch USA) (figura 15). En cada corrida se leyó un blanco y un control, donde el blanco fue agua milli Q y para el control se sustituyeron 20 μ L de agua milli Q en lugar de la muestra.

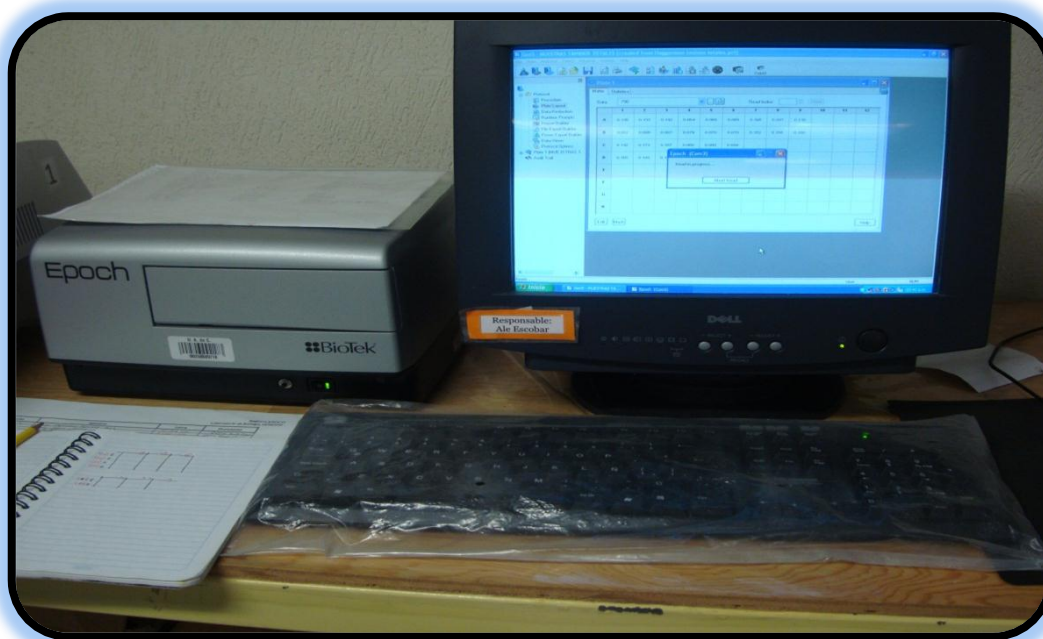


Figura 15. Lector de microplacas (Epoch)

3.4 Etapa III: Influencia de los extractos de Eucalipto y Mejorana sobre el crecimiento de *Erwinia amilovora*

3.4.1 Concentración de los extractos

Los extractos se concentraron empleando el método de rotavapor. La muestra se colocó en un matraz bola fondo plano y se adaptó al equipo de rotavapor (RTV-08-P) por un tiempo de 3 hrs para cada una de las muestras, hasta lograr la evaporación total del solvente (figura 16)



Figura 16. Equipo de rotavapor

3.4.2 Bioensayos

Para la evaluación de los extractos se empleó la técnica del medio envenenado. Para ello, previamente se determinó y cuantificó el volumen de cada extracto de acuerdo a la cantidad de taninos presentes en cada extracto (cuadro 3).

Cuadro 3. Extractos, solvente y concentraciones empleadas.

Extracto	Solvente	Concentraciones (%)
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	Etanol	0.25, 0.5, 1.0
<i>Origanum majorana</i>	Etanol	0.25, 0.5, 1.0

3.4.2.1 Preparación del medio envenenado

Se empleó el medio no selectivo B de King, en un matraz Erlenmeyer se colocaron 1000 ml de agua destilada, posteriormente se agregaron 20 g de proteosa de pepona No 3, enseguida se agregaron 10 ml de glicerol, 1.5 g de K_2HPO_4 y 1.5 g de $MgSO_4$ (figura 17).



Figura 17. Medio B de King

Posteriormente se homogenizo el medio en una parrilla de agitación y calentamiento (PC-600D), se colocó en matraces Erlenmeyer de 100 ml (figura 18). Enseguida se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos, posteriormente se agregaron los extractos en sus diferentes concentraciones, realizándolo cerca de la flama de un mechero fisher con la finalidad de evitar contaminaciones.

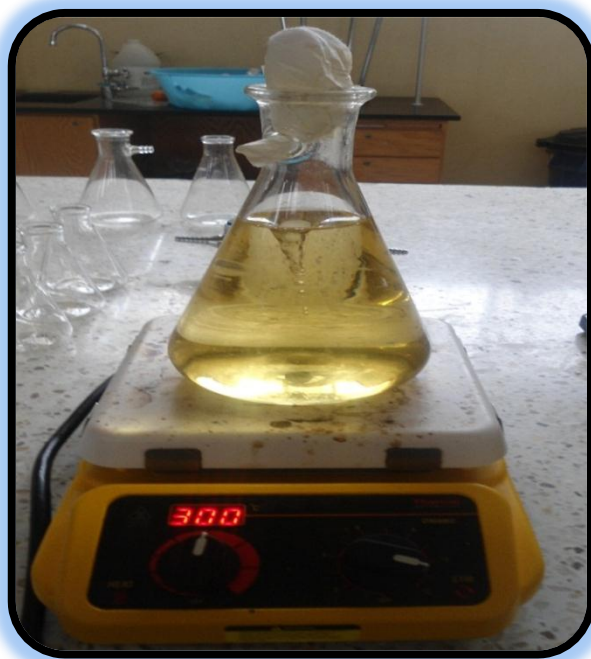


Figura 18. Parrilla de agitación y calentamiento

3.4.2.2 Siembra en el medio envenenado

Para la siembra la bacteria *Erwinia amylovora* fue resembrada por 24 hrs a 27 °C en tubos de ensaye en medio inclinado. Posteriormente se realizó el arrastre del inculo empleando agua estéril y se inocularon 0.5 ml de la bacteria en cada uno de los matraces, todo esto se realizó en una cámara especial para siembras microbiológicas y cerca de la flama de dos mecheros fisher para evitar contaminaciones de otro tipo de microorganismos, se incubo a 27 °C en un equipo con agitación orbital (Shaking Incubator (LabTEch)) a 150 rpm, por un tiempo de 96 hrs (figura 19), se tomaron muestreos a las 0 ,12, 24, 48, 72 y 96 hrs, las muestras fueron colocadas en tubos ependorf de 2 ml y congeladas hasta su posterior uso.



Figura 19. Incubadora con agitación

3.4.2.3 Medición de las muestras por Espectrofotometría

Se realizaron las mediciones en un Espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys, USA), a 590 nm (figura 20). Posteriormente se organizaron los datos obtenidos para ser analizados enseguida.



Figura 20. Espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys, USA)

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de los métodos de extracción

La evaluación de los métodos de extracción se dio en base a la cantidad de polifenoles hidrolizables (PH) equivalentes a ácido gálico contenidos en 5 especies vegetales, *Turnera diffusa* (damiana), *Origanum majorana* (mejorana), *Eucaliptus globulus* Labill (eucalipto), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Ruta graveolens* (ruda), obtenidos con diferentes solventes (agua, etanol y acetato de etilo (AE)) y por 3 métodos de extracción (reflujo, infusión y ultrasonido).

Las concentraciones de polifenoles hidrolizables obtenidas de las relaciones vegetal/solvente/método de extracción, así como el contenido de sólidos de los diferentes extractos se muestran en los cuadros 4, 5, 6.7 y 8

Cuadro 4. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm) equivalentes a ácido gálico, determinados en *Turnera diffusa*.

