



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Instituto de Ciencias
Centro de Agroecología

Maestría en Manejo Sostenible de Agroecosistemas

GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE MATERIALES IMPREGNADOS
CON ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE HONGOS
FITOPATOGENOS PRESENTES EN FRUTOS DE AGUACATE HASS (*Persea
americana* cv. Hass)

TESIS

Para obtener el grado de
Maestro en Manejo Sostenible de Agroecosistemas

Presenta

COYOTL PEREZ WENDY ABRIL

Director de la Tesis

DR. NEMESIO VILLA RUANO

Co-Director de la Tesis

DR. OMAR ROMERO ARENAS

Puebla, Puebla, Junio 2022



BUAP

La presente tesis, titulada: “GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE MATERIALES IMPREGNADOS CON ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS PRESENTES EN FRUTOS DE AGUACATE HASS (*Persea americana* cv. Hass)”, realizada por la alumna **IBT. Wendy Abril Coyotl Pérez**, bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


MAESTRA EN CIENCIAS EN
MANEJO SOSTENIBLE DE AGROECOSISTEMAS

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR: _____


Dr. Nemesio Villa Ruano

CO-DIRECTOR: _____


Dr. Omar Romero Arenas

ASESOR: _____


Dr. José Antonio Rivera Tapia

ASESOR EXTERNO: _____


Dr. Geolar Fetter

REVISOR EXTERNO: _____


Dra. Yesenia Pacheco Hernández

Puebla, Pue., Junio de 2022.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco el apoyo de mi director de tesis el Dr. Nemesio Villa Ruano. Por hacer que cada día reciba nuevos conocimientos y por darme la oportunidad de crecer académicamente.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Omar Romero Arenas, el Dr. José Antonio Rivera Tapia y el Dr. Geolar Fetter por darme la oportunidad de trabajar y por estar al pendiente del progreso de mi formación para culminar la maestría.

A la Dra Yesenia Pacheco Hernández por aceptar ser mi revisora de tesis de posgrado.

A CONACyT por la beca 1024387 que me otorgado para realizar sus estudios de maestría.

A la Dra Quetzali Nichte Morales Rabanales por ser mi mentora y compartir su conocimiento conmigo y brindar un apoyo incondicional.

A la Dra Elvia Becerra Martínez por el apoyo para participar en mi primer congreso en Resonancia Magnética Nuclear.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi mamá Guarina Pérez Sandoval y a mi papá José Alberto Coyotl Cielo por querer y buscar siempre lo mejor para mi familia. Por siempre estar presentes en cada paso de mi vida y brindar consejos para ser mejores personas. Siempre los tendré en mi corazón y dare todo de mi parte para no defraudarlos nunca.

A mis hermanos Leacy Melanie Coyotl Pérez y Jasubi Kevin Alberto Coyotl Pérez por brindar su apoyo incondicional y ánimos para seguir logrando mis metas. Quiero agradecerles también porque sé que siempre estarán conmigo.

A mi abuelita Rafaela Pérez Sandoval que desde el cielo nos protege y pide por toda la familia Pérez Sandoval. Agradezco a Dios haber tenido una abuelita que siempre cuidó de mí con esmero cuando mi mamá trabajaba.

A mi abuelito Enrique Pérez Soriano por siempre apoyar a la familia y brindar consejos para ser personas que no olvidan sus raíces. Porque cada día que pasa disfruto más su compañía y sus chistes que me distraen del trabajo.

A mis tíos Alejandra Pérez Sandoval y José Luis Díaz Talavera por brindar su apoyo incondicional en los momentos más difíciles para mi familia. También por el respaldo que siempre nos dan y que también quieren lo mejor para mis hermanos y yo.

A mis primos Christopher Alan Díaz Pérez y Luis Alain Díaz Pérez por siempre regalar una sonrisa cuando se necesita y su apoyo. Por estar en cada etapa de mi vida y contar con ellos para lo que sea.

A la familia Pérez Benítez por brindar su apoyo para ingresar al posgrado.
A todas estas personas les dedico este trabajo con mucho amor porque sé que siempre estarán conmigo.

RESUMEN

El fruto de aguacate representa un ingreso económico muy importante a nivel local, nacional e internacional. México es el principal país exportador de este fruto a nivel mundial. Sin embargo, las enfermedades por hongos representan un problema económico ya que se han registrado pérdidas de hasta un 60% en la producción. En este trabajo se identificaron tres hongos filamentosos por secuenciación de ADN que fungen como fitopatógenos de frutos de aguacate Hass recolectados en Yaonahuác, Puebla, México. Los hongos identificados fueron *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* y *Clonostachys rosea*. Por otro lado, se extrajeron, caracterizaron y evaluaron los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Cinamomum verum*, *Litsea glaucescens*, *Pelargonium graveolens*, *Barkleyanthus salicifolius*, *Ageratina rivalis* y *Eupatorium petiolare* frente a estos microorganismos. Se obtuvo una MIC de 2.993 ± 0.061 mg/mL de aceite esencial de canela frente a *F. verticillioides* y 2.137 ± 0.042 mg/mL de aceite esencial de tomillo frente a *F. solani*. En el caso de *C. rosea*, su MIC fue de 4.274 ± 0.1 mg/mL y 2.993 ± 0.061 mg/mL de aceite de tomillo y canela respectivamente. De acuerdo con los resultados arrojados por la técnica de microdilución en caldo, se procedió a elaborar los materiales impregnados con aceite de canela y tomillo. Se elaboraron dos tipos de arcillas: una catiónica, la halloysita y otra aniónica, la hidrotalcita ambas impregnadas con aceite esencial de canela. Las muestras fueron caracterizadas por difracción de rayos X, análisis térmicos y evaluadas contra *C. rosea*. Se observó que la hidrotalcita CANF1 tuvo una MIC de 3.33 mg/mL y la hidrotalcita CANF2 una MIC de 1.66 mg/mL. También se elaboraron, caracterizaron (FT-IR, SEM, grosor, opacidad y transmitancia) y evaluaron películas de quitosano con aceite esencial de canela y tomillo. Se demostró que la película con aceite esencial ofrece una mayor protección con 1.3% de aceite esencial en frutos de aguacate infectado durante 21 días. Esto se corroboró con la medición de la firmeza del fruto y los análisis bromatológicos incluyendo la determinación de ácidos grasos específicos en los días 0, 7, 15 y 21.

Palabras clave: Aguacate, actividad antifúngica, materiales híbridos.

ABSTRACT

The avocado fruit is a relevant economic income at the local, national and international levels. Mexico is the main exporter of this fruit worldwide, however, fungal diseases represent an economic problem since production losses may be around 60%. In this work, three filamentous fungi with phytopathogenic activity were isolated from Hass avocado fruits collected in Yaonahuác, Puebla, Mexico and identified by DNA sequencing. These fungi were *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* and *Clonostachys rosea*. On the other hand, the essential oils of *Thymus vulgaris*, *Cinamomum verum*, *Litsea glaucescens*, *Pelargonium graveolens*, *Barkleyanthus salicifolius*, *Ageratina rivalis* and *Eupatorium petiolare* were extracted, characterized and evaluated against these microorganisms. The MIC values for cinnamon essential oil against *F. verticillioides* oil was 2.993 ± 0.061 mg/mL whereas that of thyme essential oil against *F. solani* was 2.137 ± 0.042 mg/mL. For *C. rosea*, the MIC of thyme and cinnamon essential oils were 4.274 ± 0.1 mg/mL and 2.993 ± 0.061 mg/mL, respectively. According to the results obtained by the broth microdilution method, new materials impregnated with cinnamon and thyme oil were elaborated. Two types of clay were made: one cationic, halloysite, and another anionic, hydrotalcite, both impregnated with cinnamon essential oil. The samples were characterized by X-ray diffraction, thermal analysis and evaluated against *C. rosea*. The hydrotalcite CANF1 exerted a MIC of 3.33 mg/mL whereas the hydrotalcite CANF2 produced a MIC of 1.66 mg/mL. Chitosan films with the essential oils of cinnamon and thyme were also manufactured, characterized (FT-IR, SEM, thickness, opacity and transmittance) and evaluated. The films containing 1.3 % w/v essential oil showed greater protection in infected avocado fruit for 21 days. This effect was endorsed by measuring fruit firmness, which is related to bromatological content and specific fatty acids accumulated on days 0, 7, 15, and 21.

Keywords: Avocado, antifungal activity, hybrid materials.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Aguacate	3
2.1.1 Generalidades del aguacate.....	3
2.1.2 Taxonomía.....	3
2.1.3 Características botánicas.....	3
2.1.4 Ciclo biológico del aguacate.....	4
2.1.5 Contenido nutricional.....	5
2.2 Importancia.....	7
2.3 Producción de aguacate Hass.....	7
2.3.1 Producción de aguacate en México.....	9
2.3.2 Producción estatal.....	11
2.4 Enfermedades por hongos fitopatógenos del aguacate.....	13
2.4.1 Antracnosis.....	14
2.4.2 Roña.....	15
2.4.3 Mancha angular o mancha negra del fruto.....	15
2.4.4 Pudrición chocolate.....	16
2.4.5 Pudrición del fruto.....	16
2.4.6 Marchitez.....	17
2.5 Aceites esenciales.....	18
2.5.1 <i>Thymus vulgaris</i> L.....	19
2.5.2 <i>Cinnamomum verum</i>	20
2.5.3 <i>Barkleyanthus salicifolius</i> (Kunth) H. Rob. & Brettell.....	21
2.5.4 <i>Litsea glaucescens</i> Kunth.....	22
2.5.5 <i>Ageratina rivalis</i> (Greenm) King & Rob.....	23
2.5.6 <i>Pelargonium graveolens</i> L´. Hér. ex Airton.....	25
2.5.7 <i>Eupatorium petiolare</i> Moc. ex DC.....	26
2.6 Quitosano.....	27
2.7 Arcillas.....	28
2.7.1 Halloysitas.....	28
2.7.2 Hidrotalcitas.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	30

4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos particulares.....	31
5. HIPÓTESIS.....	32
6. MÉTODOS.....	33
6.1 Sitio de estudio.....	33
6.2. Recuperación y aislamiento de hongos de frutos de aguacate.....	33
6.2.1 Recolección de aguacates.....	33
6.2.2 Cámara húmeda.....	34
6.2.3 Aislamiento y purificación de hongos en medio de cultivo.....	34
6.2.4 Pruebas de Koch.....	34
6.3 Pruebas de identificación físicas.....	35
6.3.1 Técnica de microcultivo.....	35
6.3.2 MEB.	36
6.4 Pruebas de identificación molecular.....	36
6.4.1 Análisis filogenético.....	36
6.5 Preparación de materiales.....	37
6.5.1 Extracción de aceites esenciales.....	37
6.5.1.1 Caracterización química.....	37
6.5.1.2 Obtención de rendimientos.....	38
6.5.2 Arcillas.....	38
6.5.2.1 Caracterización por difracción de rayos X (XRD).....	39
6.5.2.2 Análisis termogravimétrico (TGA/DSC).....	39
6.6 Evaluación de materiales <i>in vitro</i>	39
6.6.1 Técnica de microdilución en caldo.....	39
6.6.2 Evaluación de hidrotalcitas en lentes de contacto suaves.....	40
6.6.3 Elaboración de biopelículas.....	40
6.6.2.1 Caracterización por FT-IR y SEM de las películas.....	41
6.6.2.2 Evaluación de Grosor.....	41
6.6.2.3 Opacidad.....	41
6.7 Evaluación de materiales <i>in vivo</i>	41
6.7.1 Evaluación de la biopelícula en aguacates sanos.....	41
6.7.2 Evaluación <i>in situ</i> de las películas.....	42

6.7.2 Evaluación de la firmeza.....	42
Análisis estadístico.....	42
6.8 Análisis bromatológico.....	42
6.9 Determinación de ácidos grasos.....	42
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Recuperación y aislamiento de hongos de frutos de aguacate.....	43
7.2 Pruebas de patogenicidad.....	44
7.3 Pruebas de identificación físicas y moleculares.....	45
7.3.1 Análisis filogenético.....	58
7.4 Preparación de materiales.	66
7.4.1 Extracción de aceites esenciales.....	66
7.4.1.1 Caracterización química.....	67
7.4.1.2 Obtención de rendimientos.....	78
7.5 Evaluación de materiales <i>in vitro</i>	80
7.5.1 Técnica de microdilución en caldo.	80
7.5.2 Evaluación de las arcillas.....	86
7.5.2.1 Difracción de rayos X.....	89
7.5.2.2 TGA/DSC.....	91
7.5.3 Elaboración de biopelículas.....	93
7.5.3.1 Caracterización por FT-IR y SEM.....	95
7.5.3.2 Evaluación de transmitancia y opacidad.....	102
7.6. Evaluación de materiales <i>in vivo</i>	104
7.6.1 Evaluación de la biopelícula en aguacates sanos.....	104
7.7 Evaluación de la firmeza del fruto.....	118
7.8 Análisis bromatológico.....	122
7.9 Determinación de ácidos grasos.	132
8. CONCLUSIONES.....	141
9. LITERATURA CITADA.....	143
10. ANEXOS.....	155

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del fruto de aguacate. Fuente: Valero <i>et al.</i> , (2018) _____	6
Tabla 2. Producción de aguacate por estado en septiembre 2021. Fuente: SIAP (2021) _____	10
Tabla 3. Producción de aguacate (miles de toneladas) en el ciclo 2017-2018. Fuente: SIAP _____	11
Tabla 4. Producción de aguacate (toneladas) en el ciclo 2019-2020. Fuente: SIAP _____	12
Tabla 5. Características de morfología macroscópica. Fuente:Elaboración propia _____	35
Tabla 6. Características de morfología microscópica. Fuente:Elaboración propia _____	36
Tabla 7. Información de las secuencias que componen el árbol filogenético de <i>Fusarium verticillioides</i> . _____	60
Tabla 8. Información de las secuencias que componen el árbol filogenético de <i>Fusarium solani</i> _____	62
Tabla 9. Información de las secuencias que componen el árbol filogenético de <i>Clonostachys rosea</i> (W6). _____	65
Tabla 10. Composición química del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. _____	68
Tabla 11. Composición química de <i>Cinnamomum verum</i> . _____	70
Tabla 12. Composición química de <i>Pelargonium graveolens</i> _____	71
Tabla 13. Composición química de <i>Litsea glaucescens</i> . _____	73
Tabla 14. Composición química de <i>Ageratina rivalis</i> (hoja). _____	75
Tabla 15. Composición química de <i>Eupatorium petiolare</i> (flor). _____	76
Tabla 16. Composición química de <i>Barkleyanthus salicifolius</i> . _____	78
Tabla 17. Porcentaje del rendimiento de cada aceite esencial. _____	79
Tabla 18. Concentraciones de las soluciones stock _____	80
Tabla 19. Concentración de la solución stock en 300 μ L _____	81
Tabla 20. Concentraciones de aceite esencial con el porcentaje de inhibición del 100%. _____	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico del aguacate. Fuente: Elaboración propia.	4
Figura 2. Principales países importadores y exportadores de aguacate. Fuente: Elaboración propia.	8
Figura 3. Producción de aguacate en Teziutlán, Puebla. Fuente: SIAP, (2021).	13
Figura 4. Enfermedades en frutos de aguacate por hongos fitopatógenos. Fuente: Elaboración propia.	17
Figura 5. Planta de <i>Thymus vulgaris</i> L. herborizada. Fuente: Elaboración propia	19
Figura 6. Trozos de <i>Cinnamomum verum</i> . Fuente: Elaboración propia.	20
Figura 7. Planta herborizada de <i>Barkleyanthus salicifolius</i> (Kunth) H. Rob. & Brettell. Fuente: Elaboración propia.	21
Figura 8. Planta de <i>Litsea glaucescens</i> Kunth . Fuente: Elaboración propia.	22
Figura 9. Planta de <i>Ageratina rivalis</i> (Greenm) King & Rob. Fuente: Elaboración propia.	23
Figura 10. Planta herborizada de <i>Pelargonium graveolens</i> L´. Hér. ex Airton. Fuente: Elaboración propia.	25
Figura 11. Planta de <i>Eupatorium petiolare</i> Moc. ex DC. Fuente: Elaboración propia.	26
Figura 12. Localización del sitio de estudio. Fuente: Elaboración propia	33
Figura 13. A, Frutos con daño en el epicarpio. B, Resultado de cámara húmeda.	43
Figura 14. Morfología de cepas de hongos recuperados de aguacates enfermos.	43
Figura 15. Pruebas de patogenicidad de siete cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de aguacate Hass.	44
Figura 16. Cepas de hongos catalogadas como fitopatógenas.	45
Figura 17. Segundas pruebas de patogenicidad con cinco cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de aguacate Hass.	46
Figura 18. Gel de los resultados de PCR para cepas W2, W3, W6 y W7.	47
Figura 19. Alineamientos de <i>Fusarium verticillioides</i> . A, Resultados de alineamiento con IF-1H, B, Resultados de alineamiento ITS4 (NCBI).	48
Figura 20. <i>Fusarium verticillioides</i> . A, Anverso. B, Reverso. C, Macroconidios (50X). D, Microconidios (100X).	49
Figura 21. <i>Fusarium solani</i> . A, Resultados de alineamiento con IF-1H. B, Resultados de alineamiento ITS4 (NCBI).	50
Figura 22. <i>Fusarium solani</i> . A, Anverso. B, Reverso. C, Monofialides (50X). D, Microconidios (50X).	51

Figura 23. <i>Clonostachys rosea</i> (W3). A, Resultados de alineamiento con ITS4 B, Resultados de alineamiento IF-1H (NCBI). _____	52
Figura 24. <i>Clonostachys rosea</i> (W6). A, Resultados de alineamiento con ITS4. B, Resultados de alineamiento IF-1H (NCBI). _____	53
Figura 25. <i>Clonostachys rosea</i> (W7). A, Resultados de alineamiento con ITS4. B, Resultados de alineamiento IF-1H (NCBI). _____	54
Figura 26. <i>Clonostachys rosea</i> (W3), A. Anverso, B.Reverso, C. Conidióforo penicilado (50X), D. Conidióforo verticilado, E. Clamidosporas, F. Conidios (50X). _____	55
Figura 27. <i>Clonostachys rosea</i> (W6). A, Anverso. B, Reverso. C, Conidióforo penicilado (50X), D. Conidióforo verticilado, E. Clamidosporas, F. Conidios (100X). _____	56
Figura 28. <i>Clonostachys rosea</i> (W7). A, Anverso. B, Reverso. C, Conidióforo verticilado (50X). D, Conidióforo penicilado (50X). E, Clamidosporas. F, Conidios (50X)._____	56
Figura 29. Árbol filogenético de <i>F. verticillioides</i> generado por secuencias concatenadas de ITS y EF-1 α . _____	58
Figura 30. Árbol filogenético de <i>F. solani</i> generado por secuencias concatenadas de ITS y EF-1 α . _____	61
Figura 31. Árbol filogenético de <i>Clonostachys rosea</i> (W6) generado por secuencias concatenadas de ITS y EF-1 α . _____	63
Figura 32. Coloración de cada aceite esencial extraído. _____	66
Figura 33. Cromatograma de la composición química de <i>Thymus vulgaris</i> L _____	67
Figura 34. Cromatograma de la composición química de <i>Cinnamomum verum</i> . _____	69
Figura 35. Cromatograma de la composición química de <i>Pelargonium graveolens</i> . _____	71
Figura 36. Cromatograma de la composición química de <i>Litsea glaucescens</i> ._____	72
Figura 37. Cromatograma de la composición química de <i>Ageratina rivalis</i> (hoja). _____	75
Figura 38. Cromatograma de la composición química de <i>Eupatorium petiolare</i> (flor). _____	76
Figura 39. Cromatograma de la composición química de <i>Barkleyanthus salicifolius</i> . _____	77
Figura 40. Comparación de los porcentajes de rendimiento de las especies vegetales. _____	79
Figura 41. Resultados de las pruebas preliminares de las cinco cepas seleccionadas. _____	82
Figura 42. Resultados de las microdiluciones de hidrotalcitas con aceite esencial de canela vs <i>C. rosea</i> . _____	86
Figura 43. Evaluación de arcillas en lentes de contacto suaves contra <i>C. rosea</i> A. Halloysita Can-F1, B. Hidrotalcita Can-F2. _____	87
Figura 44. Resultados Can-F1; A. Control positivo, B. 0.2 mg, C. 0.4 mg, D.0.6 mg. _____	88