Vegetal/solvente/método de extracción	Contenido de sólidos (mg/ml)	Polifenoles hidrolizables (ppm)
<i>Turnera diffusa</i> /agua/reflujo	50.3	37.08 ± 1.29c
<i>Turnera diffusa</i> /agua/infusión	52.8	32.20 ± 1.44c
<i>Turnera diffusa</i> /agua/ultrasonido	47.1	87.67 ± 24.8a
<i>Turnera diffusa</i> /etanol/reflujo	69.5	39.10 ± 3.08b
<i>Turnera diffusa</i> /etanol/infusión	18.6	50.17 ± 3.60c
<i>Turnera diffusa</i> /etanol/ultrasonido	15.3	53.74 ± 4.14b
<i>Turnera diffusa</i> /AE/reflujo	17.1	ND
<i>Turnera diffusa</i> /AE/infusión	4.4	ND
<i>Turnera diffusa</i> /AE/ultrasonido	10.6	ND

ND: No Detectado; AE: Acetato de Etilo

Cuadro 5. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm) equivalentes a ácido gálico, determinados en *Origanum majorana*.

Vegetal/solvente/método de extracción	Contenido de solidos (mg/ml)	Polifenoles hidrolizables (ppm)
<i>Origanum majorana</i> /agua/reflujo	39.7	105.05 ± 10.22a
<i>Origanum majorana</i> /agua/infusión	108.2	62.09 ± 3.15ab
<i>Origanum majorana</i> /agua/ultrasonido	93.7	48.86 ± 1.63cb
<i>Origanum majorana</i> / etanol/reflujo	86.2	123.51 ± 10.60a
<i>Origanum majorana</i> /etanol/infusión	17.6	62.20 ± 1.48b
<i>Origanum majorana</i> /etanol/ultrasonido	7.2	77.96 ± 6.75a
<i>Origanum majorana</i> /AE/reflujo	10.8	ND
<i>Origanum majorana</i> /AE/infusión	8.4	ND
<i>Origanum majorana</i> /AE/ultrasonido	8.5	ND

ND: No Detectado; AE: Acetato de Etilo

Cuadro 6. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm) equivalentes a ácido gálico, determinados en *Eucaliptus globulus Labill.*

Vegetal/solvente/método de Extracción	Contenido de solidos (mg/ml)	Polifenoles hidrolizables (ppm)
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /agua/reflujo	45.9	55.65 ± 1.42b
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /agua/infusión	45.9	67.43 ± 2.34a
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /agua/ultrasonido	38.2	72.80 ± 2.83ab
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /etanol/reflujo	19.2	117.67 ± 2.06a
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /etanol/infusion	20.1	78.03 ± 5.53a
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /etanol/ultrasonido	41.6	50.17 ± 4.18bc
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /AE/reflujo	20.5	ND
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /AE/infusion	13.4	ND
<i>Eucaliptus globulus Labill</i> /AE/ultrasonido	82.2	ND

ND: No Detectado; AE: Acetato de Etilo

Cuadro 7. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm) equivalentes a ácido gálico, determinados en *Rosmarinus officinalis*.

Vegetal/solvente/método de extracción	Contenido de solidos (mg/ml)	Polifenoles hidrolizables (ppm)
<i>Rosmarinus officinalis</i> /agua/reflujo	65.6	53.51 ± 3.17b
<i>Rosmarinus officinalis</i> /agua/infusión	69.3	56.13 ± 5.53b
<i>Rosmarinus officinalis</i> /agua/ultrasonido	61.1	30.30 ± 0.94c
<i>Rosmarinus officinalis</i> /etanol/reflujo	53.2	43.87 ± 3.86b
<i>Rosmarinus officinalis</i> /etanol/infusión	85.4	56.13 ± 2.03bc
<i>Rosmarinus officinalis</i> /etanol/ultrasonido	26	56.48 ± 4.65b
<i>Rosmarinus officinalis</i> /AE/reflujo	34.5	ND
<i>Rosmarinus officinalis</i> /AE/infusión	27.1	ND
<i>Rosmarinus officinalis</i> /AE/ultrasonido	24.1	ND

ND: No Detectado; AE: Acetato de Etilo.

Cuadro 8. Concentración de polifenoles en partes por millón (ppm) equivalentes a ácido gálico, determinados en *Ruta graveolens*.

Vegetal/solvente/método de extracción	Contenido de solidos (mg/ml)	Polifenoles hidrolizables (ppm)
<i>Ruta graveolens</i> /agua/reflujo	54.3	21.25 ± 0.21d
<i>Ruta graveolens</i> /agua/infusión	58.1	23.03 ± 0.21d
<i>Ruta graveolens</i> /agua/ultrasonido	54.4	26.01 ± 1.86c
<i>Ruta graveolens</i> /etanol/reflujo	23.5	41.60 ± 0.55b
<i>Ruta graveolens</i> /etanol/infusión	17.3	37.55 ± 2.56d
<i>Ruta graveolens</i> /etanol/ultrasonido	12.7	41.84 ± 1.80c
<i>Ruta graveolens</i> /AE/reflujo	10.6	ND
<i>Ruta graveolens</i> /AE/infusión	6.8	ND
<i>Ruta graveolens</i> /AE/ultrasonido	6.5	ND

ND: No Detectado; AE: Acetato de Etilo

Con el método de reflujo las concentraciones más altas de polifenoles hidrolizables se mostraron con las relaciones mejorana/etanol, mejorana/agua y eucalipto/etanol con 123.51 ppm, 105.05 ppm y 117.67 ppm respectivamente. Así mismo las concentraciones más bajas fueron con las relaciones ruda/agua, damiana/agua y damiana/etanol con 21.25 ppm, 37.08 ppm y 39.1 ppm para cada una de ellas como se muestra en la figura 21. Se observó que etanol fue el mejor solvente para este método, además de que mejorana y eucalipto presentaron las mejores concentraciones. Con el solvente acetato de etilo (AE) no fue posible cuantificar los polifenoles hidrolizables debido a que el solvente no es miscible con el reactivo de Folin-Ciocalteu esto en base a unas pruebas rápidas de miscibilidad.

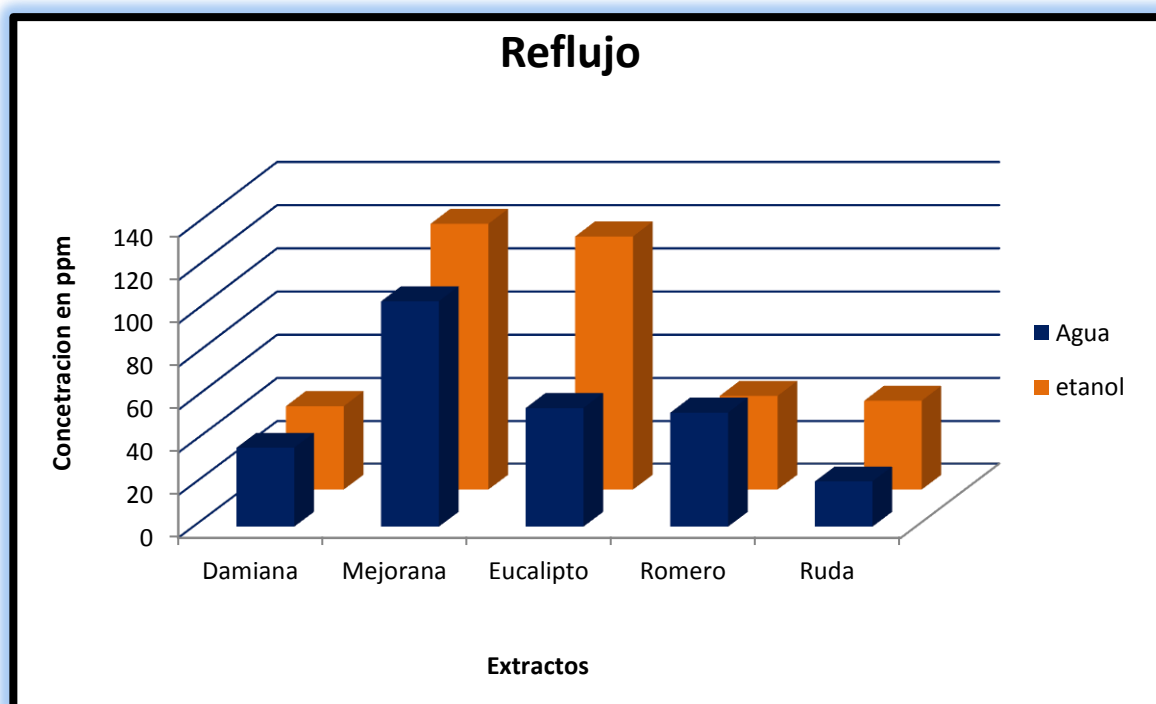


Figura 21. Comparación entre extractos y solventes con el método de reflujo.

Por su parte el método de infusión presentó los mejores resultados con las siguientes relaciones, eucalipto/etanol, eucalipto/agua y mejorana/etanol con 78.03 ppm, 67.43 ppm y 62.2 ppm de polifenoles hidrolizables. Las relaciones entre ruda/agua, damiana/etanol y ruda/etanol presentaron las concentraciones más bajas con 23.03 ppm, 32.2 ppm y 37.55 ppm respectivamente (Figura 22). Eucalipto y mejorana mostraron las concentraciones más altas y por su parte etanol fue el mejor solvente en este método de extracción. Con el solvente acetato de etilo (AE) no fue posible la cuantificación de los compuestos fenólicos debido a que el solvente no es miscible con el reactivo de Folin-Ciocalteu esto en base a unas pruebas rápidas de miscibilidad.

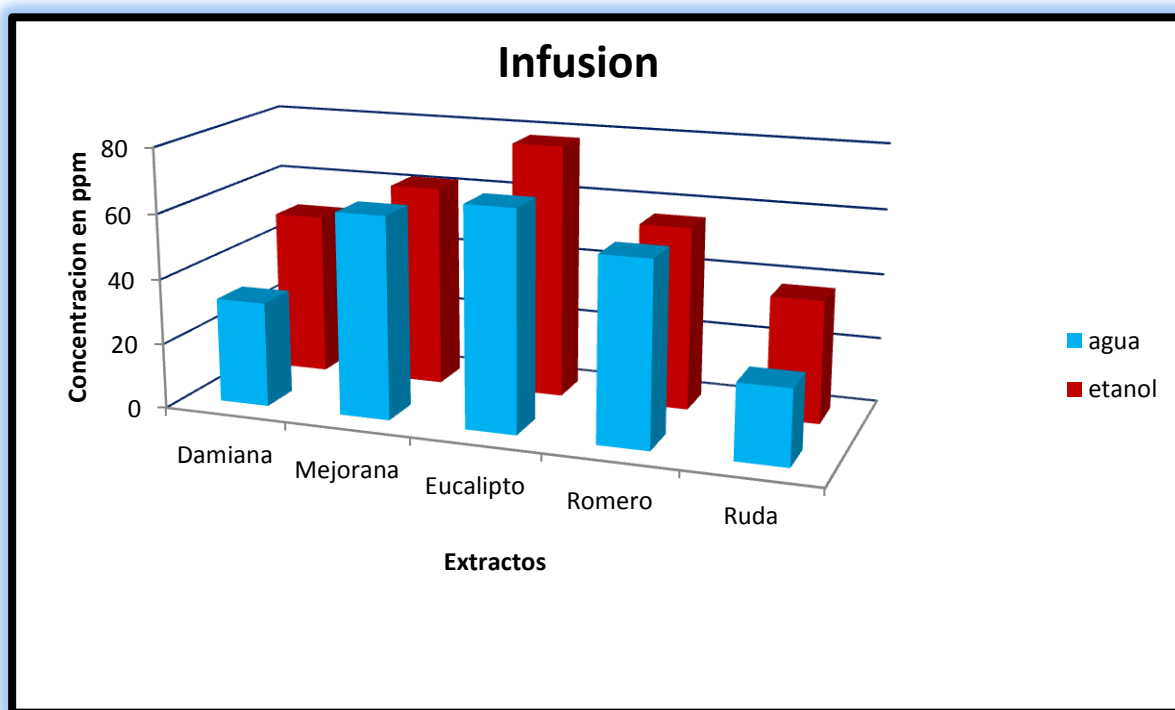


Figura 22. Comparación entre extractos y solventes con el método de infusión

En la figura 23 se puede observar que las relaciones entre damiana/agua, mejorana/etanol y eucalipto/agua presentaron las concentraciones más altas de polifenoles hidrolizables con 87.67 ppm, 77.19 ppm y 72.8 ppm respectivamente. Por otro lado las concentraciones más bajas se presentaron en las relaciones ruda/agua, romero/agua y ruda/etanol con 26.01 ppm, 30.3 ppm y 41.84 ppm. Damiana y mejorana presentaron los mejores rendimientos, y el agua fue el mejor solvente en este método. Con el solvente acetato de etilo (AE), no se pudieron cuantificar los polifenoles debido a que el solvente no es miscible con el reactivo de Folin-Ciocalteu esto en base a unas pruebas rápidas de miscibilidad