Figura 45. Resultados Can-F2; A. Control positivo, B. 0.2 mg, C. 0.4 mg, D.0.6 mg. _____	88
Figura 46. Difractograma de la halloysita y de la halloysita impregnada con aceite de canela Can-F1 _____	90
Figura 47. Difractograma de la hidrotalcita Can-F2. _____	91
Figura 48. Curvas TGA/DSC de Can-F1 _____	92
Figura 49. Curvas TGA/DSC de Can-F2 _____	93
Figura 50. Películas de quitosano y aceite esencial de tomillo. _____	94
Figura 51. Películas de quitosano y aceite esencial de canela. _____	94
Figura 52. A. FT-IR del aceite esencial de canela, B. FT-IR de las películas de quitosano y aceite esencial. _____	96
Figura 54. Micrografías de A) superficie y B) vista transversal de las películas de quitosano y aceite esencial de canela. _____	99
Figura 55. Micrografías de A) superficie y B) vista transversal de las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo. _____	101
Figura 56. A) Transmitancia y B) opacidad de las películas de quitosano y aceite esencial de canela _____	102
Figura 57. A) Transmitancia y B) opacidad de las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo. _____	103
Figura 58. Cinética de crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> en aguacates tratados. _	104
Figura 60. Evaluación in situ de películas de quitosano y aceite esencial (<i>Cinnamomum verum</i>) vs <i>F. verticillioides</i> . _____	107
Figura 61. Cinética de crecimiento de <i>Fusarium solani</i> en aguacates tratados. _____	108
Figura 62. Evaluación de películas de quitosano y aceite esencial (<i>Thymus vulgaris</i>) vs <i>F. solani</i> . _____	109
Figura 63. Evaluación in situ de películas de quitosano y aceite esencial (<i>Thymus vulgaris</i>) vs <i>F. solani</i> _____	110
Figura 64. Cinética de crecimiento de <i>C. rosea</i> en aguacates tratados. _____	111
Figura 66. Evaluación in situ de películas de quitosano y aceite esencial (<i>Cinnamomum verum</i>) vs <i>C. rosea</i> . _____	113
Figura 67. Cinética de crecimiento de <i>C. rosea</i> en aguacates tratados. _____	114
Figura 68. Evaluación de películas de quitosano y aceite esencial (<i>Thymus vulgaris</i>) vs <i>C. rosea</i> _____	115

Figura 69. Evaluación <i>in situ</i> de películas de quitosano y aceite esencial (<i>Thymus vulgaris</i>) vs <i>C. rosea</i> .	116
Figura 70. Evaluación de firmeza en aguacates infectados con <i>F. verticillioides</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de canela (<i>Cinnamomum verum</i>).	119
Figura 72. Evaluación de firmeza en aguacates infectados con <i>C. rosea</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de canela (<i>Cinnamomum verum</i>).	121
Figura 73. Evaluación de firmeza en aguacates infectados con <i>C. rosea</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).	122
Figura 74. Cantidad de A. grasas. B, proteína. C, azúcares reductores. D, fibra en aguacates infectados con <i>F. verticillioides</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de canela	126
Figura 75. Cantidad de A. grasas. B, proteína. C, azúcares reductores. D, fibra en aguacates infectados con <i>F. solani</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.	128
Figura 76. Cantidad de A. grasas. B, proteína. C, azúcares reductores. D, fibra en aguacates infectados con <i>C. rosea</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.	131
Figura 77. Contenido de A, ácido linoléico. B, oléico. C, palmítico. D, palmitoléico en aguacates infectados con <i>F. verticillioides</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de canela.	134
Figura 78. Contenido de A, ácido linoléico. B, oléico. C, palmítico. D, palmitoléico en aguacates infectados con <i>F. solani</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.	137
Figura 79. Contenido de A, ácido linoléico. B, oléico. C, palmítico. D, palmitoléico en aguacates infectados con <i>C. rosea</i> vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.	140

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate (*Persea americana Mill*) pertenece a la familia *Lauraceae* y es originario principalmente de Guatemala y México. Rodríguez & Sánchez, (2005) reportaron indicios de consumo de aguacate en Coxcatlán ubicado en Tehuacán, Puebla-México. Esta es la evidencia más antigua que datada entre los años 8,000-7,000 A.C. Sin embargo, existen cultivares dentro de los cuales destacan Hass, Fuerte y Criollo. Este fruto representa un ingreso económico importante para el mercado local, nacional e internacional de cualquier país (Xoca *et al.*, 2018).

El aguacate se cultiva en más de 60 países de los que destacan México, Chile, República Dominicana, Indonesia, Perú y Colombia. El principal país proveedor internacional de este fruto es México con una aportación de 45.95% del valor de las exportaciones mundiales. Chávez *et al.*, (2019) mencionan que este fruto es el más exitoso en la exportación agroalimentaria a nivel nacional. A nivel nacional, México tiene una producción anual de alrededor de 2,257,291.38 toneladas. Esta producción se obtiene de una superficie de cosecha de 209,480.63ha, obteniendo un rendimiento de alrededor de 10.78 t/ha (SIAP, 2020).

Por otra parte, el aguacate es una fuente importante de nutrientes dentro de los cuales destacan el aporte de vitaminas A, B y C (Bhuyan *et al.*, 2019). Además de ello, este fruto aporta algunos minerales como K, P, Mg y Fe (Pedreschi *et al.*, 2019). Impide la aceleración del envejecimiento y beneficia al sistema digestivo por la presencia de antioxidantes y fibra dentro de su composición nutrimental (Rosero *et al.*, 2019). Dentro de su aporte lipídico se encuentra alto contenido de ácido linoléico, ácido oléico, ácido palmitoléico y ácido palmítico, así como bajo contenido de ácido esteárico (Bill *et al.*, 2014).

No obstante, mientras este fruto representa una fuente de oportunidad para muchas personas, se ha observado que algunos cultivos forman parte de las estadísticas de “alimentos perdidos o desperdiciados” por factores que no solo competen al ser humano como actor intelectual. La producción de aguacate no se descarta de la estadística antes mencionada ya que está sujeta a grandes pérdidas debido a la intervención de factores de origen biótico y abiótico presentes durante el ciclo

biológico del fruto y desde la cosecha hasta la comercialización del fruto (Trinidad-Ángel *et al.*, 2017; Arpaia *et al.*, 2018). Estas pérdidas se reflejan por diversas causas como la presencia de enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus haciendo al fruto más vulnerables al ataque por otros fitopatógenos. Si bien, la calidad de un fruto siempre influye para la exportación a nivel mundial ya que debe ser de la mas alta calidad (Chávez *et al.*, 2019).

Algunas de las enfermedades por las cuales se llegan a perder hasta 60% de la producción son la roña, marchitez, manchas y pudrición de fruto. Dentro de los microorganismo encargados de causar estas enfermedades, se encuentran hongos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Dothiorella sp*, *Phytophthora cinnamomi*, *Sphaceloma perseae*, *Fusarium sp*, entre otros.

Actualmente, la agricultura orgánica busca implementar alternativas que reduzcan el daño al medio ambiente, proteger la salud del productor y consumidor así como disminuir el uso de agroquímicos. Dentro de las alternativas se encuentra el uso de aceites esenciales ya que se ha demostrado que la mayoría de las especies aromáticas vegetales contienen volátiles con actividad defensiva. Además, se ha demostrado que estos metabolitos secundarios poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro y que en combinación con otros materiales potencializan el efecto fungicida.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aguacate

2.1.1 Generalidades del aguacate

Al rededor del mundo, existen 400 variedades de este fruto que presentan características diferentes con base en la forma, color y peso del fruto. Además, este fruto se clasifica en tres razas hortícolas mexicana, antillana y guatemalteca. También, existe otra clasificación tomando como referencia las clases en las que se encuentra el aguacate Hass, fuerte, criollo, bacón entre otros.

El nombre científico de este fruto es *Persea americana* y el nombre en náhuatl es Ahuacatl que significa “testículos del árbol”. Este fruto crece en árboles frondosos con flores que nacen todo el año. Por ello se considera que es un árbol perenne ya que el fruto se encuentra todo el año (SAGARPA, 2017).

2.1.2 Taxonomía

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lurales*

Familia: *Lauraceae*

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana Mill.* (Pérez *et al.*, 2015).

2.1.3 Características botánicas

La raíz del aguacate es pivotante y ramificada de las cuales las raicillas secundarias y terciarias se distribuyen en la superficie. El tallo es cilíndrico, leñoso, ramificado y erecto. Posee una corteza áspera y a veces surcada. Su copa tiene una estructura globosa y sus hojas jóvenes poseen un color verde rojizo y cuando maduran toman un color verde un tanto opaco. Estas hojas se encuentran en espiral y brotan como racimos. Además, tienen una longevidad que va de 10 a 12 meses.

En etapa de floración, las flores poseen un color verde claro que miden 10 mm de diámetro, tienen simetría radial, órganos sexuales masculinos conocidos como estambres (antera blanca y filamento verde) y órganos sexuales femeninos llamados pistilos (blancos). Aular & Casares, (2011) menciona que cuenta con dos grupos de nectarios por un lado están los estaminodios y por el otro se encuentran los verdaderos. Contiene un cáliz con tres sepalos y una corola con 12 estambres. Según la SAGARPA, (2017) menciona que cada árbol puede producir hasta un millón de flores y solo el 0.1% se transforma en fruto.

Por su parte, el fruto se caracteriza por ser una baya que proviene del gineceo unicarpelar y que cuando este madura la pulpa toma una consistencia como la de la mantequilla dura (SAGARPA, 2017). El pericarpio contiene tres capas, la primera es el exocarpio que corresponde a la cáscara del fruto. Enseguida está el mesocarpio que es la pulpa y finalmente se encuentra el endocarpio que es una delgada cubierta que protege la semilla (IPGRI, 1995). Esta semilla carece de endospermo en su madurez, es formada por dos cotiledones y una plúmula. Contiene hipocotíleo y radícula y está rodeado por dos cubiertas adheridas por el centro.

2.1.4 Ciclo biológico del aguacate.



Figura 1. Ciclo biológico del aguacate. Fuente: Elaboración propia.

El aguacate se caracteriza por ser un árbol perenne, es decir da frutos todo el año y su crecimiento es activo durante todo su ciclo biológico (Figura 1). Amortegui *et al.* (2001) menciona que este proceso se divide en cuatro fases. La fase vegetativa consta de yemas vegetativas que se transforman para generar crecimiento en las ramas del árbol y dura entre 8 y 10 meses con un reposo de 2 a 4 meses. En la fase de floración emergen dos tipos de yemas. Por un lado, la yema terminal o apical que se desarrolla vegetativamente y por otro se encuentran las yemas axilares que generan las inflorescencias.

La tercera fase se denomina fructificación donde inicia el procesos de multiplicación celular para formar un fruto. La duración de esta fase depende de los factores genéticos y ambientales donde se encuentra el cultivo. Además, tiene requerimientos muy específicos para desarrollarse. El agua es el principal recurso que una planta necesita para su desarrollo. Se ha observado que la ausencia de este recurso, el tamaño del fruto de aguacate se ve afectado. Dentro de los nutrientes que requiere se encuentra el N ya que influye en el proceso de cuajado, capacidad de permanencia y desarrollo del fruto en el árbol. El Zn, es un elemento que beneficia la formación de frutos y ramas. El tercer requerimiento es el ambiente en el que se desarrolla ya que el lugar debe ser libre de vientos calurosos y secos o heladas. Además, el cultivo debe estar en latitudes de entre 800 a 2500 m, en el suelo arcilloso o franco-arcilloso para un buen drenaje (SAGARPA, 2017).

El estado de madurez es la última fase y se divide en tres partes a lo largo del ciclo biológico. La primera es la madurez fisiológica y esta se caracteriza porque la semilla es visible para germinar. Luego se tiene la madurez comercial que es cuando el fruto cumple con el tamaño característico del cultivar (cosecha). Finalmente, la madurez en el consumo que es cuando el fruto tiene las mejores propiedades organolépticas.

2.1.5 Contenido nutricional.

Valero *et al.* (2018) menciona que el agua contenida en el aguacate es poca a la encontrada en otras frutas, el aporte lipídico es mayor, y este se ve reflejado en el

aporte calórico como lo muestra en la Tabla 1. El aguacate se caracteriza por tener un alto contenido de grasas. Dentro de las grasas se encuentran las insaturadas destacando de entre ellas el alto contenido de ácido oleico en g/100g. Así mismo, los frutos de aguacate contienen vitamina E como potente antioxidante, vitamina C y vitamina B6.

Tabla 1. Composición nutricional del fruto de aguacate. Fuente: Valero *et al.*, (2018)

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (200 g)
Energía (kcal)	141	200
Proteínas (g)	1.5	2.1
Lípidos totales(g)	12	17.0
AG saturados (g)	1.41	2.0
AG monoinsaturados (g)	9.01	12.79
AG poliinsaturados (g)	1.04	1.48
ω^{-3} (g)*	0.046	0.065
C18:2 Linoleico (ω^{-6}) (g)	0.986	1.400
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	0
Hidratos de carbono (g)	5.9	8.4
Fibra (g)	1.8	2.6
Agua (g)	78.8	11.2
Calcio (mg)	16	22.7
Hierro(mg)	0.7	1.0
Yodo	2	2.8
Magnesio (mg)	41	58.2
Zinc (mg)	0.3	0.4
Sodio (mg)	2	2.8
Potasio (mg)	400	568
Fósforo(mg)	28	39.8
Selenio (μ g)	Tr	Tr.
Tiamina (mg)	0.09	0.13
Riboflavina (mg)	0.12	0.17
Equivalentes niacina (mg)	1.5	2.1
Vitamina B ₆ (mg)	0.42	0.60
Fosfatos (μ g)	11	15.6
Vitamina B ₁₂ (μ g)	0	0
Vitamina C (mg)	17	24.1
Vitamina A: Eq. Retinol (μ g)	25	35.5
Vitamina D (μ g)	0	0
Vitamina E (mg)	3.2	4.5

2.2 Importancia

A nivel mundial, México es el principal país productor y exportador de aguacate. Gracias a la apertura de la frontera y el Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos, este se convirtió en el mayor importador de este fruto. Aunque Estados Unidos impuso regulaciones, la producción y comercialización de este fruto representa un fuente importante en términos de bienestar para las familias generando empleo y un impacto económico para el país.

El aguacate es considerado un cultivo que trae beneficios como la alta producción y demanda en el mundo. Por otro lado, contiene un alto contenido de energía, proteínas y minerales alojados en la pulpa del fruto (Pérez *et al.*, 2015). Además, poseen algunas propiedades medicinales anti-raquíticas, combaten la fiebre, los cólicos menstruales y la migraña. El aceite que se extrae en algunos casos se utiliza para aliviar el reumatismo (Santillán *et al.*, 2008).

Recientemente se ha comprobado que el aguacate es el vegetal que contiene más carnitina, un ácido aminado que interviene en el metabolismo del músculo cardíaco, por lo que se está usando en el tratamiento de cardiopatías y en la falta de apetito. Además, se utiliza como complemento de todo tipo de comidas debido a su contenido nutricional por lo que es una buena fuente de ingresos para los productores.

2.3 Producción de aguacate Hass

Según datos de la FAO, (2019) los principales países productores son México, Perú e Indonesia con un 68.3% de la producción total de aguacate aproximadamente de 2.8 millones de toneladas anuales de 4.1 millones de toneladas a nivel mundial.

Además, de estos países, Chile, República Dominicana y Colombia son productores importantes. Sin embargo, México sigue siendo el principal productor, consumidor y exportador con una tercera parte de la producción del mundo.

En la Figura 2, se muestra también a los principales países importadores de aguacate con los más alto volúmenes de aguacate.



Figura 2. Principales países importadores y exportadores de aguacate. Fuente: Elaboración propia.

2.3.1 Producción de aguacate en México

El aguacate mexicano mejor conocido como el “oro verde” se consume en 34 países lo cual impacta positivamente la economía de lo productor generando ingresos al país. México es el principal proveedor del mercado internacional con una exportación de 45.95% del valor de las exportaciones mundiales, es decir, tiene una aportación de 1,664,000 toneladas. Además, este fruto es el más exitoso de la exportación agroalimentaria a nivel nacional y muy importante en la dieta.

La SAGARPA, (2017) describe que las exportaciones mexicanas de aguacate en el 2016 representaron un porcentaje significativo de las importaciones de Guatemala (100%), Canadá (95.41%), Japón (97.72%), Estados Unidos (91.32%) y el Salvador (90.23%) de los cual México tuvo un ingreso económico que beneficio a los productores de todas partes del país.

A inicios de 2020, el área sembrada de aguacate fue de 241,140 ha, de las cuales se cosecharon 164,346 ha, es decir, se cosecharon 15,161 ha correspondiente al 10.2% más con respecto al 2019. La mayor parte de la producción obtenida de aguacate en México es de Michoacán con una aportación de 195,366 toneladas, es decir, el 94.6% del total de la producción nacional. Existen algunos estados que al paso de los años han incrementado su producción, como Jalisco (19.6%), Michoacán (0.2 %), Oaxaca (12.8%) y Guerrero (11.1%) (SADER, 2020).

En la Tabla 2 se muestra la producción de aguacate por estado, estos datos fueron extendidos por SIAP, (2021). Obteniendo una baja de 162,879.81 toneladas en la producción de este fruto y un rendimiento de 0.745 ton/ha. El comercio de aguacate y otros productos hortícolas por parte de México a otros países es gracias a que se cumplen con los requerimientos de sanidad e inocuidad impuestos por cada nación a la que se exporta. Actualmente, existe un estatus fitosanitario que brinda a los productores el beneficio de comercializar su producto a mercados nacionales e internacionales (SENASICA, 2017).

Tabla 2. Producción de aguacate por estado en septiembre 2021. Fuente: SIAP (2021)

	Entidad	Superficie (ha)			Producción Ton/ha	Rendimiento (udm/ha)
		Sembrada	Cosechada	Siniestrada		
1	Aguascalientes	55.85	0	0	0	0
2	Baja California	64.5	0	18	0	0
3	Baja California Sur	108	25	2	121.81	4.87
4	Campeche	88.5	74	0	759.9	10.27
5	Colima	750.5	719.5	0	4,855.54	6.75
6	Chiapas	3,373.81	1,739.31	0	8,241.01	4.74
7	Durango	1,095.73	1,053.94	0	3,424.50	3.25
8	Guanajuato	289.2	185.5	0	1,286.77	6.94
9	Guerrero	3,475.58	2,870.41	0	19,846.26	6.91
10	Hidalgo	894.7	436.7	0	3,087.58	7.07
11	Jalisco	27,777.42	21,413.56	0	137,835.70	6.44
12	México	11,362.16	7,709.49	0	88,591.20	11.49
13	Michoacán	174,992.35	166,918.20	0	1,369,155.64	8.2
14	Morelos	5,728.00	5,580.00	6	45,365.80	8.13
15	Nayarit	7,933.30	6,939.30	0	24,369.91	3.51
16	Nuevo León	699	699	0	1,347.15	1.93
17	Oaxaca	3,676.92	2,608.03	0	8,648.24	3.32
18	Puebla	3,283.78	2,388.45	0	18,024.23	7.55
19	Querétaro	178	117.5	0	163.32	1.39
20	San Luis Potosí	76.5	29.5	0	133.05	4.51
21	Sinaloa	149.35	13.5	0	131.93	9.77
22	Sonora	418.8	0	0	0	0
23	Tabasco	59	59	0	264.45	4.48
24	Tamaulipas	26	0	0	0	0
25	Tlaxcala	28	27	0	207.9	7.7
26	Veracruz	1,042.30	737	0	6,230.45	8.45
27	Yucatán	575.3	409.8	0	9,915.85	24.2
28	Zacatecas	45.5	0	0	0	0
Total		248,248.05	222,753.69	26	1,752,008.19	7.87

2.3.2 Producción estatal

De acuerdo con el Comité Nacional de Productores de Aguacate (Conapa), el estado de Puebla suma 3,178 hectáreas dedicadas a este fruto. En la entidad existen 42 municipios productores entre los que destacan Quimixtlán, Tochimilco, Atlixco, Tepexi de Rodríguez los cuales avanzan en el registro de zonas libres de barrenado que es uno de los requisitos de las autoridades sanitarias para más adelante poder exportar. La APEAM (Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México) indicó que hasta el momento no existe ningún impedimento para que el aguacate mexicano llegue a la mesa de los consumidores en Estados Unidos (López, 2019).

Por otro lado, a nivel nacional, Puebla dejó de estar dentro de los primeros 8 productores. En el ciclo 2017-2018 fue el último ciclo que Puebla estaba de los 8 primeros como se observa en las Tablas 3 y 4. Sin embargo, según los últimos datos brindados por SIAP en septiembre 2021, Puebla se encuentra en sexto lugar como productor de aguacate a pesar de que la producción a nivel nacional disminuyó.

Tabla 3. Producción de aguacate (miles de toneladas) en el ciclo 2017-2018. Fuente: SIAP

Entidad Federativa	Producción		Variación	Estructura
	2017	2018	% 18/17	% 2018
Nacional	1,762.1	1,959.9	11.2	100.0
Michoacán	1,368.5	1,497.2	9.4	76.4
Jalisco	136.2	173.3	27.2	8.8
México	93.0	95.1	2.3	4.9
Nayarit	40.2	49.2	22.6	2.5
Morelos	33.2	45.3	36.6	2.3
Guerrero	23.3	26.3	12.7	1.3
Puebla	13.5	14.6	6.1	0.7
Chiapas	9.2	14.0	51.5	0.7
Yucatán	10.1	9.2	-8.9	0.5
Oaxaca	8.3	8.0	-2.9	0.4
Resto	26.6	27.9	5.0	1.4

Tabla 4. Producción de aguacate (toneladas) en el ciclo 2019-2020. Fuente: SIAP

Entidad Federativa	Producción		Variación		Part. % 2020
	2019	2020	Absoluta	%	
Nacional	205,439	206,466	1,027	0.5	100.0
Michoacán	195,042	195,366	9.4	0.2	94.6
Jalisco	8,157	9,759	1,602	19.6	4.7
Oaxaca	752	848	96	12.8	0.4
Guerrero	378	420	42	11.1	0.2
Chiapas	0	57	57	NA	0.03
Guanajuato	100	16	-84	-84.0	0.01
Veracruz	305	0	-305	-100.0	0.0
Yucatán	706	0	-706	-100.0	0.0

En 2016 productores de la zona norte de Puebla, principalmente los municipios de Tetela, Zacatlán y Teziutlán quienes estaban más interesados en la tecnificación de sus cultivos, buscaron un convenio donde el gobierno del estado y el municipal aportarán 100 mil pesos cada parte en material vegetativo y plantas de aguacate para seguir con el cultivo de aguacate.

Para el 2017, la Sierra Norte y la Sierra Nororiental quisieron impulsar la producción de aguacate con el propósito de establecer 57,960 nuevas hectáreas de cultivo. Para ello la SAGARPA (Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) con apoyo del FIRA (Fondo de Garantía y Fomento para la Agricultura, Ganadería y Avicultura) se brindó apoyo con asistencia técnica integral a los productores que optaran por cultivar este fruto.

Según SIAP en 2019 la producción de aguacate en la zona de Teziutlán, Puebla fue de 3,917.59 toneladas, en 2020 fueron 3,813.52 toneladas y en 2021 fueron 4,176.1 toneladas. En la Figura 3, se observan los municipios productores de aguacate de la Sierra Norte de Puebla.

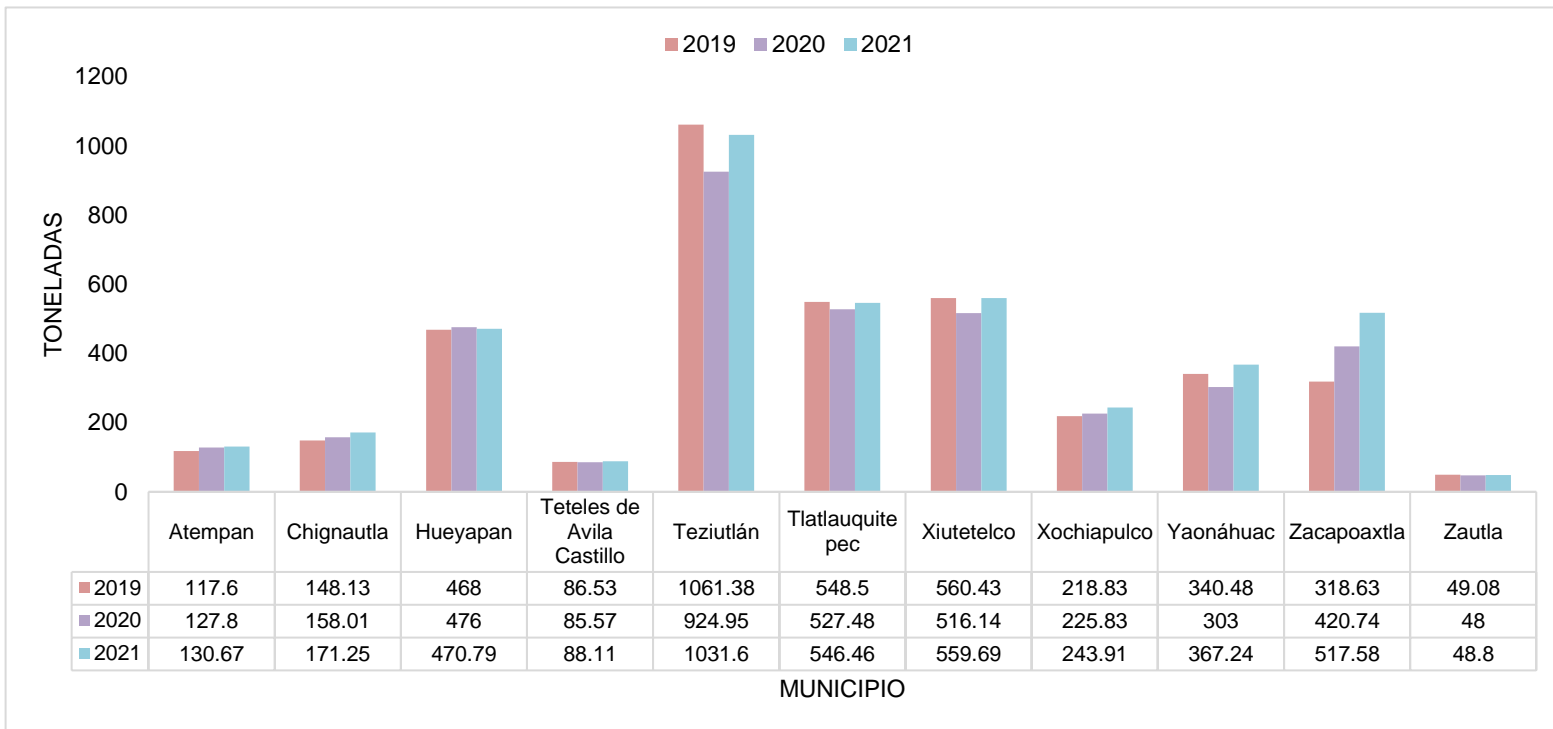


Figura 3. Producción de aguacate en Teziutlán, Puebla. Fuente: SIAP, (2021).

2.4 Enfermedades por hongos fitopatógenos del aguacate

Las enfermedades por hongos fitopatógenos tienen efectos sobre el desarrollo del rendimiento de cualquier (Li *et al.*, 2017). En los últimos años, las enfermedades por hongos en los cultivos han presentado resistencia debido al uso indiscriminado de agroquímicos. Gracias al uso de agroquímicos, muchos microorganismos han generado resistencia y por consiguiente siguen afectando el rendimiento y calidad de los cultivos. Por lo anterior, Peng *et al.*, (2021) mencionan que esto se ha vuelto un obstáculo para lograr llegar al desarrollo de una agricultura sostenible.

Los hongos fitopatógenos secretan proteínas que pueden interactuar con el hospedero durante la infección. Se trata de proteínas efectoras que desempeñan funciones importantes en las células vegetales que dan pie a la interacción entre los patógenos de las plantas y sus huéspedes.

El aguacate ha sufrido daños por microorganismos patógenos a lo largo de su ciclo biológico y después de su cosecha. Estos daños pueden llegar a ocasionar pérdidas

de hasta el 60% o 100% que va a depender de las condiciones climáticas de la región de cultivo.

En la Figura 4, se muestran los daños resultado de las enfermedades por hongos fitopatógenos. Dentro de estas enfermedades se encuentran la roña, la antracnosis, la mancha negra o mancha angular, la pudrición y marchitez del fruto. Estas enfermedades causan pérdidas económicas dentro y fuera del campo, lo cual repercute en la economía del productor.

2.4.1 Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad comunmente ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides*. El hongo es considerado el principal hongo que enferma frutos de las regiones tropicales y subtropicales (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Se conoce que los frutos que enferman por *Colletotrichum sp.*, contribuyen a la pérdida de hasta el 20% de la producción poscosechada.

Aunque, *Colletotrichum* es el causante de la antracnosis de frutos en aguacate no es el único. En el aguacate esta enfermedad se caracteriza porque el fruto presenta lesiones hundidas de color oscuro que a menudo son circulares y elipsoidales. Se observa la presencia de esporas ya que la colonia tiene un color que va desde salmón hasta naranja o rosada. Sin embargo, a menudo se puede confundir con otro tipo de antracnosis que presenta los mismos síntomas pero es causado por *Pestalotia sp.* A comparación de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotia sp* enferma la casacara del fruto y no penetra a la pulpa (Xoca *et al.*, 2018).

2.4.2 Roña

Esta enfermedad causada por *Sphaceloma perseae*, este hongos es muy común en cultivos de aguacate ya que se ve favorecida por precipitaciones abundantes y humedad relativa elevada en el ambiente causando el 80% del desarrollo de las lesiones. Este hongo se caracteriza por afectar hojas y frutos que poco a poco deterioran su integridad. Los síntomas de esta enfermedad se distinguen por la presencia de lesiones redondas o irregulares que toman un color café claro, toman una apariencia corchosa que pueden llegar a afectar a casi todo el fruto. Al igual que la antracnosis causada por *Pestalotia sp*, *Sphaceloma perseae* también presenta lesiones en la cáscara del fruto y no afecta a la pulpa (Tamayo, 2004). Sin embargo, cuando el fruto presente grietas en la mayor parte de su epicarpio, es mayor el riesgo que se corre de que otros microorganismos ingresen para enfermar el fruto.

2.4.3 Mancha angular o mancha negra del fruto

Se ha reportado a *Pseudocercospora purpurea* (*Cercospora purpurea*) como hongo responsable de causar pérdidas de hasta el 2% del total de la producción. La severidad de la enfermedad radica en las condiciones en las que se encuentre rodeado el cultivo. Estas condiciones son que el cultivo se encuentre en un lugar con precipitación elevada y en plantaciones débiles o mal nutridas. Este hongo enferma a frutos incluso antes de la cosecha pero solo se hace presente la enfermedad en el fruto poscosechado.

Los síntomas que presentan los frutos de aguacate son lesiones de 1 a 2 cm de diámetro donde sus bordes son irregulares y rojos. Dentro de los bordes la coloración es gris o negra y generalmente, las lesiones son en la cáscara dando pauta a que la pulpa se encuentra intacta.

2.4.4 Pudrición chocolate

Esta enfermedad es causada por el hongo *Rhizopus stolonifer* que se encuentra mayoritariamente en el aire. Este microorganismo es un hongo fitopatógeno que causa pérdidas cercanas al 30% ya que su principal función es deteriorar la calidad del fruto. Si bien, este hongo solo enferma frutos cosechados y que no tengan pedúnculo, es decir que no afecta al fruto durante su ciclo de desarrollo.

El ataque de este hongo en frutos se manifiesta por la presencia de moho de color gris en el pedúnculo del fruto. Esto favorece que los conidióforos en el momento de expulsar los conidios y halla una lesión, estos ingresen poco a poco a la pulpa del fruto generando una lesión café o marrón característica de la pudrición interna. Con el tiempo invade totalmente el fruto y al final afecta la cantidad de nutrientes que el fruto contenga, dado así un sabor desagradable.

2.4.5 Pudrición del fruto

Otro tipo de pudrición es la causada por *Dothiorella sp*, un hongo que se hace presente en todas las partes del fruto. No obstante, se han registrado en más ocasiones la presencia de este hongo en el pedúnculo donde hay lesiones marrones en la cáscara y que avanza uniformemente hasta la semilla del fruto. En muchas ocasiones estos síntomas se han confundido por los producidos por *R. stolonifer*. Pero a diferencia de *R. stolonifer*, *Dothiorella sp* no presenta crecimiento micelial en pedúnculo sino que se observa el necrosamiento de los haces vasculares que se encuentran en el interior del fruto.

Lasiodiplodia theobromae es otro hongo que enferma a frutos de poscosecha. Los daños se hacen evidentes cuando en la unión del pedúnculo se observa una lesión de color café oscuro. A comparación de *Dothiorella sp.*, *L. theobromae* presenta crecimiento de micelio blanco en el origen de la infección que va avanzando al interior del fruto deteriorando la firmeza de este. Los síntomas de la pudrición que genera este hongo son similares a los que genera *R. stolonifer*. La diferencia radica

en el color del micelio mientras el *R. stolonifer* es gris, *L. theobromae* presentan crecimiento micelial blanquecino(Darvas, 1978).

2.4.6 Marchitez

El microorganismo encargado de la marchitez en cualquier estado de desarrollo de plantas y frutos de aguacate es *Phytophthora cinnamomi*. Esta enfermedad afecta la producción debido a que disminuye la cantidad y calidad del fruto, hasta desaparecer totalmente.



Figura 4. Enfermedades en frutos de aguacate por hongos fitopatógenos. Fuente: Elaboración propia.

2.5 Aceites esenciales

La mayoría de plantas contienen aceites esenciales los cuales juegan un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra microorganismos fitopatógenos. Los aceites esenciales son inocuos para el medio ambiente, no son tóxicos en pequeñas cantidades para los consumidores y ayudan al control de enfermedades (Shahid *et al.*, 2017).

El uso de aceites esenciales se ha convertido en una tendencia debido a la necesidad de reducir el uso de agroquímicos en la agricultura. Conforme avanzan los años, ha incrementado el interés por la posible aplicación de aceites esenciales debido a que se han registrado microorganismos que presentan resistencia (Barrera & García, 2008).

Bosquez-Molina *et al.*, (2010) mencionan que la mayoría de especies vegetales que contiene aceites esenciales inhiben el desarrollo de los hongos y bacterias en varios productos tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. La actividad fungicida está ligada con el contenido de fenoles monoterpénicos del aceite esencial, tal es el caso del timol (*Thymus vulgaris*), carvacrol (*Origanum vulgare*) y eugenol (*Cinnamomum verum*) (Barrera & García, 2008). También se ha reportado al aldehído cinámico de la canela (Soliman & Badeaa, 2002).

Los aceites esenciales son mezclas complejas ya que en composición química se encuentran diversos compuestos como terpenos, alcoholes, ésteres, aldehídos y compuestos fenólicos, los cuales son los encargados de brindar el aroma característico de cada aceite esencial (Bakkali *et al.*, 2008). Su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma del patógeno. Esto debido a que los aceites esenciales como el de canela y orégano causan la coagulación del material proteico en el citoplasma. También pueden reducir el pH dentro de las células interfiriendo con procesos como la transcripción de ADN, síntesis de proteínas y actividad enzimática. En cuanto a la actividad enzimática, los aceites esenciales inhiben las enzimas que producen ATP y como resultado hay una alteración en el metabolismo.

2.5.1 *Thymus vulgaris* L



Figura 5. Planta de *Thymus vulgaris* L. herborizada. Fuente: Elaboración propia.

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Lamiales*.

Familia: *Lamiaceae*.

Subfamilia: *Nepetoideae*.

Tribu: *Mentheae*.

Género: *Thymus*.

Especie: *Thymus vulgaris*.

Thymus vulgaris es una planta de la familia de las labiadas que usualmente se emplea para condimentar o en la medicina tradicional. Su nombre es de origen griego *thymos* o *thyein* que significa olor, aroma, aludiendo a una característica por la cual se usa como condimento en los alimentos preparados. Esta planta en estado silvestre se encuentra distribuida en laderas con suelo calcáreo.

2.5.2 *Cinnamomum verum*



Figura 6. Trozos de *Cinnamomum verum*. Fuente: Elaboración propia.

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Lurales*.

Familia: *Lauraceae*

Género: *Cinnamomun*.

Especie: *Cinnamomum verum*.

En México es conocida como canela del vocablo francés *Canne* que significa tubo. Las hojas que presenta el árbol son ovaladas, tiesas, brillantes y olorosas . Estas hojas miden entre 8 cm y 16 cm de largo x 3.5 cm a 7 cm de ancho. Las flores son amarillasy se encuentran en racimos. Este árbol tiene frutos cafés con forma ovoide y seco.

Este árbol crece en climas tropicales húmedos y fructifics de junio a septiembre. En México este árbol se encuentra en Veracruz, tabasco, Oaxca entre otros estados.

2.5.3 *Barkleyanthus salicifolius* (Kunth) H. Rob. & Brettell



Figura 7. Planta herborizada de *Barkleyanthus salicifolius* (Kunth) H. Rob. & Brettell.
Fuente: Elaboración propia.

Reino: *Plantae*.

Orden: *Asterales*.

Familia: *Asteraceae*.

Subfamilia: *Asteroideae*.

Tribu: *Senecioneae*.

Subtribu: *Tussilagininae*.

Género: *Barkleyanthus*.

Especie: *B. salicifolius* (Kunth)H. Rob. & Brettell.

Barkleyanthus salicifolius es perenne y se encuentra como arbusto leñoso con ramificaciones a pocos centímetros de las raíces. Llega a medir de 1-2 m hasta 4m de altura. Tiene hojas que miden 9 cm x 1.5 cm son alternas y angostas un tanto puntiagudas sin pelillos. Sus inflorescencias están compuestas de varias cabezuelas que van acompañadas de bractéolas. La corola es amarilla y el fruto es seco e indehiscente que contiene una semilla por lo que se le llama aquenio y es de color café verdoso con pequeñas vellosidades en su superficie. El ápice del fruto presenta numerosas cerdas blancas largas. Es una planta de rápido crecimiento que se encuentra en bosques de pino-encino, matorrales xerófilos y praderas a 3650 msnm.

2.5.4 *Litsea glaucescens* Kunth



Figura 8. Planta de *Litsea glaucescens* Kunth . Fuente: Elaboración propia.

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Laurales*

Familia: *Lauraceae*

Género: *Litsea*

Especie: *Litsea glaucescens* Kunth.

Se caracteriza por ser un árbol o arbustos. Esta especie vegetal tiene hojas alternas, glabras, domacios ausentes. Sus inflorescencias son pseudoumbeladas normalmente solitarias o agrupadas pequeños racimos. También contiene flores campanuladas con 6 pétalos ovados. Los estambres en flores masculinas contienen entre 9 a 12 con filamentos de los cuales, los internos tienen glándulas basales. Las anteras contienen cuatro esporangios verticales. El ovario es globoso en flores femeninas y en las masculinas es atrofiado y más o menos conspicuo. El rango de su hábitat es extenso, puede habitar tanto en lugares húmedos y escarpados propios de los bosques mesófilo de montaña o en áreas menos húmedas y más expuestas como en áreas propias de los bosques de pino o de matorral.

2.5.5 *Ageratina rivalis* (Greenm) King & Rob



Figura 9. Planta de *Ageratina rivalis* (Greenm) King & Rob. Fuente: Elaboración propia.