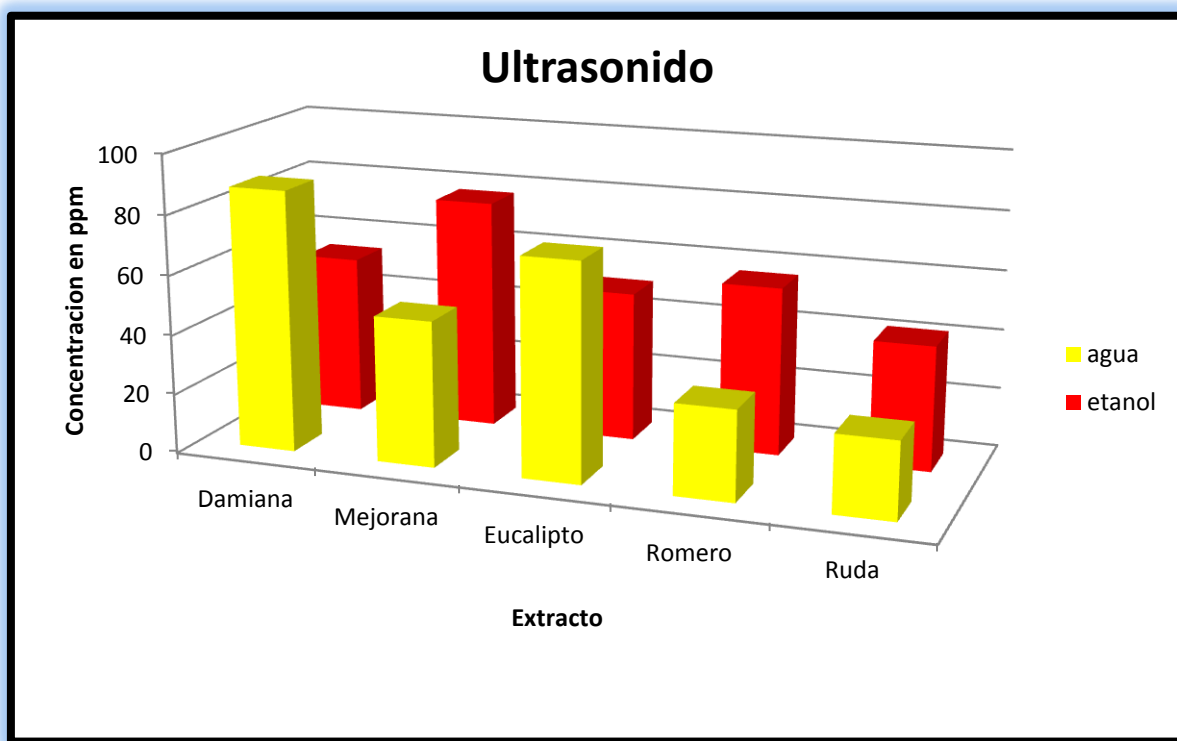


Figura 23. Comparación entre extractos y solventes con el método de ultrasonido

Haciendo una comparación entre los métodos empleados en base a la concentración de polifenoles presentes y el solvente empleado, los mejores resultados se obtuvieron con las relaciones eucalipto/etanol/reflujo con 117.67 ppm de polifenoles y mejorana/etanol/reflujo con 123.51 ppm. Comparando estas concentraciones con las que obtuvo Clemente-Constantino (2010) son concentraciones altas ya que el obtuvo con *L. tridentata* 16.96 ppm, *F. cernua* 8.60 ppm, y *A. lechuguilla* 28.87 ppm empleando la relación etanol/reflujo. Así mismo Vicente y col., (2010) encontraron concentraciones de polifenoles de 36.6 ppm y 31.0 ppm en muestras de *R. officinalis* empleando la relación etanol/reflujo lo cual nos indica que nuestras concentraciones son mayores que estas. El método de infusión arrojó las concentraciones más bajas en comparación a los métodos de reflujo y ultrasonido (Figura 22).

4.2. Efecto de los extractos de Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) y Mejorana (*Origanum majorana*) contra el crecimiento de *Erwinia amylovora*.

Los extractos de *Eucalyptus globulus* Labill y *Origanum majorana*, quienes presentaron las mayores concentraciones de polifenoles hidrolizables 117.67 ppm y 123.51 ppm respectivamente con el solvente etanol y el método de reflujo se pasaron por rotavapor para la eliminación del solvente y poder tener muestras concentradas. Los extractos concentrados se evaluaron contra el crecimiento de la *E. amylovora* en medio líquido por un método espectrofotométrico.

En las Figura 24 se observa que el extracto de *Eucalyptus globulus* Labill a concentración de 0.25 % retarda el crecimiento de *E. amylovora* en un 19.54%, con la concentración de 0.50% se retardo el crecimiento en un 68.90%, mientras que con la concentración de 1% fue de 73.85%. Los resultados observados con *Eucalyptus globulus* Labill son semejantes a lo reportado por Mosch y Zeller (1989), donde menciona que extractos de *Mahonia aquifolium* Nutt, *Berberis vulgaris* L, *Rhus typhina* L. y *Allium sativum* controlaron en un 25.6% y 53.2% el crecimiento de *E. amylovora*. Así mismo Mosch y Klingauf (1989), encontraron una inhibición en el crecimiento de *E. amylovora* utilizando extractos acuosos de

Juglans nigra L, *B. vulgaris* y *R. thyphina* en concentraciones de 1.25% y 5.2%, respectivamente. De igual forma Zaccheo (1990) informo que extractos, de meristemas apicales de pera cv. Bartlett al 1% tuvieron efectos bacteriostáticos in-vitro contra *E. amylovora*. Por su parte Ramírez-González y col., (2011) encontraron que extractos de *O. vulgare*, *T. Spathacea* y *Z. officinale* inhibieron en un 34%, 43.6% y 40.4% el desarrollo de *Moniliophthora roreri*, empleando la relación presurización/etanol.

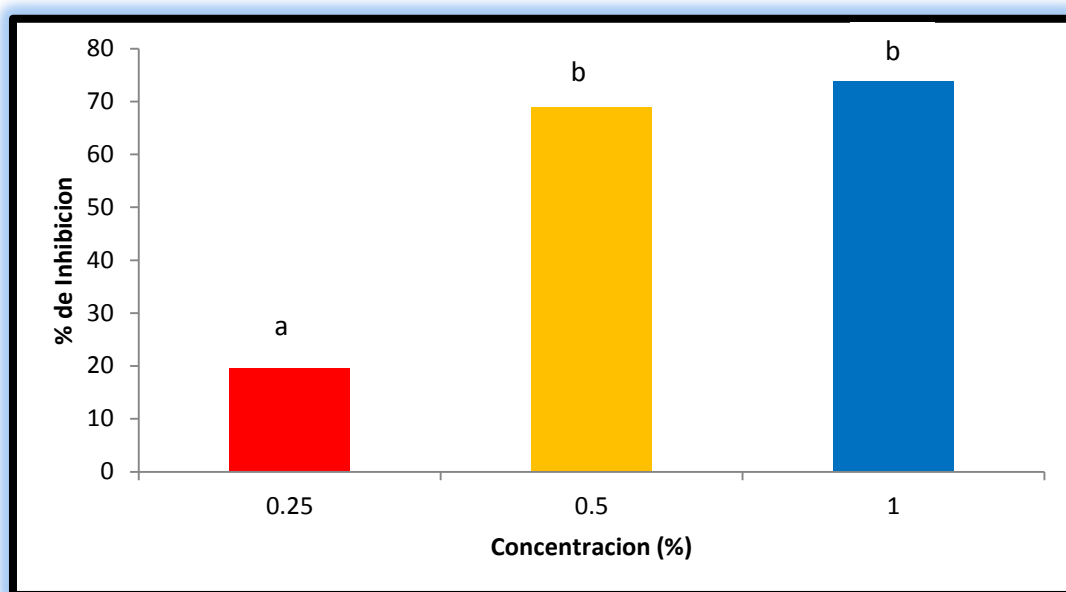


Figura 24. Efecto del extracto de *Eucalyptus globulus* Labil sobre *E. amylovora*

Por su parte el extracto de *Origanum majorana* mostro efectos mínimos en contra de la bacteria con las concentraciones de 0.25% y 0.50% quienes retardaron el crecimiento de la bacteria solamente en un 4.36% y 3.88% respectivamente, por su parte la concentración de 1% no mostro ningún efecto contra la bacteria, (figura 25).

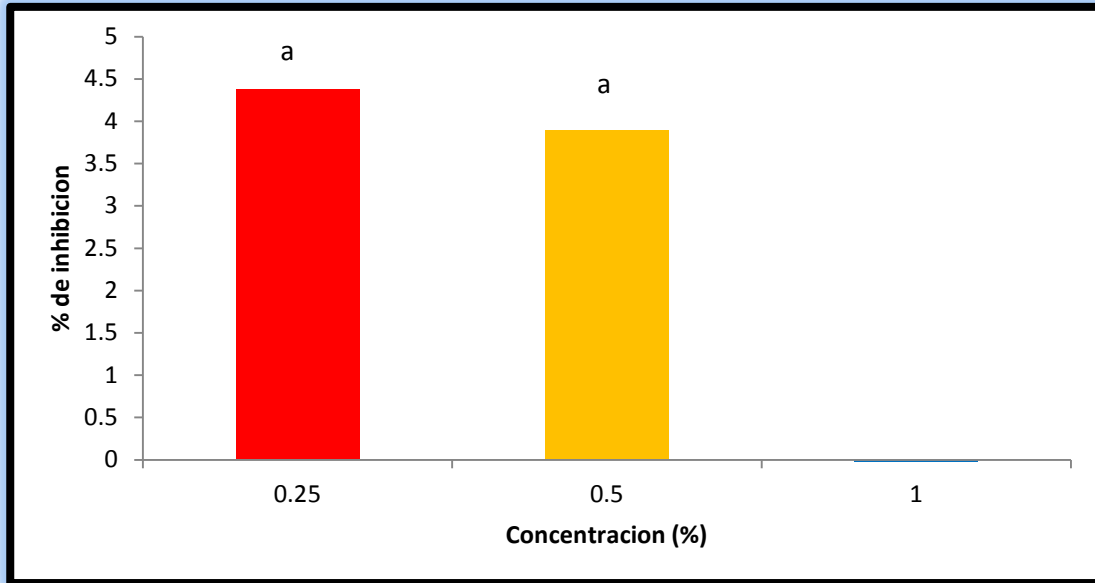


Figura 25. Efecto del extracto de *Origanum majorana* sobre *E. amylovora*

La efectividad de los extractos puede darse de acuerdo al material vegetal de donde se obtuvo el extracto, el método de extracción empleado, las condiciones empleadas para el manejo del extracto y el microorganismo en el que se va a probar.