Reino: *Plantae*

Filo: *Tracheophyta*

Subfilo: *Angiospermae*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Subfamilia: *Asteroideae*

Tribu: *Eupatorieae*

Subtribu: *Oxylobinae*

Género: *Ageratina*.

Especie: *A. rivalis* (Greenm) King & Rob.

Se caracteriza por ser un arbusto de entre 1 y 3 m; tiene tallos parduscos, esparcida a densamente puberulentos con cortos tricomas curvados, generalmente con máculas conspicuas, lineares, numerosas, esparcidas, negras. Hojas pecioladas; láminas 4-13 × 2-11 cm, anchamente ovadas, las nervaduras patentes desde la vena media en un ángulo de 30-45°. Se encuentran divergentes de los márgenes basales de la hoja, ambas superficies no glandulosas, la superficie adaxial uniformemente puberulenta entre las nervaduras. La base es anchamente redondeada a subtruncada o cordata, los márgenes generalmente con 20-30 dientes puntiagudos cercanos. El ápice es agudo a cortamente acuminado, el pecíolo mide entre 2-6 cm. Las capitulescencia sobre tallos foliosos es densa y anchamente corimbosa en 1-3 niveles. Sus ramas son ascendentes y los pedúnculos densamente puberulentos, sin glándulas estipitadas. Cabezuelas miden 7 mm × 0.6-1 mm, son lanceolados y sin glándulas estipitadas o sésiles. Se encuentra en bosques de neblina, bosques de Pinus-Quercus, bosques mesófilos, campos abiertos.

2.5.6 *Pelargonium graveolens* L. Hér. ex Airton



Figura 10. Planta herborizada de *Pelargonium graveolens* L'. Hér. ex Airton. Fuente: Elaboración propia.

Reino: *Plantae*.

(sin rango): *Eudicots*.

Orden: *Geraniales*.

Familia: *Geraniaceae*.

Género: *Pelargonium*.

Especie: *P. graveolens* L'Hér. ex Aiton.

Son arbustos perennifolios de porte erecto muy ramificados que no superan 1,5 metros de altura. Estas plantas presentan hojas lobuladas muy divididas, de color verde y bordes irregulares o dentados. La superficie de las hojas presenta una fina vellosidad que la hace muy suave al tacto, con apariencia aterciopelada. Generalmente las hojas son muy aromáticas, desprendiendo un aroma muy agradable. Las flores aparecen en umbelas y pueden ser blancas o rosas. Florecen desde finales del invierno hasta inicios de verano. *Pelargonium* es originario de Sudáfrica, aunque actualmente existen muchos híbridos, que derivan de cruces entre los ejemplares silvestres de *Pelargonium graveolens* y otros tipos de *Pelargonium*, todos ellos se suelen englobar bajo este nombre. Se les conoce comúnmente como Geranio oloroso o perfumado, por su aroma que puede ser distinto dependiendo del cultivar, hay ejemplares con perfume a rosas, a cítricos, a canela o a menta. A algunas variedades se le atribuyen propiedades repelentes de insectos, como los mosquitos.

2.5.7 *Eupatorium petiolare* Moc. ex DC



Figura 11. Planta de *Eupatorium petiolare* Moc. ex DC. Fuente: Elaboración propia.

Reino: *Plantae*.

Phylum o división: *Tracheophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Asterales*.

Familia: *Compositae*.

Género: *Eupatorium*.

Especie: *Eupatorium petiolare*.

Eupatorium petiolare se caracteriza por ser un arbusto de hasta de 2 m de altura. Tiene hojas que son todo lo contrario a una planta normal ya que estas son más largas que anchas y tienen forma triangular. También, contienen pequeñas vellosidades de color verde en ambas caras. Sus flores son rosas y están por cabezuelas de 35 a 40. Este arbusto es originario de México, y se desarrolla en sitios donde los climas sean cálidos, semicálidos, semisecos o templados desde los 900-3900 msnm. Sin embargo, también se puede encontrar en bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña o bosques de encino y de pino.

2.6 Quitosano

El quitosano es un polímero que según Younes & Rinaudo, (2015) es obtenido de diferentes grados de desacetilación de quitina extraída del esqueleto de crustáceos. Los grados de desacetilación reflejan un equilibrio entre los dos tipos de residuos (quitina y quitosano). Durante el proceso de desacetilación se eliminan los grupos acetilo y de esta manera se produce una reacción de despolimerización mediante cambios en el peso molecular del quitosano. El quitosano presenta grupos amino en su estructura química los cuales pueden ser ionizados en un medio ácido y así se promueve la disolución del quitosano para comportarse como polielectrolítico en la solución.

Ramos-García *et al.* (2010) menciona que el tipo de manejo que se brinda a productos vegetales durante la poscosecha muchas veces se pierde hasta 40% de total del producto cosechado. Esto también depende del producto, el área de producción y época del año. Algunos autores han propuesto el uso del quitosano como una alternativa potencial para la conservación de frutas y vegetales frescos. El uso del quitosano en combinación con ingredientes básicos adecuados al producto puede fungir como barrera de protección. Además, de ello sirve como vehículo para incorporar aditivos como antioxidantes, colorantes y sustancias antimicrobianas que contrarresten la presencia de microorganismos patógenos. Los recubrimientos son considerados como matrices biodegradables y biocompatibles, no son tóxico ni genera efectos secundarios (Bautista *et al.*, 2017).

Quitosano tiene potencial fúngico en contra de diferentes patógenos que pertenecen al reino fungi en función de la concentración utilizada, el peso molecular y el grado de desacetilación. Por otro lado, el quitosano posee carga policatiónica que hace que se adhiera a la membrana plasmática gracias a la carga negativa por los fosfolípidos presentes en su composición de tal manera que desactiva la germinación de esporas (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016). Sin embargo, no todos los hongos presentan la misma sensibilidad al quitosano y esto puede ser debido a la composición de fosfolípidos de membrana y particularmente a la naturaleza de sus cargas neutras (Ramos- García *et al.*, 2010).

2.7 Arcillas

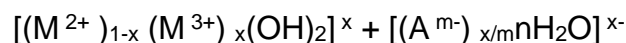
2.7.1 Halloysita

La halloysita es una arcilla catiónica de tipo 1:1 dioctaédrico con una amplia distribución en suelos tropicales muy húmedos y regiones subtropicales. Está formada por la meteorización de varios tipos de rocas ígneas y no ígneas. La halloysita puede ser considerada como un polimorfo hidratado de la caolinita con láminas curvadas que es capaz de ubicar moléculas de agua en el espaciado interlamilar, teniendo una fórmula general de $\text{Si}_2\text{Al}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Las partículas de halloysita pueden adoptar diferentes morfologías como esferas, tubos, placas o listones. La forma tubular alargada está mejor cristalizada, por lo que es la morfología más comúnmente encontrada.

Estructuralmente, los nanotubos de halloysita están constituidos por una superficie externa compuesta de grupos Si-O expuestos en la superficie externa de los nanotubos y a los grupos Al-OH expuestos en la superficie interna. Dado que la superficie exterior es predominantemente de sílice, un óxido ácido, la carga de la superficie será negativa en un amplio intervalo de pH, mientras que la alúmina muestra un mayor comportamiento anfótero.

2.7.2 Hidrotalcitas

Las hidrotalcitas (HT) conocidas también como arcillas aniónicas son minerales de origen natural. Se caracteriza por ser un sólido poroso de estructura laminar. Estas arcillas no son abundantes en la naturaleza como las arcillas catiónicas. A continuación se presenta la fórmula de una hidrotalcita.



M^{2+} y M^{3+} son metales di y trivalentes, A^{m-} es un anión de carga “m” y “x” es la relación metálica molar $\text{M}^{2+} / (\text{M}^{2+} + \text{M}^{3+})$. Esta relación puede tener valores de 0.20 a 0.33 mientras que “n” es el número de moléculas de agua de cristalización.

En la estructura de una hidrotalcita, la sustitución isomórfica del catión divalente mayoritario por un catión trivalente genera un exceso de carga positiva que es compensado por la incorporación de aniones en el espacio interlaminar. Estos aniones se encuentran unidos electrostáticamente a las láminas hidroxiladas que resultan ser fácilmente intercambiables por otros aniones presentes en disolución (Jobbágy, 2003).

Debido a las propiedades químicas de las hidrotalcitas, estas pueden dar origen a una gran variedad de productos a través de tratamientos térmicos que permiten obtener diferentes mezclas con propiedades que permiten tener una elevada área superficial específica, una buena estabilidad térmica, alta dispersión y carácter básico. Estas propiedades han conducido a que dichos materiales hayan recibido mucha atención y aplicación en diversas áreas (Rodríguez *et al.*, 2016).

Cuando en la estructura el catión es magnesio, este se encuentra coordinado hexaédricamente a seis grupos hidroxilo formando estructuras octaédricas. Estos octaedros al compartir sus orillas forman láminas bidimensionales. Cuando algunos cationes Mg^{2+} se reemplazan por Al^{3+} , se forma la hidrotalcita y el arreglo laminar adquiere carga residual positiva. Las capas tipo brucita de las HT pueden ordenarse unas sobre otras con dos simetrías diferentes, romboédrica o hexagonal y esto dependerá de la composición de la capa tipo brucita y del método de síntesis.

3. JUSTIFICACIÓN

El aguacate es un fruto de importancia económica a nivel mundial. Sin embargo, tanto en México como en todo el mundo, la producción de este cultivo está sujeta a grandes pérdidas debido a la presencia de enfermedades causadas principalmente por hongos fitopatógenos. Sin embargo, la agricultura convencional opta por el uso indiscriminado de agroquímicos para combatir problemas fitosanitarios y contrarrestar las pérdidas económicas.

Ante ello, cabe destacar la necesidad de controlar las enfermedades poscosecha permitiendo el desarrollo de estrategias que contribuyan al éxito de la agricultura sustentable. Esto se basa en manejar las enfermedades con alternativas amigables al medio ambiente además de que cuiden la salud y la economía del productor y consumidor.

Actualmente, los productos naturales gozan de amplia aceptación que pueden reemplazar cada vez más a productos sintéticos o materiales generados artificialmente. De este modo representan una opción agroecológica para el control de enfermedades fúngicas en cultivos de interés agronómico. Es por ello que surgió la tendencia de utilizar aceites esenciales y que cada vez aumenta debido a los problemas que generan las pérdidas de producción y los cambios en el medio ambiente que se viven día a día. Además de ello, el quitosano ha sido justificado tecnológicamente en programas de agricultura sostenible ya que no causa problemas contra la seguridad alimentaria.

Es por eso que el propósito de este estudio es generar materiales conteniendo aceites esenciales como agentes bioactivos con actividad antifúngica en hongos fitopatógenos que afectan la calidad del aguacate producido en Yaonahuác, Puebla, México.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

- Generar materiales impregnados con aceites esenciales que presenten actividad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos presentes en poscosecha de aguacate '*Hass*' en Teziutlán, Puebla.

4.2 Objetivos particulares:

- Identificar y aislar hongos fitopatógenos presentes en la poscosecha de aguacate *Hass*.
- Extraer y caracterizar aceites esenciales de plantas aromáticas comercializadas o nativas del Estado de Puebla como *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum verum*, *Barkleyanthus salicifolius*, *Litsea glaucescens* Kunth, *Ageratina rivalis*, *Pelargonium graveolens*.
- Sintetizar y evaluar arcillas y películas que contengan aceites esenciales sobre hongos fitopatógenos de aguacate en condiciones *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el perfil metabolómico dirigido de frutos de aguacate infectado con los hongos fitopatógenos identificados y bajo los tratamientos con los materiales generados.

5. HIPÓTESIS

- Los materiales híbridos impregnados con aceites esenciales presentarán actividad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos del aguacate Hass proveniente de la zona de Teziutlán, Puebla.

6. MÉTODOS

6.1 Sitio de estudio

El lugar de estudio es en el municipio de Yaonáhuac ubicado en la región de Teziutlán, Puebla (Figura 12). El municipio se localiza en la parte noroeste del Estado de Puebla, las coordenadas geográficas de Yaonáhuac son latitud norte 19° 56' 55", longitud occidental 97° 26' 26" y elevación de 1997 msnm. El clima es templado húmedo con lluvias todo el año y una temperatura a anual entre 12°C y 18°C.

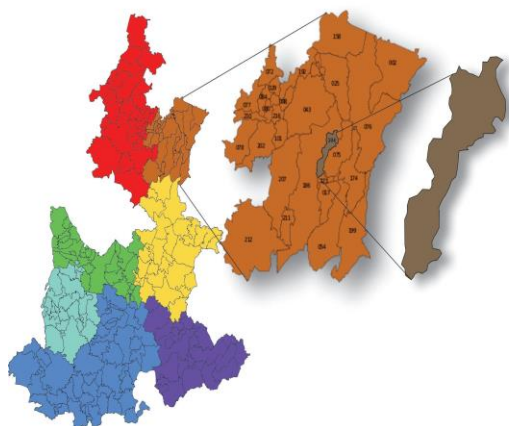


Figura 12. Localización del sitio de estudio. Fuente: Elaboración propia.

6.2. Recuperación y aislamiento de hongos de frutos de aguacate

6.2.1 Recolección de aguacates

Frutos de aguacate con síntomas de pudrición blanda fueron recolectados en plantaciones ubicadas en Yaonáhuac Puebla, México (19° 59' 48" N, 97° 27' 18" O, 1780 msnm) en octubre de 2020.

6.2.2 Cámara húmeda

Los frutos fueron transportados al laboratorio para su sanitización inmediata hipoclorito de sodio al 20 % y agua destilada de acuerdo con Duque-Bautista *et al.* (2017). Luego, estos frutos se depositaron en una caja de plástico limpia con un algodón humedecido con agua estéril. La cámara de húmeda se almacenó a 28 °C y 90% de humedad relativa durante 5 días en oscuridad.

6.2.3 Aislamiento y purificación de hongos en medio de cultivo

Después de mostrar crecimiento, los hongos se sembraron en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (200 g/L de papa; 20 g/L de agar bacteriológico y 20 g/L de dextrosa). Posteriormente, con las colonias purificadas se realizaron las pruebas de patogenicidad (postulados de Koch) para después seguir con la identificación de los hongos fitopatógenos.

6.2.4 Pruebas de Koch

Frutos asintomáticos de aguacate Hass fueron lavados con agua destilada e hipoclorito de sodio al 20%. Se realizaron tres lavados con la finalidad de eliminar polvo y contaminantes externos. Enseguida fueron colocados en cajas de plástico previamente lavadas y etiquetada por cada cepa aislada.

La inoculación se realizó mediante la recolección directa de conidióforos del hongo con ayuda de una aguja estéril y se inoculó el fruto de aguacate por penetración mecánica (Duque-Bautista *et al.*, 2017). El proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y las cajas fueron almacenadas durante 21 días a 27 °C en oscuridad. Los microorganismos que presentaron daño mecánico más severo en el fruto fueron sometidos a identificación física y molecular.

6.3 Pruebas de identificación físicas

La identificación preliminar de los hongos se realizó mediante la observación de las estructuras reproductivas de cada cepa seleccionada como fitopatógenas después de haber realizado las pruebas de patogenicidad.

6.3.1 Técnica de microcultivo

Para esta técnica se requiere preparar medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA), 200 g/L de papa; 20 g/L de agar bacteriológico y 20 g/L de dextrosa. La placa con medio fue cuadrículada con medidas de 1 cm x 1 cm en la base para después con ayuda de un bisturí estéril se cortaron cuadros.

En una caja Petri de 100 mm x 15 mm se colocó una gasa humedecida y sobre ella, dos hisopos los cuales servirán de base para el portaobjetos. El cuadro de agar fue colocado sobre el portaobjetos y en cada lado se inoculó una muestra del hongo mediante punción. Sobre este cuadro se colocó un cubreobjetos enseguida la placa fue cubierta y se dejó incubar por 5 días a 27°C en oscuridad.

Finalmente, las estructuras son observadas a microscopio y con ayuda de las Tablas 5 y 6 se pudieron conocer las características morfológicas tanto microscópicamente como macroscópicamente.

Tabla 5. Características de morfología macroscópica. Fuente:Elaboración propia.

Características.	
Forma	Puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, como en huso.
Relieve o Topografía	Rugosa, crateriforme, verrucosa, plegada, lisa.
Borde o margen de la colonia.	entero, ondulado, lobulado, lacerado, filamentoso, rizado
Consistencia	Dura/Suave
Textura	Algodonosa, granular, pulverulenta, aterciopelada.
Color	Anverso y Reverso
Crecimiento.	Rápido, moderado, lento.

Tabla 6. Características de morfología microscópica. Fuente:Elaboración propia

Característica	
Tipo de Hongo	Hialino/Dematiaceo
Tipo de hifa	Septada/Cenocítica
Reproducción	Sexual/Asexual
Estructuras observadas	Tipo de conidios, Estructuras reproductoras, Métulas, Fiálides, Estolón, Forma de hifa, etc.

6.3.2 MEB.

Se prepararon microcultivos para observarlos por MEB. Esto en base al punto 7.3.1.

6.4 Pruebas de identificación molecular

Para la identificación molecular, la extracción de DNA fue llevada a cabo con el Kit E.Z.N.A. Plant DNA DS Mini Kit de la marca Omega Bio-Tek. Posteriormente, se ensayaron los marcadores moleculares para hongos filamentosos. La identidad molecular se logró mediante la secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) utilizando los cebadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Duque-Bautista *et al.*, 2017). El gen del factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF-1 α) utilizando los cebadores EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) y EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (Molnár *et al.*, 2015). Las amplificaciones se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Al final las secuencias fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6.4.1 Análisis filogenético

Se hizo uso de la base de datos NCBI para buscar secuencias con valores altos de identidad en base a la cepa de estudio. Así mismo se tomó en cuenta una cepa

como grupo externo para la construcción del árbol filogenético. De la base de datos se descargó la secuencia correspondiente al ITS y EF-1 α . Por medio del programa Clustal X versión 2.0. se realizó la alineación de las secuencias ITS y EF-1 α por separado. Posteriormente, se utilizó el programa de análisis evolutivos MEGA versión 11.0.11 para realizar la concatenación de ambas secuencias y obtener el árbol filogenético.

6.5 Preparación de materiales

6.5.1 Extracción de aceites esenciales

Cada planta fue recolectada y pesada para poder obtener rendimientos. Posteriormente la materia vegetal fue cargada en un matraz balón de 1000 mL y se adicionó agua destilada. El matraz fue insertado al equipo Clevenger y es puesto en una parrilla de calentamiento donde la materia vegetal es calentada para liberar vapor corriente arriba hacia el condensador. A la salida del condensador el equipo está lleno de agua donde el aceite esencial se va acumulando debido a la diferencia de densidad. Este proceso tuvo una duración de aproximadamente tres horas.

6.5.1.1 Caracterización química

Se realizó en una serie Hewlett Packard 6890 II con una columna capilar HP-5 (30 m X 0,25 mm de D.I. cubierta con 0,25 μ m de fenildimetilpolisiloxano 5:95 como fase estacionaria). Los datos de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas se corroboraron adicionalmente en un cromatógrafo de gases Varian CP3800 equipado con una columna capilar Factor Four VF-5ms (30 m X 0,25 mm DI, 25 μ m de 5:95 fenil-dimetilpolisiloxano como fase estacionaria) acoplado a un modelo Varian cuadrupolo 320MS. La fase móvil fue helio a 1 mL min⁻¹ de flujo.

Los volátiles del aceite esencial se identificaron en base a sus espectros de masas (70 eV) usando la base de datos de referencia estándar NIST 2.0 y por comparación con los índices de retención reportados en la literatura (Adams, 2007).

6.5.1.2 Obtención de rendimientos

La evaluación de los rendimientos de los aceites esenciales fue determinada por el porcentaje de rendimiento de aceite esencial (%RAE). Para poder obtener rendimientos, las muestras serán pesadas desde que se recolectan hasta el momento en que pasará por el proceso de hidrodestilación. Cuando este proceso se termine se tomará nota del gramaje del aceite.

$$\%RAE = (\text{Peso AE} / \text{Peso de Muestra}) * 100$$

6.5.2 Hidrotalcitas

La síntesis de la hidrotalcita de ZnAl se elaboró con una relación metálica molar $M^{2+}:M^{3+}$ de 3:1. Como primer paso, se preparó una solución 2.5 M con las sales de los nitratos de Al y Zn. A la par también se preparó solución 2 M de NaOH el cual fue el agente precipitante. Cada solución se colocó en una bureta donde ambas soluciones se agregaron lenta y simultáneamente en un vaso de precipitado que contenía 50 mL de agua destilada. El proceso de coprecipitación se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente y se controló el flujo de las soluciones de cada una de las buretas, a fin de que el pH se mantuviera constante e igual a 8. Una vez que se agotó la solución de las sales metálicas, la mezcla se colocó en un baño de ultrasonido (Branson 5510, 135 W, 42 Hz) por 30 minutos. Posterior a la sonicación, el sólido se separó de la solución y se lavó con agua destilada (aproximadamente 250 mL/g) y se dejó precipitar. Se decantó la solución y se lavó nuevamente hasta que el pH fuera constante (aproximadamente 8.5). El sólido se recuperó por decantación y se secó a 60 °C durante 24 horas en una estufa. Finalmente, el sólido resultante se pulverizó en un mortero hasta obtener un polvo fino.

La nanoarcilla tubular conocida como halloysita se obtuvo comercialmente de Sigma-Aldrich. Su fórmula química es $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \cdot 2H_2O$ y se empleó directamente del envase considerando una pureza del 100%.

Para la impregnación del aceite, se preparó una solución 1:1 de agua:etanol donde se agregó 0.024 mL aceite de canela concentrado por cada mL de solución. A la solución resultante se le agregó 0.048 g de material (hidrotalcita o halloysita) por cada mL de solución. La mezcla resultante se colocó en un baño de ultrasonido (Branson 5510, 135 W, 42 Hz) por 30 minutos. Posterior a la sonicación, el sólido se recuperó por decantación y se secó a 60 °C durante 24 horas en una estufa. Finalmente, el sólido resultante se pulverizó en un mortero hasta obtener un polvo fino.

6.5.2.1 Caracterización por difracción de rayos X (XRD)

Los parámetros estructurales del composito se obtuvieron por difracción de rayos X utilizando un aparato Bruker D8 Discover equipado con un detector tipo LynxEye.

6.5.2.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis de termogravimetría simultánea y calorimetría de barrido diferencial se realizaron usando un equipo NETZSCH STA 449 F3 Jupiter para determinar cambios de masa y efectos térmicos en un rango de temperaturas entre -150°C y 2400°C.

6.6 Evaluación de materiales *in vitro*

6.6.1 Técnica de microdilución en caldo

Esta técnica hace uso de inóculos de hifales los cuales se obtienen en placas con una capa delgada (5 mL) de agar dextrosa de patata para facilitar la difusión del compuesto de pruebas a través del agar. Al cortar discos de agar se adiciona al medio de cultivo PDB previamente vertido a la microplaca. El volumen (μL) de solución stock a evaluar se adiciona después de agregar el disco de agar. Después se agregó el indicador de viabilidad y se incubó a 27°C durante 24 h en condiciones de oscuridad (Chadha & Kale, 2015). Ya por último se hace una lectura a 630 nm en un lector de microplacas de 96 pozos, de los datos obtenidos se obtiene el

promedio tanto del control positivo, control negativo, así como evaluaciones de los aceites esenciales. Se procede a calcular el porcentaje de inhibición para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\bar{x} \text{ abs AE}) - (\bar{x} \text{ abs viabilidad})}{(\bar{x} \text{ abs inhibición}) - (\bar{x} \text{ abs viabilidad})} \times 100$$

6.6.2 Evaluación de hidrotalcitas en lentes de contacto suaves

Se pesaron 0.2, 0.4 y 0.6 mg de ambas muestras (CanF1 y CanF2). Inmediatamente se preparó medio de cultivo PDA y se colocaron las lentes de contacto suave en cajas Petri de 60 x15 mm. Posteriormente se tomaron 300 µL de medio que fueron agregados a tubos eppendorf previamente esterilizados. Se obtuvo una mezcla lo más homogénea posible que fue adicionada a cada lente de contacto.

Se realizó el conteo de conidios en cámara de Neubauer de las cuales se adicionó una alícuota con 100 conidios a cada tratamiento y se incubaron a 28 °C por 72 horas. Los resultados fueron observados en microscopio electrónico de barrido a 20X.

6.6.3 Elaboración de biopelículas

Las películas se prepararon basándose en el método empleado por Puscaselu *et al.*, (2020). Se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v). Esta solución se mantuvo bajo agitación a 50 °C durante 60 minutos. Enseguida se agregaron diferentes volúmenes de aceite esencial para obtener una concentración de 0.4%, 0.7%, 1.0% y 1.3% (v/v). Las películas fueron nombradas en base a Formulación (F), Canela o Tomillo (C o T) y la numeración ascendente conforme a la concentración respectivamente (1-0.4%, 2-0.7%, 3-1.0% y 4-1.3%) La solución final se vertió en placas Petri de vidrio (100*15 mm) y se secó a temperatura ambiente (27 °C) durante 72 horas.

6.6.2.1 Caracterización por FT-IR y SEM de las películas

Las películas de quitosano y aceite esencial se midieron utilizando en un rango de número de onda de 400-4000 cm^{-1} . Para SEM, las películas fueron cortadas en cuadros de 1 cm^2 , enseguida estos cuadros son cubiertos por una capa fina de oro al vacío para ser observadas en un microscopio JEOL JSM-6610.

6.6.2.2 Evaluación de Grosor

El espesor de las películas se midió utilizando un micrómetro digital de alta precisión (iGaging, precisión de 0,001 mm). Se realizaron diez mediciones al azar sobre toda la superficie de la película.

6.6.2.3 Opacidad

La opacidad se determinó por el método de Gutiérrez & Alvarez, (2017) con ligeras modificaciones. Los datos se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-Vis (UV1600PC) a 190-800 nm y se utilizó una celda vacía como blanco de control. La transmitancia de la película se determinó utilizando muestras con dimensiones de 1 a 5 cm de longitud que se colocaron dentro de la cubeta en orientación perpendicular a la fuente de luz. La opacidad de las películas se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm y se calculó mediante la ecuación descrita por el autor previamente mencionado.

6.7 Evaluación de materiales *in vivo*

6.7.1 Evaluación de la biopelícula en aguacates sanos

Se recolectaron frutos de aguacate que no presentaran síntomas de enfermedad. Antes de probar las películas, los frutos fueron lavados con agua destilada e hipoclorito de sodio al 20% durante 12 horas y se enjuagó con agua destilada estéril. Por otro lado, se realizó un conteo de conidios por cámara de Neubauer para poder inocular 100 conidios sobre la película de cada fruto. La evaluación de las películas de quitosano y aceite esencial se realizó por quintuplicado por 21 días. Para el control positivo, el aguacate fue inoculado con los conidios sin ningún tratamiento.

6.7.2 Evaluación *in situ* de las películas

La evaluación se llevó a cabo con muestras de película, cortando un cuadro de 1 cm² de cada tratamiento. Se utilizó la misma solución de conidios y sobre cada muestra de película se añadieron 100 conidios. Como control positivo se cortó un cuadro de agar PDA del mismo tamaño de las películas y se añadieron solo los conidios. Se monitoreo durante 7 días a temperatura ambiente y en oscuridad

6.7.2 Evaluación de la firmeza

Para determinar firmeza se utilizó un penetrómetro, se realizarán cinco penetraciones a lo largo de la cáscara del fruto. Posteriormente, el resultado se calculó con el promedio de las cantidades otorgadas por el equipo y fue reportada en Kg/cm².

6.8 Análisis bromatológico

Para hacer una comparación entre los aguacates sanos y los que tenían biopelícula, se procede hacer un análisis bromatológico según metodologías de la AOAC.

Proteína: Método 920.23 de la AOAC

Fibra: Método 962.09 de la AOAC

Grasa: Método 920.39 de la AOAC

Azúcares reductores: Método 945.66 de la AOAC

6.9 Determinación de ácidos grasos.

La determinación se realizó mediante la cuantificación del contenido de tocoferoles y ácidos grasos en aguacate, metodología reportada por Amado *et al.* (2019).

6.10 Análisis estadístico

El análisis se realizó utilizando cinco repeticiones por tratamiento. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar como análisis estadístico. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó una prueba de Tukey (P<0.01) para la comparación de medias, empleando el programa STATGRAPHICS.

7. RESULTADOS

7.1 Recuperación y aislamiento de hongos de frutos de aguacate.

En la Figura 13A se muestran los aguacates que se recolectaron para recuperar los hongos fitopatógenos. Se observan indicios de antracnosis, roña y pudrición chocolate. Así mismo, en la Figura 13B se observa el resultado de los aguacates que fueron sometidos a incubación a temperatura ambiente y en oscuridad por cinco días.

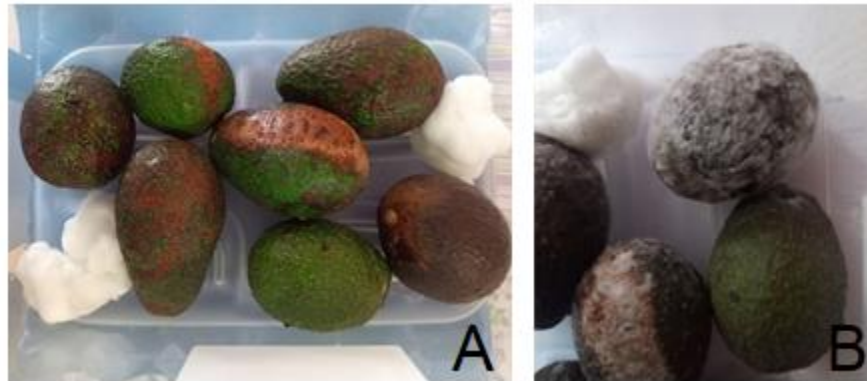


Figura 13. A, Frutos con daño en el epicarpio. B, Resultado de cámara húmeda.

Así mismo, los hongos fueron sembrados en placas con medio de cultivo Agar Papa-Dextrosa (PDA), incubados en las mismas condiciones y después de cinco días obtuvieron las morfologías presentadas en la Figura 14. Cada cepa fue denominada con la letra W y en orden de recuperación se les asignó del número 1 al 7.

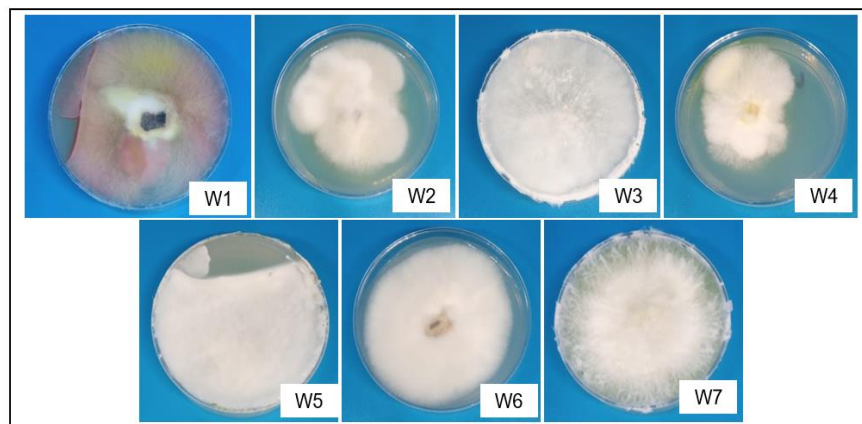


Figura 14. Morfología de cepas de hongos recuperados de aguacates enfermos.

7.2 Pruebas de patogenicidad

Una vez aislados y purificadas las cepas, estos fueron inoculados en frutos de aguacate sano. Las cinco cepas fueron probadas durante 21 días en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Se documento el cambio mediante fotografías que son presentadas en la Figura 15. En la misma figura, en la última columna se observa el daño que causa el agente dentro del fruto.

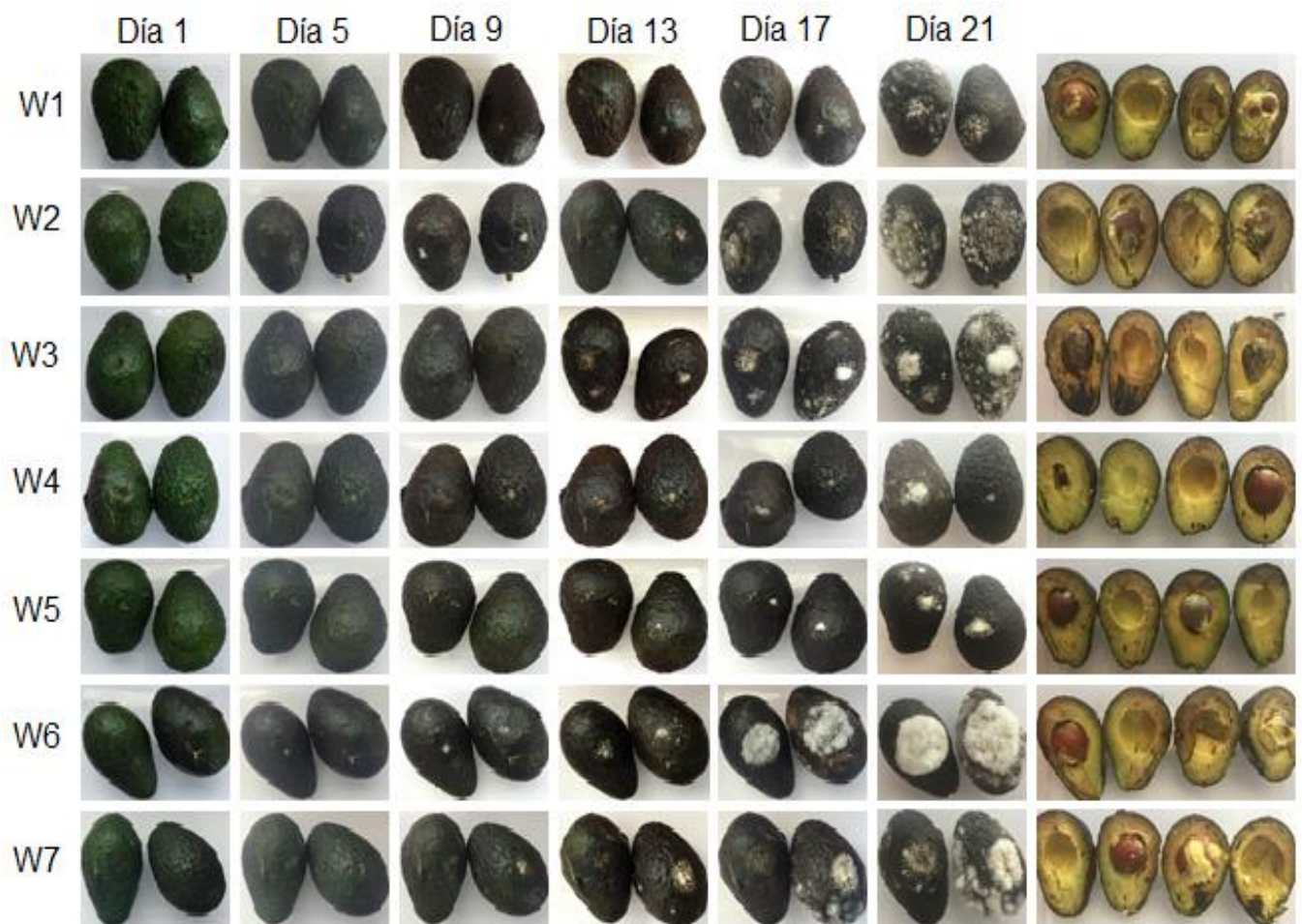


Figura 15. Pruebas de patogenicidad de siete cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de aguacate Hass.

Las cepas W1, W2, W3, W6 y W7 que se presentan en la Figura 16 fueron las seleccionadas para repetir esta técnica con frutos sanos y las mismas condiciones

de incubación con el único cambio de que la inoculación se realizó con los hongos resultantes de las primeras pruebas de patogenicidad.

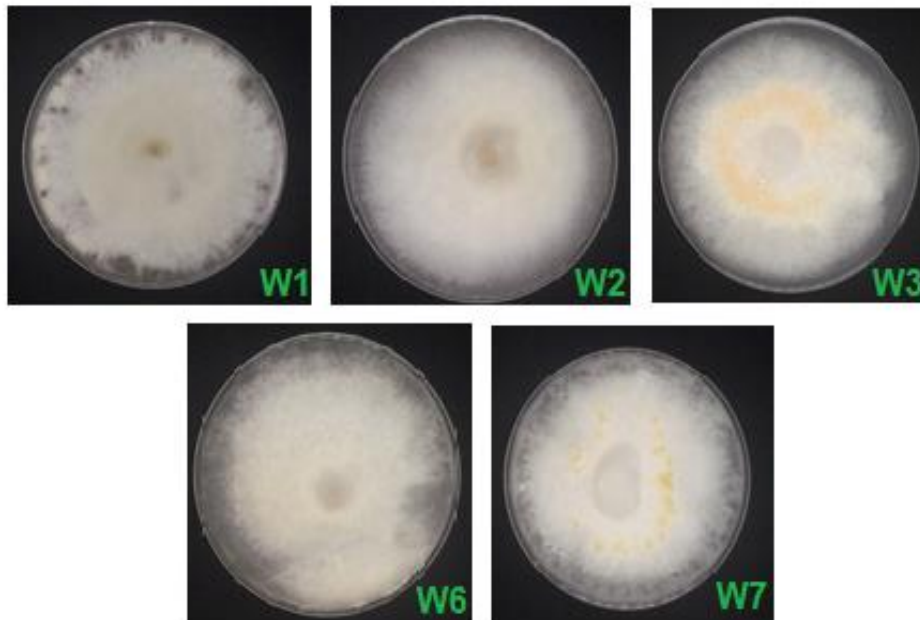


Figura 16. Cepas de hongos catalogadas como fitopatógenas.

El resultado de estas segundas pruebas se presenta en la Figura 17 donde de la misma manera, en la última columna se observa el daño que provocan estos agentes dentro del fruto. Sin embargo, no se descarta la idea de que a campo abierto participan microorganismos oportunistas que intervienen en la pérdida total del fruto (Duque-Bautista *et al.*, 2017). Finalmente, se corroboraron que estas cepas son de hongos fitopatógenos porque repiten el mismo patrón de infección.

Con estos resultados se confirman los postulados de Koch que enuncian en primer plano que el microorganismo debe ser hallado y aislado del fruto enfermo. Así mismo, este microorganismo presentó la misma enfermedad que el fruto original en aguacates sanos.

7.3 Pruebas de identificación físicas y moleculares

Los microcultivos duraron alrededor de 6 días en condiciones de oscuridad a 28°C se observaron las estructuras reproductivas en microscopio electrónico de barrido.

Los resultados fueron fotografiados, colocados en la Figura 17 y descritos en base a las Tablas 5 y 6.