4.2.1 Análisis estadístico

4.2.1.1 Análisis de tratamientos a diferentes concentraciones del extracto de eucalipto y mejorana contra *E. amylovora*.

En el cuadro 9 se muestran los resultados del análisis estadístico aplicando la prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) de la aplicación del extracto de eucalipto concentrado como inhibidor de la bacteria *E. amylovora*. Se encontró que la concentración de 0.25% fue la que presentó menor efecto inhibitorio contra la bacteria, y las concentraciones de 0.5% y 1% presentaron el mayor efecto inhibitorio, sin embargo no se encontró una diferencia significativa entre estas dos, pero entre la concentración de 0.25% y las otras dos concentraciones sí se encontró diferencias significativas.

Cuadro 9. Efecto del extracto de *E. globulus* L. sobre *E. amylovora*

Concentración (%)	Inhibición (%)
0.25	19.54a
0.50	68.90b
1.00	73.85b

Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

Para el extracto de mejorana el estudio arrojó que no existe diferencia significativa para ninguna de las concentraciones empleadas (0.25%, 0.5%, 1.0%), sin embargo las concentraciones de 0.25% y 0.50% presentaron un efecto mínimo en contra de la bacteria.

Cuadro 10. Efecto del extracto de *O. majorana* sobre *E. amylovora*

Concentración (%)	Inhibición (%)
0.25	4.36a
0.50	3.88a
1.00	-0.28a

Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

4.2.1.2 Comparación de los inhibidores a diferentes concentraciones

En los cuadros 11, 12, 13 y 14 se compara el efecto inhibitorio contra *E. amylovora* de los extractos concentrados de eucalipto y mejorana a diferentes concentraciones. Se encontró que hubo una diferencia significativa entre los dos inhibidores, con el de eucalipto el crecimiento se obtuvo un crecimiento menor de la bacteria con respecto al obtenido con el extracto de mejorana.

Cuadro 11. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 0% de extracto

Tiempo (hrs)	Densidad óptica/h	
	Mejorana	Eucalipto
0	0.0a	0.1a
12	1.2a	0.9b
24	1.5b	1.4b
48	1.7a	0.7b
72	1.7b	1.4b
96	1.7a	1.0a

Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

Cuadro 12. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 0.25%

Tiempo (hrs)	Inhibidor	
	Mejorana	Eucalipto
0	0.2a	0.1a
12	1.1a	0.6b
24	1.6a	0.8b
48	1.8a	1.1b
72	1.9a	1.1b
96	1.8a	1.2b

Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

Cuadro 13. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 0.5%

Tiempo (hrs)	Inhibidor	
	Mejorana	Eucalipto
0	0.1a	0.2a
12	1.2a	0.2b
24	1.6a	0.5b
48	1.8a	1.3a
72	1.8a	1.5a
96	1.8a	1.6a

Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

Cuadro 14. Comparativo entre los inhibidores a concentración de 1.0%

Tiempo (hrs)	Inhibidor	
	Mejorana	Eucalipto
0	0.3a	0.5a
12	1.3a	0.6b
24	1.7a	0.6b
48	1.9a	1.4a
72	1.9a	1.6a
96	1.9a	1.7a

Las medias que no comparten la misma literal son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en la que se desarrolló el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

El método de reflujo presenta una buena alternativa para la obtención de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos y apoyado de etanol como solvente el cual presento los mejores resultados en comparación a los otros dos métodos y solventes estudiados.

La evaluación de los métodos de infusión y ultrasonido requieren de nuevos estudios, debido a que en el presente trabajo pudieron haberse presentado algunos factores que requieren ser analizados y controlados para obtener resultados de forma más clara y de igual forma obtener concentraciones más altas de compuestos fenólicos en las muestras vegetales.

La cuantificación de polifenoles hidrolizables por el método de Folin-Ciocalteu en micro placa es una buena opción porque es un método rápido y utiliza menores cantidades de muestra y reactivos que por otros métodos, además los datos se pueden analizar de forma rápida después de cada corrida.

El extracto vegetal de *Eucaliptus globulus* Labill es capaz de retardar el crecimiento de la bacteria *Erwinia amylovora* causante de la enfermedad del fuego bacteriano en árboles frutales de manzano y peral.

El extracto vegetal de *Origanum majorana* empleado mostro efectos relativamente bajos en contra del crecimiento de la bacteria *Erwinia amylovora*.

Los extractos de *Turnera diffusa*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens* no se probaron en este estudio contra la bacteria fitopatogena *E. amylovora*, porque no presentaron concentraciones bajas de polifenoles.

6. RECOMENDACIONES

Es necesario realizar nuevos estudios con el extracto vegetal de *Origanum majorana* ya que para este estudio no presento ningún efecto contra el crecimiento de *E. amylovora*, así como controlar los factores en el proceso de extracción para evitar que el extracto pierda su actividad antibacteriana, como la temperatura de extracción y el contacto con la luz.

Se debe mantener un control de los factores (temperatura, luminosidad, filtración) que se presentan en los métodos de extracción, con la finalidad de que los compuestos fenólicos no pierdan su potencial para el cual vayan a ser probados.

Con el extracto de Eucalipto sería bueno realizar otro estudio y probar con la concentración de 0.75%, debido a que las concentraciones de 0.5% y 1.0% no hubo diferencia significativa.

Se deben realizar nuevos estudios en los métodos de extracción con las especies ruda, romero y damiana analizando diversos factores (temperatura, luminosidad, filtración) para obtener extractos más ricos en polifenoles y probarlos contra otros microorganismos fitopatógenos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alcaraz, M.L. (1999). Estudio de las condiciones para la micro propagación de Damiana (*Turnera diffusa*). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de México. México, D.F. P.109.

Aldwinckle, H.S., Beer, S.V. 1978. Fire blight and its control. *Horticultural Reviews*, 1: 423-474.

Alstroem, S. (1992). Actividad Antibacteriana de los Desechos para preparar Te y Café contra algunos Patógenos de plantas *Pseudomonas syringae* cepas. Journal de Fitopatología. 136(4):329-334.

Aranda, O.S. (2002). Enfermedades Bacterianas en ornamentales. In: Manejo fitosanitario en ornamentales. Bautista M., J. Álvarez., J.C. Chavarría. P., H. Sánchez., A. Ed. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 156 pp.

Arciniegas, A. (2002). Evaluación del Potencial Antifungico de 20 extractos de Plantas Asociados en Contra *Mycosphaerella fijiensis*. Trabajo de Grado (Titulo Biólogo). Ibagué-Colombia. Biblioteca "Rafael Parra Cortez". Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. 155 pp.