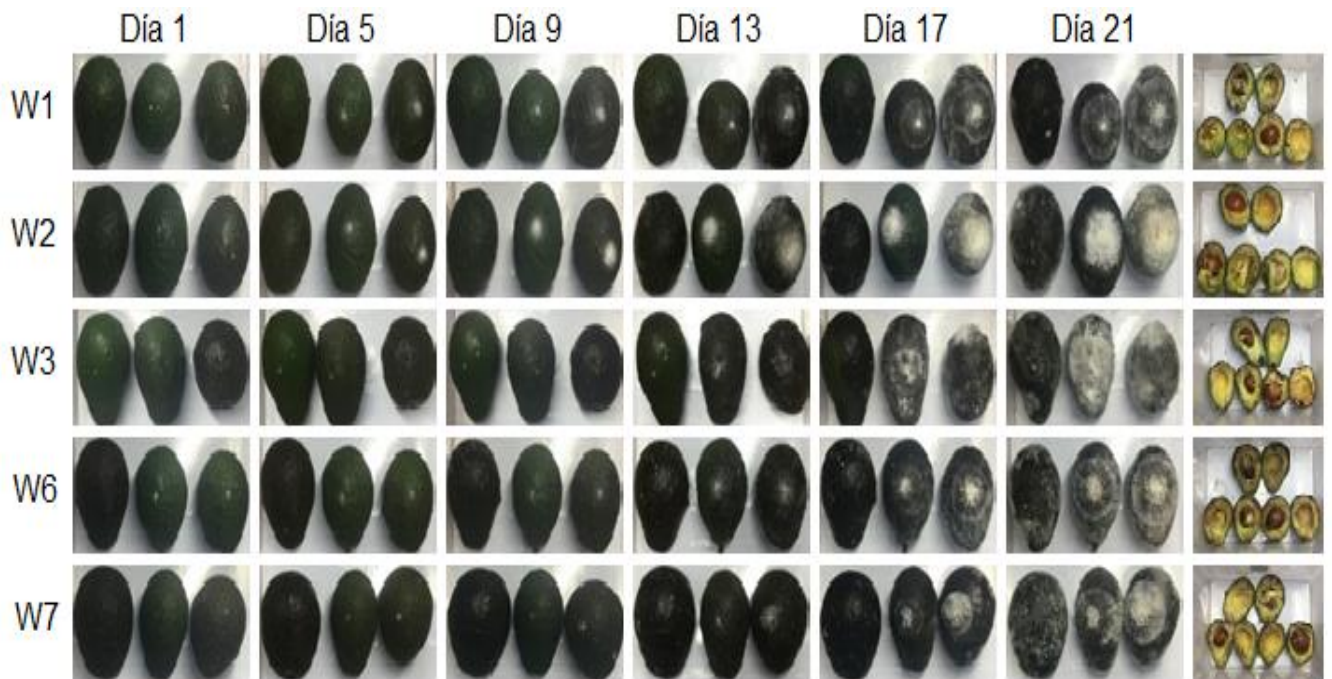


Figura 17. Segundas puebas de patogenicidad con cinco cepas de hongos fitopatógenos en frutos sanos de aguacate Hass.

Por otra parte, en la identificación molecular se utilizan regiones génicas conservadas para especies fúngicas. El ITS es la región que más se utiliza en el ADN ribosomal (Rojo-Báez *et al.*, 2017). Por el cual se usaron ITS reportados en Duque-Bautista *et al.*, (2017) concluyendo que las pruebas resultaron positivas para hongo ascomicetos (Figura 18). Estas amplificaciones fueron enviadas a Macrogen Inc. en Corea del Sur. Las secuencias fueron cotejadas en National Center of Biotechnology Information.

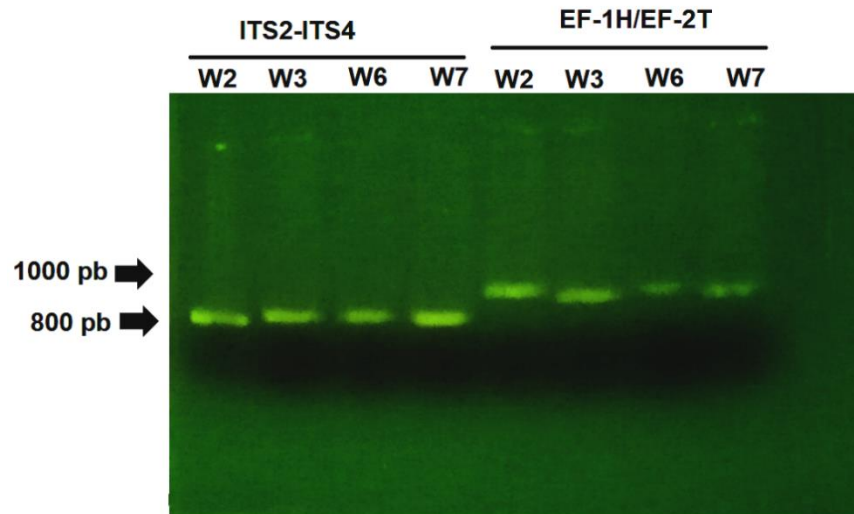


Figura 18. Gel de los resultados de PCR para cepas W2, W3, W6 y W7.

Los análisis de la secuencia del IF-1H en la base de datos del NCBI demostraron su homología (100%) con el gen de *Fusarium verticillioides* strain LGMF 1882 translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) gene, partial cds (ID: MG838993.1) (Figura 19A). La secuencia codificante con el ITS4 tuvo un 100% de homología con la secuencia ID: EU314975.1 de *Gibberella moniliformis* (Figura 19B). Si bien, la forma teleomórfica de *F. verticillioides* es *Gibberella moniliformis*, que es heterotálico, ya que el apareamiento ocurre entre colonias de distintos grupos (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Sin embargo, se ha reportado la presencia de estos hongos fitopatógenos de aguacate Hass en Colombia donde 19 aislamientos pertenecientes al género *Fusarium*, de los cuales el 73.7% se aisló de frutos, 15.8% de hojas y 5.3% de pedúnculo y raíz, respectivamente. Dentro de los 19 aislamientos se encuentra *F. verticillioides* en frutos de aguacate (Hernández-Medina *et al.*, 2015). Por otra parte, *Fusarium verticillioides* está asociado a semillas de palto como hongo fitopatógeno en Ayacucho, Perú (Leon & Mattos, 2021).

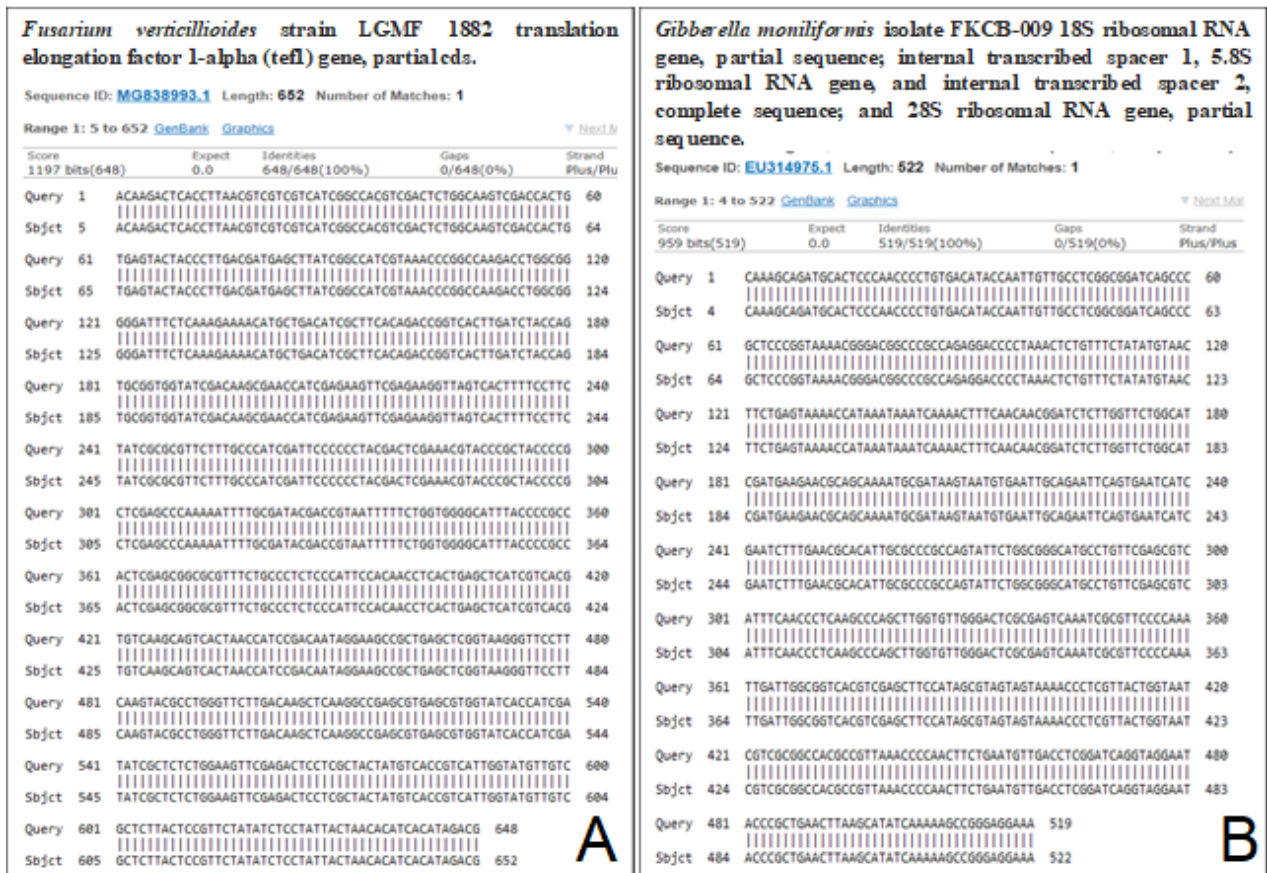


Figura 19. Alineamientos de *Fusarium verticillioides*. A, Resultados de alineamiento con IF-1H, B, Resultados de alineamiento ITS4 (NCBI).

La cepa W1, presentó una morfología macroscópica caracterizada por una colonia blanca en el anverso y ligeramente color crema en el reverso (Figura 20A y 20B). Tiene forma filamentosa, consistencia suave, textura algodonosa y borde lacerado. Su crecimiento es lento ya que la colonia demora en crecer más de siete días. En cuanto a su morfología microscópica se encontró que es un hongo hialino, con hifas septadas. Tiene macroconidios (Figura 20C) que se caracterizan por ser delgados, largos y curvados. Estos se producen en una célula conidiógena denominada fiálide. Tiene una parte ensanchada en su base, cuello terminal y un collarite. Sus microconidios son ovales y algunos ovoides que miden aproximadamente 6.71 μm de largo por 3.28 μm de ancho (Figura 20D). En base a lo descrito en la morfología macroscópica y microscópica, el posible género al que pertenece la cepa W1 es

Fusarium debido a las características que presenta la cepa (Rentería-Martínez *et al.*, 2019; Espinoza-Ahumada *et al.*, 2019).

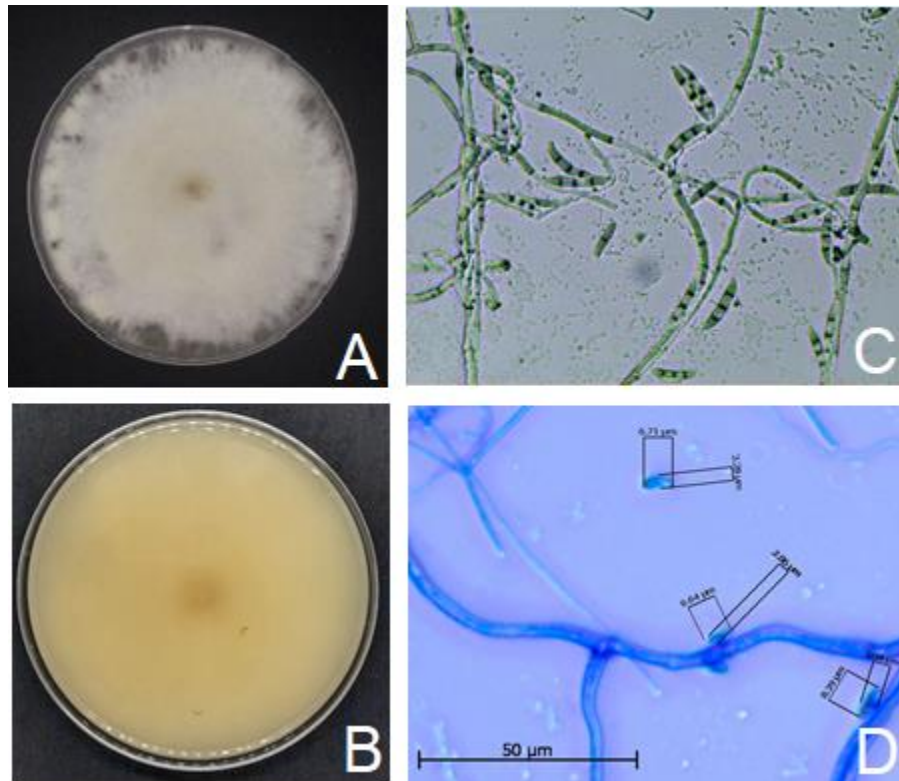


Figura 20. *Fusarium verticillioides*. A, Anverso. B, Reverso. C, Macroconidios (50X). D, Microconidios (100X).

Para la cepa cuyo código es W2, en el análisis de la secuencia del IF-1H en la base de datos del NCBI demostró su homología (98.46%) con el aislado *Fusarium solani* NESO1_1_18 espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; Gen de ARN ribosómico 5.8S y espaciador 2 transcrito interno, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico de subunidad grande, secuencia parcial (ID: MN452725.1) (Figura 21A). Por otro lado, la secuencia codificante con el ITS4 tuvo un 98.81% de homología con la secuencia ID: MN013857.1 de *Fusarium solani* aislado abc2, DGGE gel band def2 espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial; Gen de ARN ribosómico 5.8S y espaciador 2 transcrito interno, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico de subunidad grande, secuencia parcial (Figura 21B).

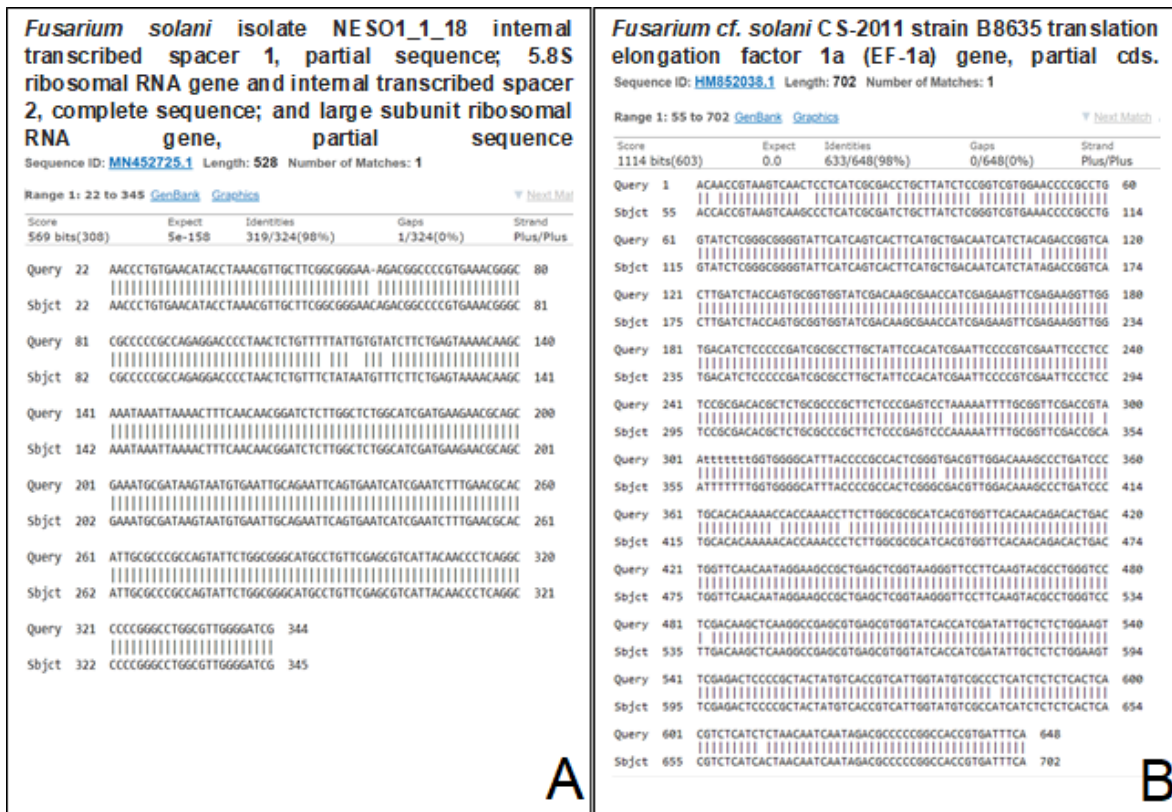


Figura 21. *Fusarium solani*. A, Resultados de alineamiento con IF-1H. B, Resultados de alineamiento ITS4 (NCBI).

En cuanto a la observación de sus estructuras, la cepa presentó una colonia blanca en su anverso y su reverso es color crema (Figura 22A y 22B), tiene forma filamentosa, textura algodonosa, borde filamentoso, consistencia suave y crecimiento moderado (4-7 días). Los macroconidios eran rectos a ligeramente curvados con paredes delgadas. Las células apicales estaban ligeramente curvadas y ahusadas. Las monofialides no ramificados con microconidios de 0 a 3 septos. Las características morfológicas fueron consistentes con lo descrito por Wanjiku *et al.* (2020) y Dugassa *et al.* (2021).

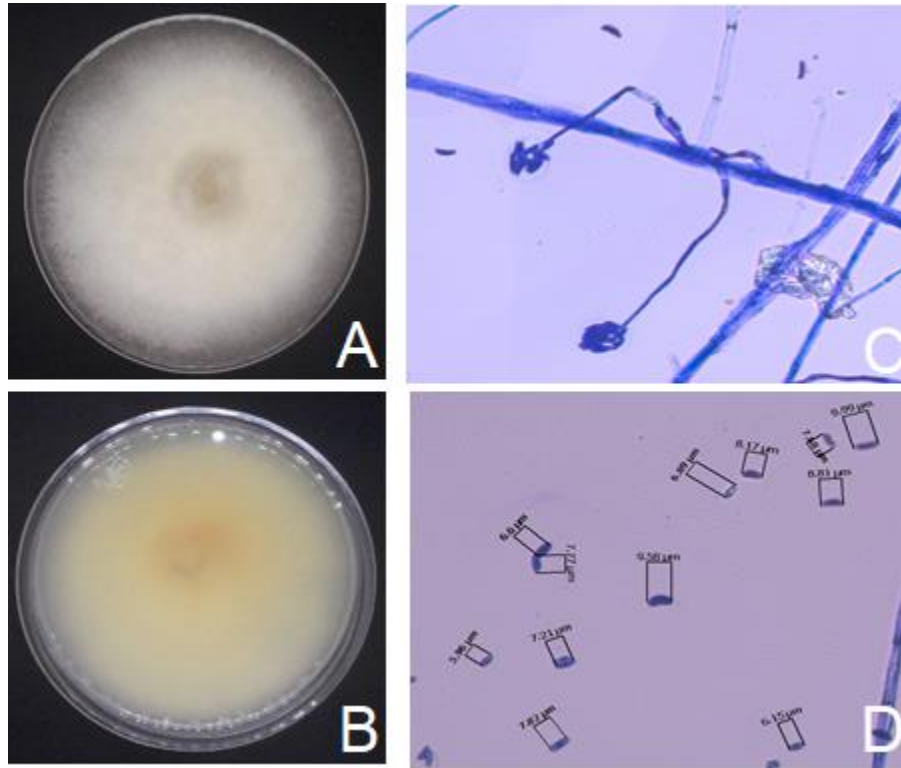


Figura 22. *Fusarium solani*. A, Anverso. B, Reverso. C, Monofialides (50X). D, Microconidios (50X).

Esta cepa fitopatógena es la causante principal de la marchitez de las plantas de chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*) e inducen la pudrición de la raíz, clorosis y defoliación (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). Se ha encontrado provocando una intensa pudrición de la raíz en la planta de habas (Dugassa *et al.*, 2021). También fue encontrada como hongo fitopatógeno causante de la pudrición del fruto *Cucurbita maxima*, variedad local (Túnez) cv. *Bjaoui*. (calabacita) (Moumni *et al.*, 2021). Por otro lado, se ha reportado el aislamiento de 14 hongos fitopatógenos de 207 aislamientos pertenecientes a *F. solani* en frutos de aguacate obtenidos de huertas y mercados. Estudio realizado en el condado de Muranga, que es el condado líder en producción y exportación de frutos de aguacate en Kenia (Wanjiku *et al.*, 2020).

Finalmente se ha encontrado que las cepas cuyo código son W3, W6 y W7 pertenecen a *Clonostachys rosea*. Para demostrar esto se buscaron los resultados de las secuencias en la base de datos del NCBI.

Siendo así, que la cepa cuyo código es W3, demostró su homología (100%) con el ITS4 de la cepa SC28B04 de *Clonostachys rosea*, secuencia parcial; Gen de ARN ribosómico 5.8S y ITS2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico de subunidad grande, secuencia parcial (ID: MW113380.1) (Figura 23A). En adición, la secuencia codificante con el EF-1H tuvo un 99.49% de homología con la secuencia ID:MT415234.1 corresponde a *Clonostachys rosea* cepa Maho4 gen del factor de elongación de traducción 1-alfa (TEF), cd parcial (Figura 23B).

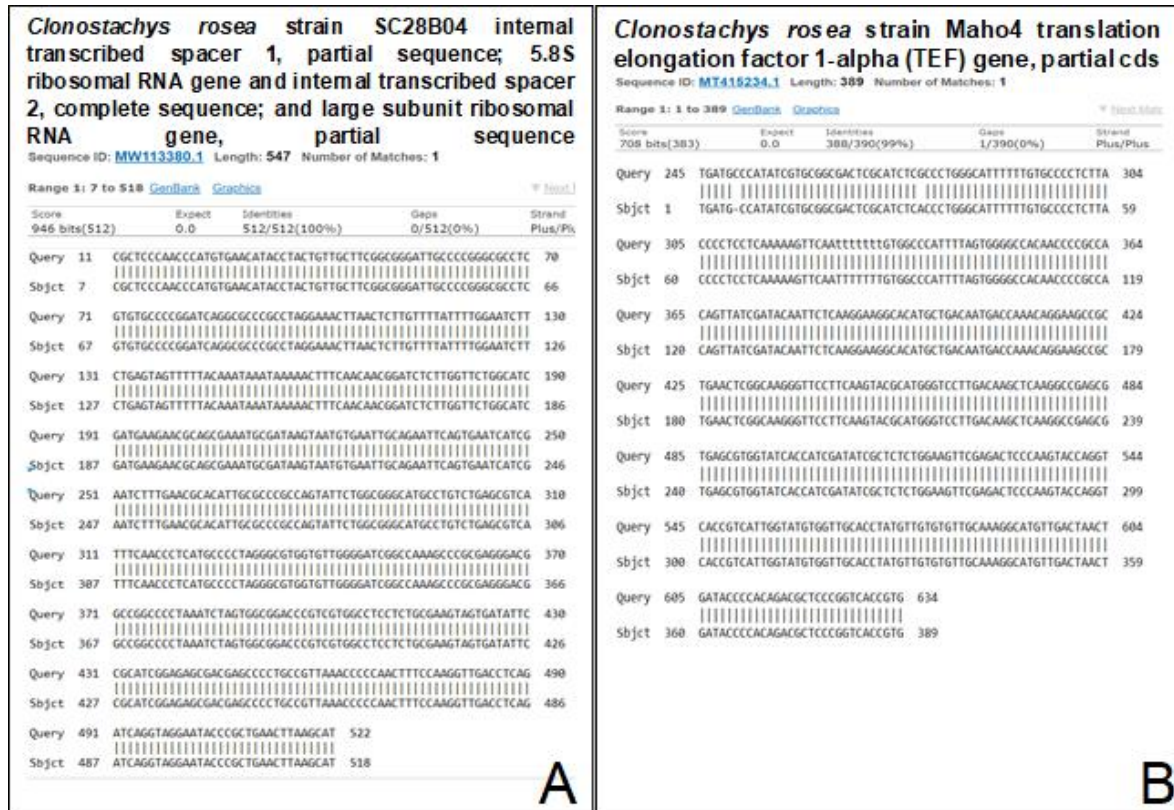


Figura 23. *Clonostachys rosea* (W3). A, Resultados de alineamiento con ITS4 B, Resultados de alineamiento IF-1H (NCBI).

La cepa W6 tuvo una homología del 100% y con el ITS4 el microorganismo pertenece a la cepa FCR23 de *Clonostachys rosea*, secuencia parcial; Gen de ARN

ribosómico 5.8S e ITS2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico de subunidad grande, secuencia parcial (ID: MW453182.1) (Figura 24A). En el caso del EF-1H pertenece de igual forma al gen de la cepa *Clonostachys rosea f. rosea* CML 2310 del factor de elongación de traducción 1-alfa (tef1), cds parciales. La secuencia codificante tuvo un 99.76% de homología con la secuencia ID: KX184998.1 (Figura 24B).

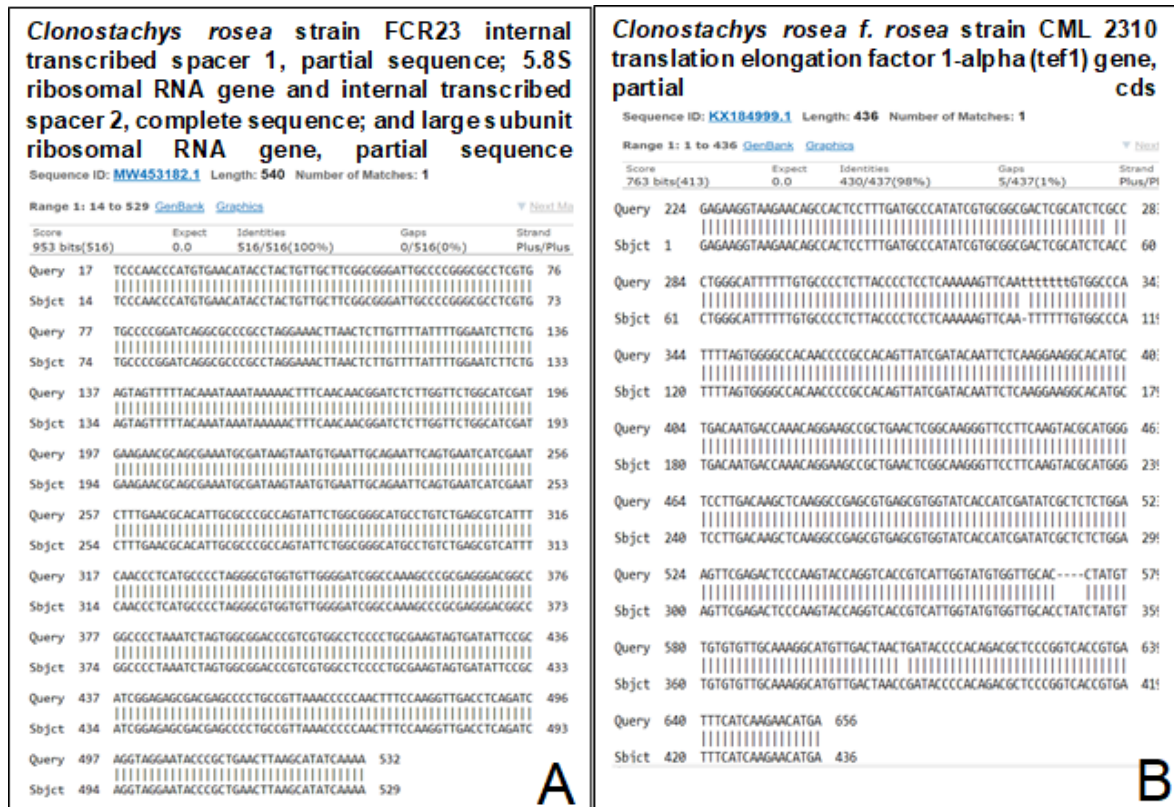


Figura 24. *Clonostachys rosea* (W6). A, Resultados de alineamiento con ITS4. B, Resultados de alineamiento IF-1H (NCBI).

Finalmente, para la cepa W7, con el ITS4 se obtuvo una homología del 100% (MN452772.1) con la cepa aislada *Clonostachys rosea* ARSO1_2_51_2 ITS1, secuencia parcial; Gen de ARN ribosómico 5.8S y ITS2, secuencia completa; y gen de ARN ribosómico de subunidad grande, secuencia parcial (Figura 25A). Para la secuencia codificante con el EF-1H tuvo un 99.61% de homología con la secuencia

ID:MT465653.1 *Clonostachys rosea* traducción factor de elongación gen 1-alfa, cd parcial (Figura 25B).

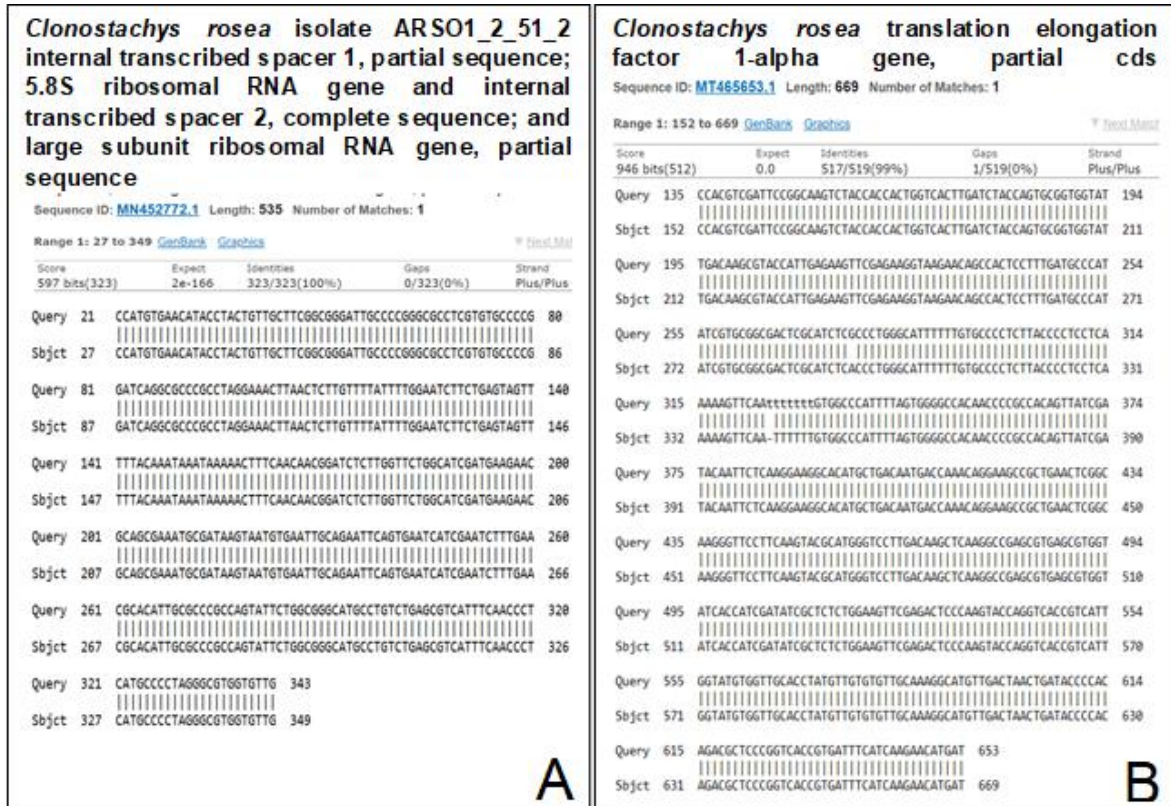


Figura 25. *Clonostachys rosea* (W7). A, Resultados de alineamiento con ITS4. B, Resultados de alineamiento IF-1H (NCBI).

La morfología macroscópica de las cepas W3, W6 y W7 presentan un color blanco en el reverso y dos de ellas tienen un color crema en el anverso (Figura 26A, B y 28A, B). Mientras que la cepa W6 en su anverso es color amarillo como se observa en la Figura 27B. Por otro lado, las cepas presentan textura algodonosa, forma filamentosa, borde lacerado, consistencia suave y tienen un crecimiento moderado (4-7 días).

Clonostachys rosea es un hongo filamentoso hialino y en su morfología microscópica presenta conidióforos en dos formas distintas. La primera como conidióforos ramificados verticilados (Figura 26C, 27D y 28C) y la segunda como conidióforos ramificados penicilados (Figura 27C y 28D) lo cual concuerda con lo reportado por Sun *et al.* (2020). Sin embargo, Anwar *et al.* (2018) y Afshari &

Hemmati (2017), los mencionan como conidióforos primarios a los verticilados y conidióforos secundarios a los penicilados.

Los conidios de los conidióforos ramificados verticilados son más largos y ovalados teniendo forma de gota. En cambio, los conidios de los conidióforos ramificados penicilados presentan forma ovalada. Esto se puede corroborar con lo reportado por Li *et al.* (2006). La diferencia entre estas dos formas de conidióforos es que a comparación de los conidióforos penicilados, los conidióforos verticilados se encuentran de 2-4 septos o verticilos de fiálides. Los conidióforos penicilados se observan de 2-3 septos con 2-4 fiálides.

Además de ello, este microorganismo produce dos formas diferentes de conidios durante su ciclo de vida: conidios y clamidosporas. Los conidios primarios midieron aproximadamente 10.43 μm de largo por 4.42 μm de ancho. Las clamidosporas son globosas y presentan una pared lisa. Sun *et al.* (2020) comenta que *Clonostachys rosea* forma clamidosporas cuando el microorganismo se encuentra en entornos hostiles como pH desfavorables y bajas temperaturas. En comparación con los conidios, las clamidosporas son significativamente más grandes y resistentes a las condiciones ambientales adversas.

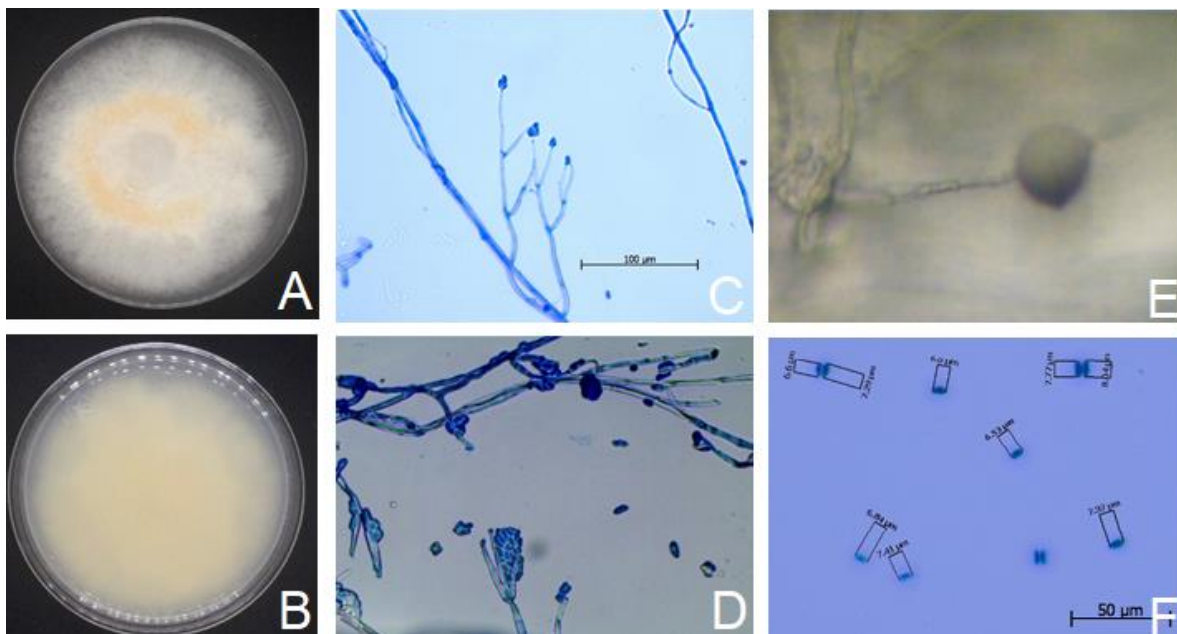


Figura 26. *Clonostachys rosea* (W3), A. Anverso, B.Reverso, C. Conidióforo penicilado (50X), D. Conidióforo verticilado, E. Clamidosporas, F. Conidios (50X).

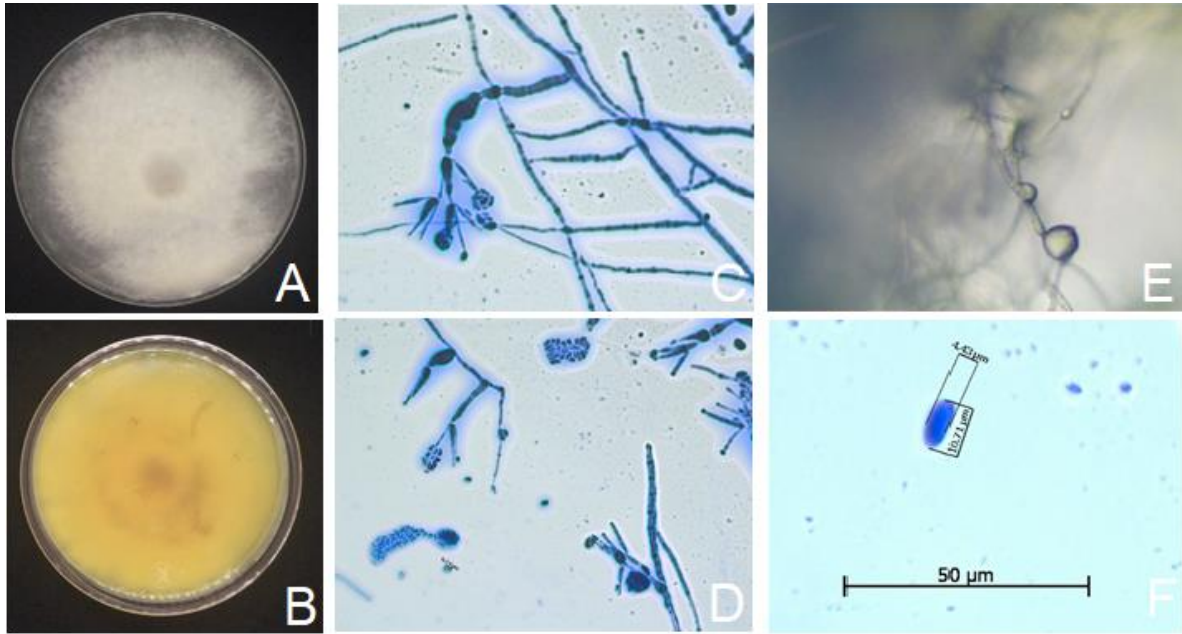


Figura 27. *Clonostachys rosea* (W6). A, Anverso. B, Reverso. C, Conidióforo penicilado (50X), D, Conidióforo verticilado, E, Clamidosporas, F, Conidios (100X).

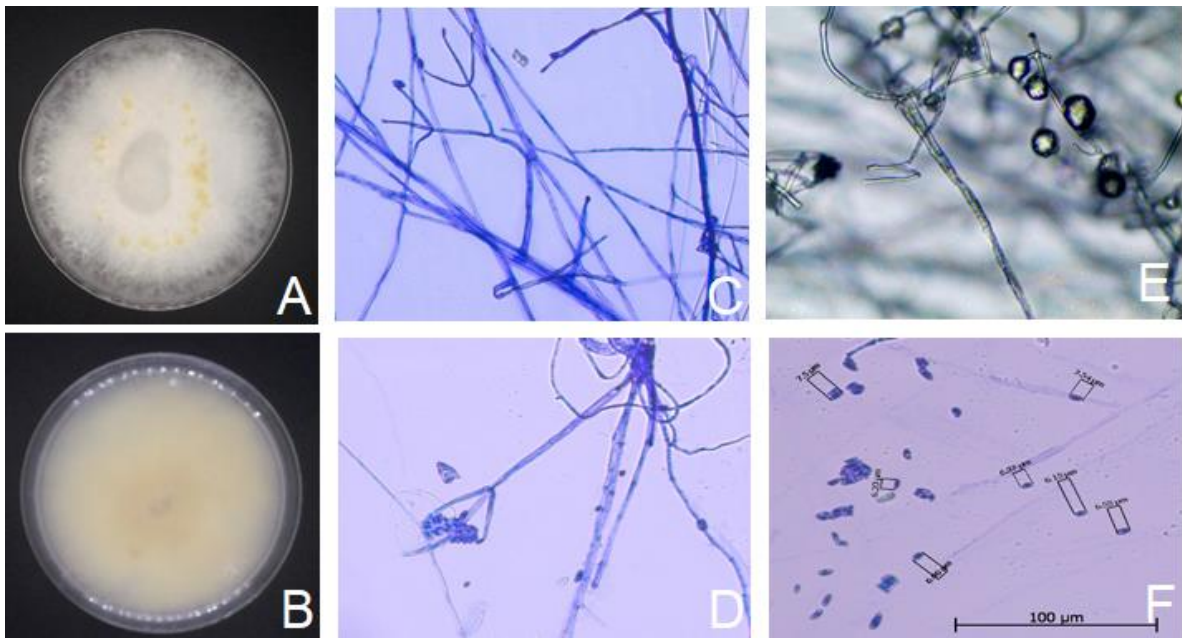


Figura 28. *Clonostachys rosea* (W7). A, Anverso. B, Reverso. C, Conidióforo verticilado (50X). D, Conidióforo penicilado (50X). E, Clamidosporas. F, Conidios (50X).