Arciniegas, A., Riveros, A., y Loaiza, J. (2002). Efecto de Extractos Vegetales sobre el Desarrollo in-vitro de *Mycosphaerella figiensis*, Agente Causal de la Sigatoka negra en Musáceas. In: Memorias de XV Reunión Internacional ACORBAT-AUGURA. Colombia (27-oct a 2-nov 2002). Cartagena, Colombia. 242. pp.

Argueta, A. (1994) Atlas de plantas de la medicina tradicional Mexicana, vol. III. Instituto Nacional Indigenista. México, pp. 1222, 1223 y 1257.

Arriaga, C.L y Breceda., S.C. (1999). Tropical dry forest of the cape región of Baja California Peninsula. In: Follrott., F.P and A. Ortega., R. (Ed). Ecology and

management of forest, Woodlands and shrublands in the dryland regions of the United States and Mexico: Perspectives for the 21th century. Co-edition No.1. University of Arizona, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C: USDA, Forest Service, México, p: 121-151.

Bogdanove, A.J., Kim, J.F., Beer, S.V. (2000). Disease-Specific genes of *Erwinia amylovora*, Keys to understanding Pathogenesis and Potential targets for Disease control: 163-177. In: Vanneste, J.L. (ed.). Fire Blight, the Disease is causative agent *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Walling Ford, UK. ISBN:0-85199-294-3.

Brenner, D.J. (1984). Family I, Enterobacteriaceae. Pags. 408-420, Vol I. In: Krieg, N.R.A., Holt, J.G. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. ISBN:0-683-04102-8.

Burril, T.J. 1883. New species of *Micrococcus*. *American Naturalist*, 17: 319-320.

Butrón, L. 1995. El fuego bacteriano. Una grave enfermedad para manzanos y perales. *Fruitel*, 10-11

Cano, M.P. (2005). Procesado mínimo y valor nutricional en Nuevas Tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Capítulo 7. Ed. CIAD, A.C., México.

Crespo, M. (1989). Plantas Aromáticas para condimento. No.1. Editorial ALBATROS, SACI, Buenos Aires, Republica de Argentina. Pág. 125-135.

Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). In: Biochemistry and Molecular Biology of plants. Buchanan., B.B., Grisse., W., Jones., R.L. (Editors). American Society of Plant Physiologist. Rockville. US. Pag. 1250-1318.

De Mendonca, F.A.C., Da Silva, K.F.S., Dos Santos, K.K., Ribeiro, K.A.L., Junior, A.E.G. (2005). Activities of some Brazilian plants against larvae of the Mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*: 76:629-636.

Dellagi, A., Brisset, M.N., Paulin, J.P., Expert, D. (1998). Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* Pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 11:734-742.

EPPO 2006. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe. *Erwinia amylovora*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*.

Espinoza-García, F.J. (2001). La Diversidad de los Metabolitos Secundarios y la Teoría de la Defensa Vegetal. In: Anaya, A.L., F.J. Espinoza-García., R. Cruz-Ortega. *Relaciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas*. Instituto de Ecología. Plaza y Valdez, S.A. de C.V. México, D.F.

Evans, K., Frank, E. Beddes, T., Pace, M., Shao, M. and Moulton, A. 2008. Fire blight. Utah pest fact sheet <http://extension.usu.edu/files/publications/factsheet/fire-blight-08.pdf>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)., (2004). El futuro de la agricultura depende de la biodiversidad (en línea), Consultado el 28 de Diciembre de 2012. Disponible en: <http://www.fao.org/newsroom/es/fows/2004/51102/index.html>.

Funatogawa K., Hayashi S., Shimomura H., Yoshida T., Hatano T., Ito H., Hirai Y. (2004). Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. 48(4): 251-261.

Gallegos, M.G., Cepeda, S.M y Olayo, P.R.P. (2003). *Entomopatogenos*. Ed. Trillas, México, 9-10 pp.

Gao, M. y Liu, C. 2005. "Comparison techniques for the extraction of flavonoids from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1461-1463.

Geider, K. (2000). Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: Structure, biosynthesis, regulation, role in Pathogenicity of amylovora and Levan: 117-140.

In: Vanneste, J.L. (ed.). Fire Blight, the Disease is causative agent *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Walling Ford, UK. ISBN:0-85199-294-3.

Gleason, H.A. (1968). The choripetalosos Dicotyledoneae. Vol. 2. 665 p. In: H.A. Gleason III. Fl.US. Ed. 3. New York. Botanical Garden, New York.

González, J., Benavides, V., Rojas, R., Pino, J. (2007). Efecto Embriotoxico y Teratogenico de *Ruta chalepensis* L. (Ruda), en ratón (*Mus musculus*). Revista Peruana de Biología. 13(3):223-226.

Gros, G.E., Pamilio, B.A., Seldes, M.A., Burton, B. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Programa regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington D.C. Pag.215-213.

Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T.(1998) Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. Phytochemistry. 48(1): 125-129.

Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs previously unexplored natural products (en línea). Drug Discovery Today 5(7): 294-300. Consultado en: <http://www.ibmb.uni.wroc.pl/prace2/praca18/pdf/>

Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J. (1998). Phylogenetic position of Phytopathogens within the Enterobacteriaceae Systematic and Applied Microbiology. 21:384-397.

Hernández Castillo, F.D., Berlanga Padilla, A.M., Gallegos, M.G., Siller, C.M, Rodríguez Herrera, R., Aguilar Gonzales, C.N. y Castillo Reyes, R. (2011). *In-vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6(3):410-417, ISSN-1557-4989.

Hernández, J., Rodríguez, D., Sanabria, M., Blanco, G., Sanabria, N. (2006). Efecto de Extractos de *Heliotropium indicum* L, *Lippia organoides* y *Phyllanthus*

niruri L., en hijos de "Plátano Harton", para el Control de *Mycosphaerella fijiensis*. Morelet en Yaracuy, Venezuela. XVII Reunion Internacional de Associacao para Cooperacao nas Pesquisas sobre Banano no Caribe na América Tropical. ACORBAT. Joinville, Santa Catalina, Brazil. 565-568 p.

Hildebrand, E.M. 1937. The blossom-blight phase of fire blight and methods of control. *cornell University Agriculture Experiment Station Memoirs*, 207. Ithaca, New York, 40 pp.

Hnatyszyn, O., Arenas, P., Moreno, A., Rondita, R., Coussio, J.D. (1975). Plantas reguladoras de la fecundidad según la medicina folklórica. *Revista Científica del Paraguay*, 14:23-57.

Hopia, A.I., Huang, S.W., Schwarz, K., German, J.B. y Franked, E.N. (1996). Effect of different lipid systems on antioxidant activity of *Rosemary* constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(8):2030-2036.

Jacobson, M., D.G.Crosby (1971). *Naturally Occurring Insecticides*. Marcel Dekker. New York. pp. 54.

Keil, H.L., Van Der Zwet, T. 1972. Recovery of *Erwinia amylovora* from symptomless stems and shoots of Jonathan apple and Barlett pear trees. *Phytopathology*, 62: 39-42.

Kim, W.S., Rhim, S.L., Volkseh, B., Gardan, L., Paulin, J.P., Jock, S., Geider, K. (1999). Characterization of a New *Erwinia* Species affecting Asian pear trees. *Acta Horticulturae*. 489:201-205.

Kim, J.F., Beer, S.V. (2000). Hpr genes and Harpins of *Erwinia amylovora*. A decade of Discovery: 141-161. In: Vanneste, J.L (ed.). *Fire Blinght, the Disease is causative agent Erwinia amylovora*. *CABI Publishing, Walling Ford, UK*. ISBN:0-85199-294-3.

Koduro, S., Grierson, D.S., y Alfoloyan, A.J. (2006). Antibacterial Activity of *Solanum aculeastrum*. *Pharmaceutical Biology*. 44(4):283-286.

Leung, A. y Foster, S. (1996). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics*. John Wiley and sons. Inc; New York. pp: 364-492.

Lira-Saldivar, R.H. (2003). Estado Actual del Conocimiento sobre las propiedades biosidas de la gobernadora (*Larrea tridentata*). D.C Coville. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(2):214-221.

López, M., Montesinos, E., Lecompte, P., Paulin, J.P. 1996. El fuego bacteriano del peral, una amenaza permanente: Situación actual, epidemiología y control de la enfermedad. *Fruticultura Profesional*, 78: 79-87.

López, M.M., Montesinos, E. 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas: 515-558. En: G. LLácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (eds.). *Patología vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología-Agropupli. Vol.1. ISBN: 84-921910-07.

López, M.M., Noval, C., Palazón, E., Sampayo, M. 1987. El fuego bacteriano. *Erwinia amylovora*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 72 pp.ISBN: 84-7479-650-4.

Madsen, H.L y Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in food Science and Tecnology*; 6:271-277, pp. 16.

Mancebo, F., Mora, G.A., Castro, V.H., Salazar, R. (2001). Biological activity of *Ruta clalepensis* (Rutaceae) and *Sechium pittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (*Lepidoptera pyralidae*) larvae. *Revisit of Tropical Biological*. 49:501-508.

Masuda, T., Inaba, Y. y Takeda, Y. (2001). Antioxidant mechanism of carnosic acid, structural identification of two oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(11):5560-5565.

Medina-Morales, M.A., Rojas-Molina, R., Rodríguez-Herrera, R., y Aguilar, C.N. (2012). *Manual de Métodos de Laboratorio del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. DIA-UAdeC. Vol 1. Saltillo, Coahuila, México.*

Mendelsohn, R., Balick, M.J. (1995) The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany* 49(2):223-228.

Méndez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F.D., Aguilar-Gonzales, C.N. (2011). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. Elsevier, *Industrial Crops and products*. INCRO-5786; pag. 6.

Mendoza, Z.C. (1996). *Enfermedades fungosas en hortalizas*. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México, 82 pp.

Montesinos, E., López, M.M. 2000. Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*): 37-40. In: *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Sociedad Española de Fitopatología. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-916-8.

Montoya Oliver, J.M (1995). *El Eucalipto*. No. 1. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España. Pag. 125.

Mori A., Nishino C., Enoki N., Tawata S.(1987) Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against **Proteus vulgaris** and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*,26:2231-2234.

Mosch, J., Klingauf, F., (1989). Estudios *In-vitro* de la eficacia de los Extractos de Plantas contra el Patogeno causante de la Quemazon, *Erwinia amylovora* (Burrill). Winslow y col., *Narichtenblatt des Deutschen Pflanzens Chutzdienstes*. 41(8-9): 121-123.

Mosch, J., Klingauf, F., Zeller, C. (1990). Efecto de Extractos Vegetales contra el Fuego Bacteriano (*Erwinia amylovora*). Acta Horticulturae. 273:355-361.

Mosch, J., y Zeller, C. (1989). El Control del Fuego Bacteriano (*Erwinia amylovora*), con Extractos de Plantas Seleccionados. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. 41(8-9):149-151.

Norma Oficial Mexicana NOM-139-SCFI-2012. Información comercial, Etiquetado de Extracto Natural de vainilla (vainilla spp.) Derivados y sustitutos. México, 2012.

Obledo, E.N., Hernández-Rosales, A.S., Lopez-Orue, M.L. (2004). Extractos Vegetales, una opción contra la Sigatoka Negra. XVI Reunión Internacional. ACORBAT. Oaxaca, México. 184 p.

Okamura, N., Fugimoto, Y., Kuwabara, S., y Yagi, A. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. Journal of Chromatography. A.679:381-386.

Padilla-Zita, G., Reséndiz-Espadas, M., Vazquez-Martinez, A. (2007). Manual Didáctico de Bacteriología y Virología. Universidad Nacional Autónoma de México. pág. 111.

Paulin, J.P. (2000). *Erwinia amylovora*, General Characteristics: 87-115. In: Vanneste, J.L. (ed.). Fire Blight. The Disease and its Causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI. Publishing, Wallingford. UK. ISBN: 0-85199-294-3.

Pitman, N., Jorgensen, P. (2002). Estimating the size of the world's threatened flora. Science 298 (55-95):989 pp.

Polanco, D. (2004). validacion del Potencial Antifungico de Extractos de Plantas sobre *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal de la Sigatoka Negra, en el Cultivo del Banano. M. Sc. Ciencias Biológicas, Biblioteca "Rafael Parra Cortez" Universidad del Tolima. Ibagué Colombia. 138 pp.

Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldenty K.M. (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* 90: 494-507.

Rajalakshmi, D., y Narasimhan, S. (1996). Food antioxidants, sources and methods of evaluation. In: *Food Antioxidants-Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Marcel Dekker. New York. pp. 65-158.

Ramírez González, Sandra., López Báez, Orlando., Guzmán Hernández, Tomás., Munguía Ulloa, Sayra., Espinosa Zaragoza, Saúl. (2011). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et ál.* **Tecnología en Marcha**, Vol. 24, N.º 2, Abril-Junio 2011, P. 3-17

Raymundo, A.K., Ries, S.M. (1980 a). Motility of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 70:1062-1065.

Raymundo, A.K., Ries, S.M. (1980 b). Chemotaxis of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 70:1066-1069.

Robert, S. Pappas (2000). The esencial oil of *Eucalyptus camadulensis dehn*. From south florida: A High Cryptone low cineole *Eucaliptus*. *J. Essent.oil. Res.*, 12:383-384.

Rodríguez, C.A., Lagunes, A. (1992). Plantas con propiedades Insecticidas. *Agroproductividad* 1. pp 17-25.

Rosen, H.R. 1935. The mode of penetration of pear and apple blossoms by the fire-blight pathogen. *Science*, 81: 26.

Rostagno, M., Palma, M. & Barroso, C. 2003. "Ultrasound-assisted extraction of soyisoflavones". *Journal of Chromatography A*. 1012: 119-128.

Ruiz, B.E., Velázquez, C., Garibay, E.A., García, Z., Plascencia, J.M., Cortez, R.M.O., Hernández, M.J., Robles, Z.R.E. (2009). Antibacterial and Antifungal Activities of Some Mexican Medicinal Plants. *J. Med. Food*. 12:1998-1402.

- Sandoval, Ch. G.** (1982). La Damiana (*Turnera diffusa willd*), una revisión bibliográfica y experiencias en su aprovechamiento e inducción al cultivo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México, p. 205.
- Schroth, M.N.,** Moller, W.J., Thomson, S.V., Hildebrand, D.D. 1974. Epidemiology and control of fire blight. *Annual review of Phytopathology*, 12: 389-412.
- Seemüller, E.A.,** Beer, S.V. (1976). Absence of cell wall polysaccharide degradation by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 66:433-436.
- SEMARNAP.** (1996). Programa forestal y de suelos 1995-2000. México D.F. p: 21-39.
- Shah, A.H.,** Qureshi, S., Ageel, A.M. (1988). Toxicity studies in mice of ethanol extract of *Forniculum vulgare* fruit and *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry* 27:650-651.
- Springob, K.,** Lukacin, R., Erwein, C., Groning, I., Matern, U. (2000). Specificities of Functionally expressed chalcone and acrid one synthases from *Ruta graveolens*. *European Journal of Biochemistry*. 267:6552-6559.
- Srivastava, S.D.,** Srivastava, S.K., Halve, K. (1998). New coumarins and lemonoids of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia*. 69;80-81.
- Tanaka, Y.T,** y Andomuro., S. (1993). Agroactive compound of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:57-87.
- Ulubelen, A.,** Teren, B. (1988). Alkabinos and coumarins from roots of *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*. 27:650-651.
- Vaga, G.E.** (1976). Plantas aromáticas y medicinales en la cocina. No.71/67. Editorial de Vecchi, S.A. Barcelona, España. Pág. 65-66.
- Van Der Zwet T.,** Keil H.L. 1979. Fire Blight: A bacterial disease of rosaceous plants. *United States Department of Agriculture Handbook (U.S.D.A.)*, 510. Washington DC, 200 pp.

Van Der Zwet, T., Beer, S.V. 1995. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A practical guide to integrated disease management. *United States Department of Agriculture (U.S.D.A.). Agriculture Information Bulletin*, 631, 83 pp.

Vinatoru, M. 2001. "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs". *Ultrasonics Sonochemistry*. N.º 8: 303-313.

Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C. Jr., Rogers, L.A., Smith, G.H. 1920. The families and genera of the bacteria; *Erwineae*. *Journal of Bacteriology*, 5: 191-229.

Zaccheo, A. (1990). El Crecimiento de *Erwinia amylovora* en los Extractos de las Rosaceas susceptibles. *Acta Horticulturae*. 273:339-341.

Zheng, W., y Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(11):5165-5170.

ANEXOS

Cuadro 1. Análisis de varianza realizado a los datos procedentes del efecto del extracto de eucalipto contra *E. amylovora*

Fuente	GL	SC Sec.	CM	F	P
Modelo	2	5410.5210	2705.2605	20.36	0.021
Error	6	797.256123	132.87602		
Total	8	6207.77712			

Cuadro 2. Análisis de varianza realizado a los datos procedentes del efecto del extracto de mejorana contra *E. amylovora*

Fuente	GL	SC Sec.	CM	F	P
Modelo	2	38.35609	19.178048	0.76	0.5080
Error	6	151.448238	25.241373		
Total	8	189.804335			

Cuadro 3. Análisis de varianza para concentración de 0% entre los inhibidores eucalipto y mejorana a las 0 hrs.

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.005163	0.05163	0.005163	1.36	0.309
Error	4	0.015215	0.015215	0.003804		
Total	5	0.020378				

Cuadro 4. Análisis de varianza para concentración de 0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 12 hrs.

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.076840	0.076840	0.076840	7.75	0.050
Error	4	0.039667	0.039667	0.009917		
Total	5	0.116507				

Cuadro 5. Análisis de varianza para concentración de 0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 24 hrs.

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.093251	0.093251	0.093251	20.88	0.010
Error	4	0.017867	0.017867	0.004467		
Total	5	0.111117				

Cuadro 6. Análisis de varianza para concentración de 0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 24 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.093251	0.093251	0.093251	20.88	0.010
Error	4	0.017867	0.017867	0.004467		
Total	5	0.111117				

Cuadro 7. Análisis de varianza para concentración de 0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 48 hrs.

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.05587	0.05587	0.05587	5.25	0.084
Error	4	0.04260	0.04260	0.01065		
Total	5	0.09848				

Cuadro 8. Análisis de varianza para concentración de 0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 72 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.074371	0.074371	0.074371	18.48	0.013
Error	4	0.016101	0.016101	0.004025		
Total	5	0.090471				

Cuadro 9. Análisis de varianza para concentración de 0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 96 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.7329	0.7329	0.7329	1.83	0.247
Error	4	1.6006	1.6006	0.4002		
Total	5	2.3335				

Cuadro 10. Análisis de varianza para concentración de 0.25% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 0 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.005460	0.005460	0.005460	5.35	0.082
Error	4	0.004081	0.004081	0.001020		
Total	5	0.009541				

Cuadro 11. Análisis de varianza para concentración de 0.25% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 12 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.12615	0.12615	0.12615	16.77	0.015
Error	4	0.03009	0.03009	0.00752		
Total	5	0.15624				

Cuadro 12. Análisis de varianza para concentración de 0.25% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 24 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.22118	0.22118	0.22118	304.87	0.000
Error	4	0.00290	0.00290	0.00073		
Total	5	0.22409				

Cuadro 13. Análisis de varianza para concentración de 0.25% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 48 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	2.3126	2.3126	2.3126	100.19	0.001
Error	4	0.0923	0.0923	0.0231		
Total	5	2.4049				

Cuadro 14. Análisis de varianza para concentración de 0.25% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 72 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.90249	0.90249	0.90249	235.25	0.000
Error	4	0.01535	0.01535	0.0384		
Total	5	0.91783				

Cuadro 15. Análisis de varianza para concentración de 0.25% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 96 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.47489	0.47489	0.47489	46.23	0.002
Error	4	0.04109	0.04109	0.01027		
Total	5	0.51598				

Cuadro 16. Análisis de varianza para concentración de 0.5% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 0 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.003901	0.003901	0.003901	3.75	0.125
Error	4	0.004157	0.004157	0.001039		
Total	5	0.008059				

Cuadro 17. Análisis de varianza para concentración de 0.5% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 12 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.75473	0.75473	0.75473	61.39	0.001
Error	4	0.04917	0.04917	0.01229		
Total	5	0.80391				

Cuadro 18. Análisis de varianza para concentración de 0.5% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 24 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.11207	0.11207	0.11207	1.89	0.241
Error	4	0.23694	0.23694	0.05924		
Total	5	0.34901				

Cuadro 19. Análisis de varianza para concentración de 0.5% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 48 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	3.6660	3.6660	3.6660	771.52	0.000
Error	4	0.0190	0.0190	0.0048		
Total	5	3.6850				

Cuadro 20. Análisis de varianza para concentración de 0.5% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 72 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.77472	0.77472	0.77472	8.61	0.043
Error	4	0.35977	0.35977	0.08994		
Total	5	1.13450				

Cuadro 21. Análisis de varianza para concentración de 0.5% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 96 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.27864	0.27864	0.27864	2.98	0.159
Error	4	0.37394	0.37394	0.9348		
Total	5	0.65258				

Cuadro 22. Análisis de varianza para concentración de 1.0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 0 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.025091	0.025091	0.025091	154.72	0.000
Error	4	0.000649	0.000649	0.000162		
Total	5	0.025739				

Cuadro 23. Análisis de varianza para concentración de 1.0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 12 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.80667	0.80667	0,80667	88.06	0.001
Error	4	0.03664	0.03664	0.00916		
Total	5	0.84331				

Cuadro 24. Análisis de varianza para concentración de 1.0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 24 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.014504	0.014504	0.014504	5.53	0.078
Error	4	0.010493	0.010493	0.002623		
Total	5	0.024997				

Cuadro 25. Análisis de varianza para concentración de 1.0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 48 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	3.3990	3.3990	3.3990	760.98	0.000
Error	4	0.0179	0.0179	0.0045		
Total	5	3.4169				

Cuadro 26. Análisis de varianza para concentración de 1.0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 72 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.55998	0.55998	0.55998	13.95	0.020
Error	4	0.16059	0.16059	0.04015		
Total	5	0.72057				

Cuadro 27. Análisis de varianza para concentración de 1.0% en lo inhibidores eucalipto y mejorana a las 96 hrs

Fuente	GL	SC Sec.	SC. Ajust.	CM	F	P
Inhibidor	1	0.03635	0.03635	0.03635	1.66	0.268
Error	4	0.08778	0.08778	0.02194		
Total	5	0.12413				