Esta cepa fue determinada como patógena ya que afecta a los frutos de aguacate Hass. Sin embargo, se ha reportado la recuperación de este hongo con mayor frecuencia del suelo seguido de diferentes tipos de plantas, como cebada, cebolla, fresa, rosa y cacao, en las que las raíces, hojas y flores son las principales partes aisladas, siendo la parte de mayor frecuencia la raíz (Sun *et al.*, 2020). La cepa se conoce como excelente agente biológico que juega un papel crucial en el control biológico de muchos tipos de patógenos. Hasta la fecha, se ha informado que *C. rosea* actúa contra varios hongos patógenos de plantas.

Este agente de control biológico es útil incluso contra *Fusarium solani* o *Colletotrichum gloeosporioides*, hongos que son capaces de enfermar frutos de aguacate (Rodríguez *et al.*, 2011). El antagonismo contra estos microorganismos patógenos se debe a la competencia de nutrientes, micoparasitismo y la resistencia inducida (Roberti *et al.*, 2008). Además, su producción de metabolitos secundarios puede ejercer un efecto antibiótico, similar al encontrado en otros hongos de control biológico.

Pero se ha reportado al menos dos trabajos donde este microorganismo funge como fitopatógeno. El primer reporte de *C.rosea* como agente causante de la pudrición de la raíz de la soja y la colonización sistémica de la soja en Minnesota, Estados Unidos. En el reporte comentan que este hongo pudo haber sido aislado previamente de plantas de soja asintomáticas e identificado como *Gliocladium roseum* (Bienapfl *et al.*, 2012). El segundo reporte por Afshari & Hemmati (2017) es sobre el aislamiento de *C. rosea* de plantas de habas que mostraron síntomas de marchitez y pudrición, en el noroeste de Irán. Demostrando con un experimento de patogenicidad de invernadero que esta especie es el agente causal de la enfermedad.

7.3.1 Análisis filogenético

La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. El árbol obtenido del análisis filogenético de los hongos fitopatógenos se muestra en la Figura 29-31. Así mismo, se anexan las Tablas 7-9 donde se presenta la información de cada cepa que conforma el árbol filogenético.

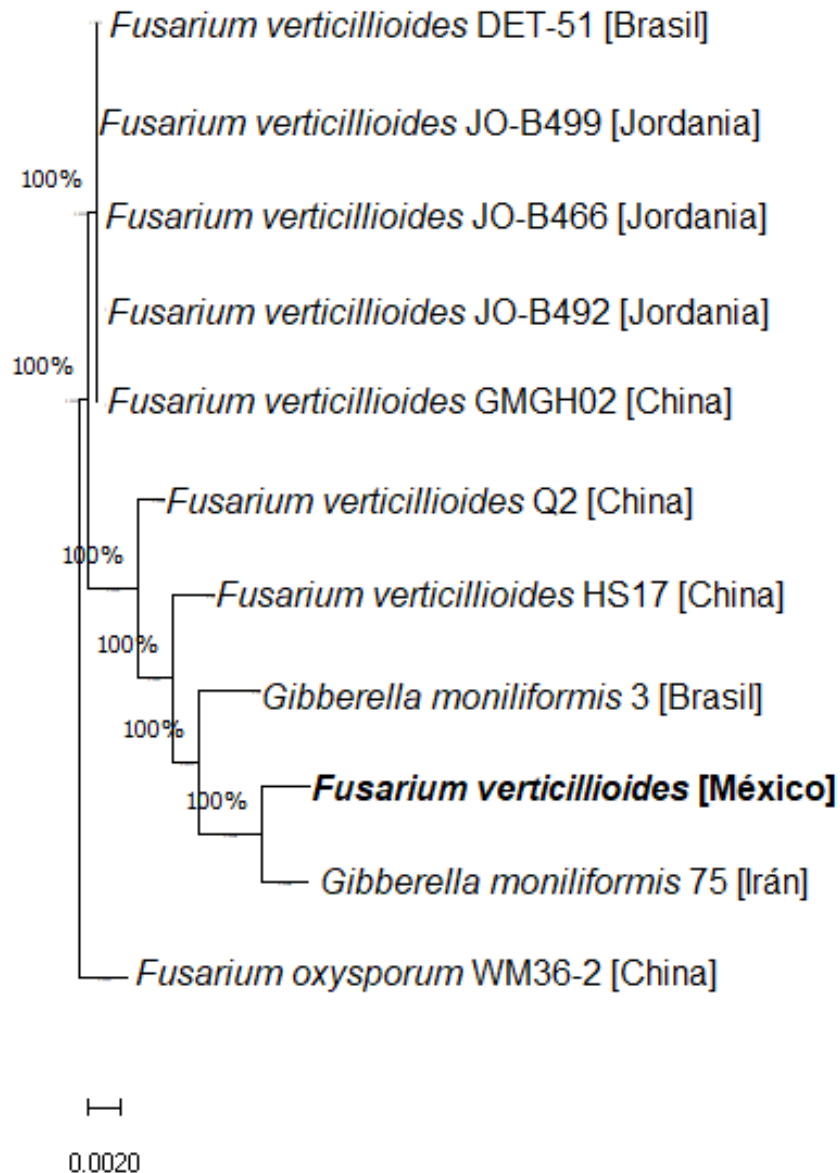


Figura 29. Árbol filogenético de *F. verticillioides* generado por secuencias concatenadas de ITS y EF-1 α .

Para *F. verticillioides*, se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de rama = 0.03917030 (Figura 29). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El árbol tiene una escala de 0.0020 generado a partir de secuencias concatenadas ITS-EF-1 α . Este análisis involucró 11 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 100% de cobertura del sitio, es decir, se permitieron menos del 0 % de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial). Hubo un total de 506 posiciones en el conjunto de datos final.

Entre las secuencias que tuvieron homología con la cepa estudiada provienen de China y Jordania. Así mismo se observa en el primer grupo que tres secuencias de Jordania están agrupadas junto con una de China y otra de Brasil lo cual destaca que hay cierta similitud en la información genética de cada cepa. Estas cepas de Jordania como se observa en la Tabla 7, fueron recuperadas de plátano. Para el caso de Brasil y China fueron recuperadas de *Aspidosperma polyneuron* y tabaco respectivamente.

Además, se tiene como cepa externa a *Fusarium oxysporum* originaria de China.

Tabla 7. Información de las secuencias que componen el árbol filogenético de *Fusarium verticillioides*.

Especie	Cepa	Fuente de aislamiento	País	No. Access	
				ITS	EF-1 α
<i>Gibberella moniliformis</i>	75	Complejo de especies de <i>Fusarium fujikuroi</i>	Irán	JQ363719.1	JQ432384.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	HS17	Trigo y maíz	China	KY426418.1	KY435737.1
<i>Gibberella moniliformis</i>	3	Granos de maíz	Brasil	JQ363718.1	GU989124.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	GMGH02	Tobaco	China	MW386816.1	MW383503.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	JO-B492	Plátano	Jordania	MN335234.1	MN335239.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	JO-B466	Plátano	Jordania	MN335233.1	MN335238.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	Q2	Maíz	China	MN698249.1	MN689177.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	DET-51	<i>Aspidosperma polyneuron</i>	Brasil	KX385056.1	MN223455.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	JO-B499	Plátano	Jordania	MN335235.1	MN335240.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	WM36-2		China	MK158493.1	MK266485.1
Cepa		Aguacate	México		

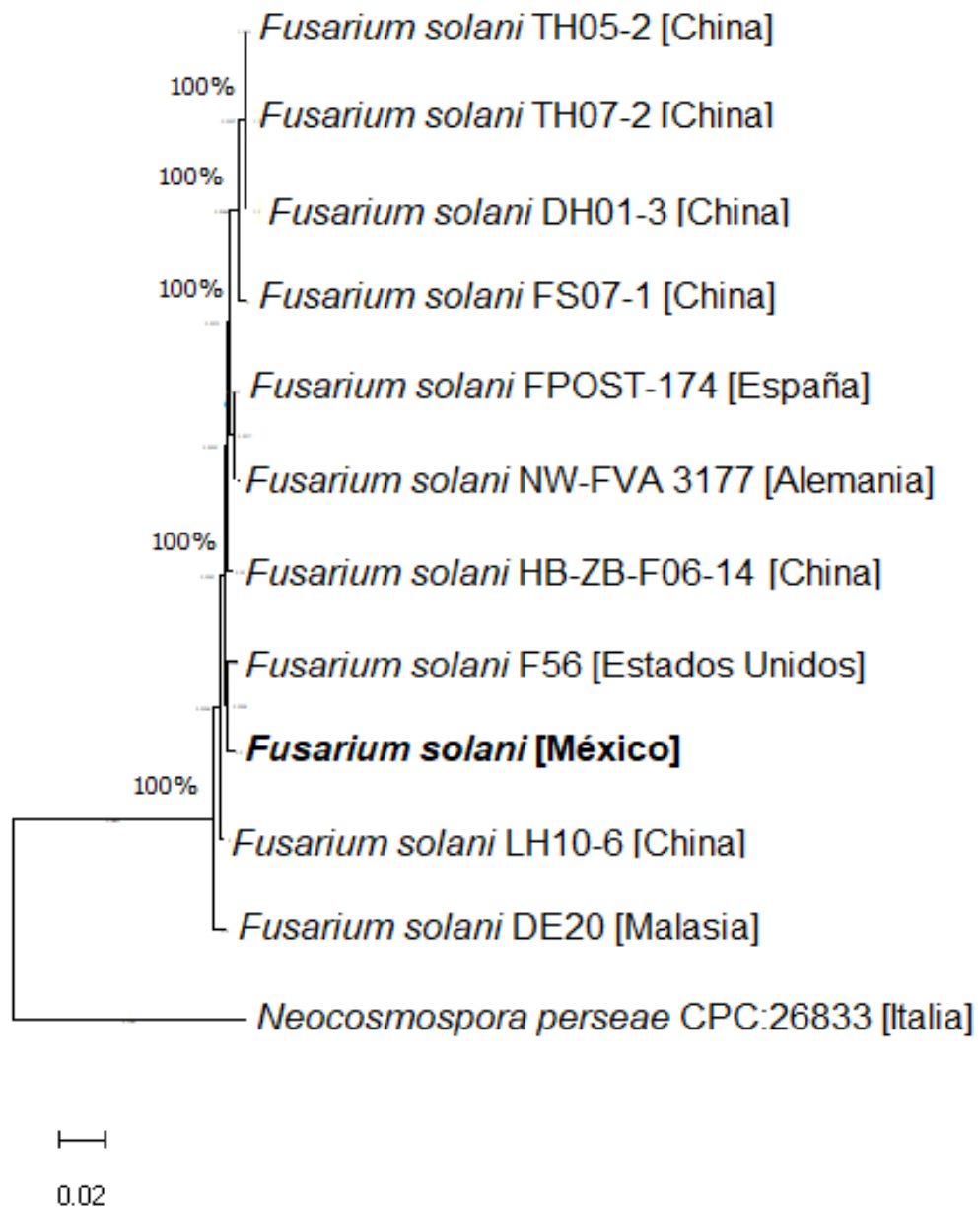


Figura 30. Árbol filogenético de *F. solani* generado por secuencias concatenadas de ITS y EF-1 α .

Para *F. solani* se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de rama = 0.23497162 (Figura 30). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El árbol tiene una escala de 0.020 generado a partir de secuencias

concatenadas ITS-EF-1 α . Este análisis involucró 12 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 100 % de cobertura del sitio, es decir, se permitieron menos del 0 % de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial). Hubo un total de 1014 posiciones en el conjunto de datos final.

La mayoría de secuencias halladas con la información genética de la cepa *Fusarium solani* de este trabajo proviene de China de *Panax ginseng* donde principalmente se recuperó el microorganismo de la raíz de la planta. Sin embargo, no deja de pasar desapercibida en fruto porque la mayoría de hongos del género *Fusarium* atacan desde la raíz de una planta hasta el fruto producido por esta. En la Tabla 8 se observan los diferentes países de los cuales se hallaron las cepas.

Tabla 8. Información de las secuencias que componen el árbol filogenético de *Fusarium solani*.

Especie	Cepa	Fuente de aislamiento	País	No. Access	
				ITS	EF-1 α
<i>Fusarium solani</i>	FS07-1	<i>Panax ginseng</i>	China	MN636714.1	MN650117.1
<i>Fusarium solani</i>	DH01-3	Ginseng (raíz)	China	MN637839.1	MN650105.1
<i>Fusarium solani</i>	TH05-2	Ginseng (raíz)	China	MN637848.1	MN652892.1
<i>Fusarium solani</i>	LH10-6 []	<i>Oryza sativa</i>	China	MK611942.1	MN927129.1
<i>Fusarium solani</i>	F56	<i>Lilium longiflorum</i>	Estados Unidos	HQ379676.1	KY020039.1
<i>Fusarium solani</i>	FPOST-174	Fresa	España	KY484986.1	KX215054.1
<i>Fusarium solani</i>	HB-ZB-F06-14	Remolacha azucarera	China	KT213074.1	KT213256.1
<i>Fusarium solani</i>	DE20	Suelo de manglares	Malasia	KF897899.1	KM580560.1
<i>Fusarium solani</i>	TH07-2	Ginseng (raíz)	China	MN637851.1	MN652894.1
<i>Fusarium solani</i>	NW-FVA_3177	<i>Fraxinus excelsior</i>	Alemania	MH191237.1	MH220421.1
<i>Neocosmospora perseae</i>	CPC:26833	<i>Persea americana</i>	Italia	LT991944.1	LT991906.1
Cepa		Aguacate	México		

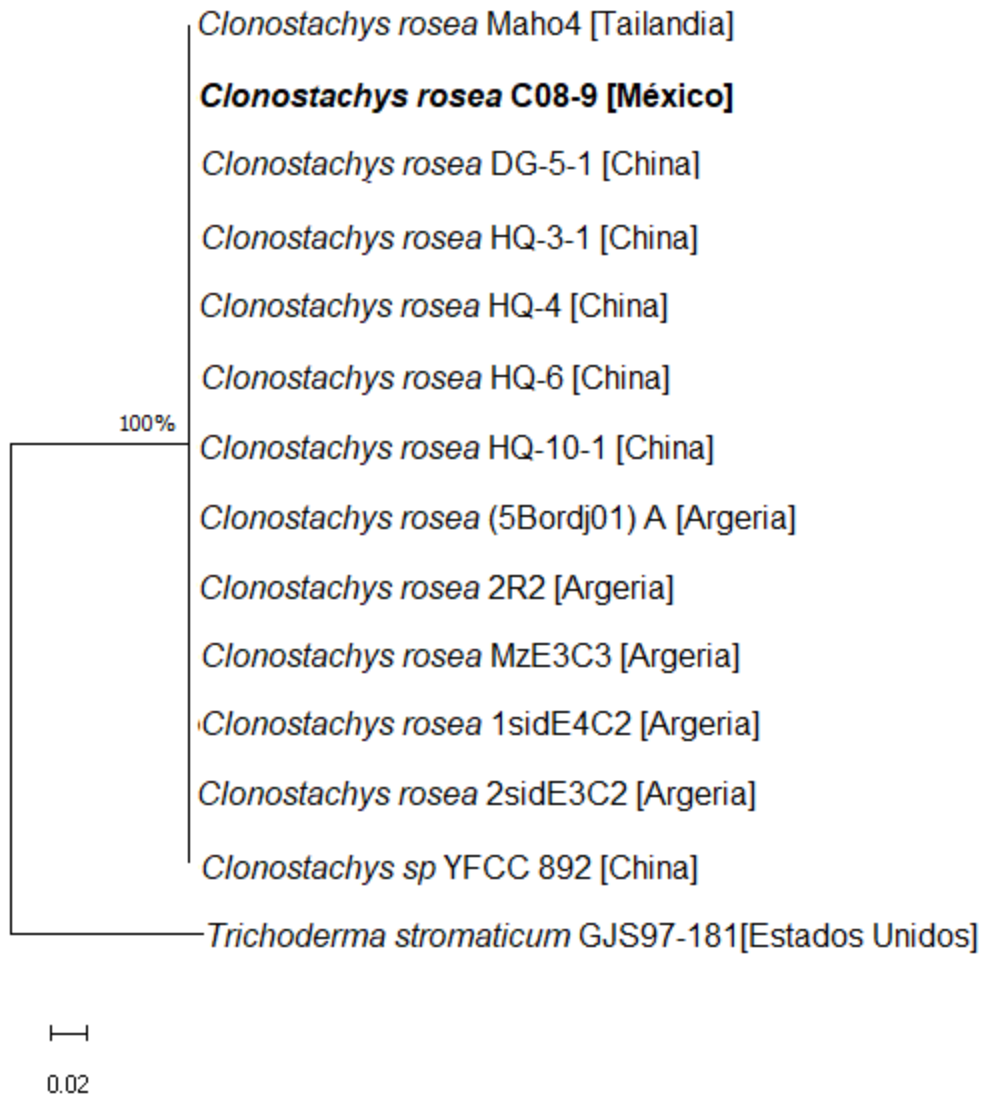


Figura 31. Árbol filogenético de *Clonostachys rosea* (W6) generado por secuecnias concatenadas de ITS y EF-1 α .

Para *C. rosea*, se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de rama = 0.22056366 (Figura 31). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta y están en las unidades del número de sustituciones

transversionales por sitio. El árbol tiene una escala de 0.020 con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para el árbol filogenético generado a partir de secuencias concatenadas ITS-EF-1 α . Este análisis involucró 14 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 100 % de cobertura del sitio, es decir, se permitieron menos del 0 % de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial). Hubo un total de 2379 posiciones en el conjunto de datos final.

La secuencia de la cepa de México, *Clonostachys rosea* C08-9 (indicada en negritas), se agrupó con 13 secuencias de diversos países. La mayoría de las secuencias con la que se relaciona la cepa estudiada son de China. Qui *et al.*, (2022) aisló esta cepa de *Clonostachys rosea* de la raíz podrida de *Astragalus membranaceus* encontrando varias del mismo microorganismo de las cuales 4 cepas se encuentran concatenadas en el árbol filogenético (HQ-3-1, HQ-4, HQ-6 y HQ-10-1). Por otra parte, las cepas que se ubican genéticamente más cerca de la cepa estudiada, *Clonostachys rosea* DG-5-1 es una cepa hallada en pudrición de la raíz de *Angelica sinensis* causada por este microorganismo en China (Ma *et al.*, 2022). Por otro lado, la cepa *Clonostachys rosea* Maho4 halla en Tailandia fue aislada de hongos en semillas y frutas silvestres reportado por Perera *et al.* (2020). Además, *Trichoderma stromaticum* GJS 97-181 se consideró como microorganismo externo debido a que tiene relaciones genéticas con *Clonostachys rosea*. La diferencia radica en la familia a la que pertenecen ambos. En cambio, *Trichoderma* pertenece a la familia *Hypocreaceae*, *Clonostachys rosea* pertenece a *Bionectriaceae*.

Tomando como referencia en su conjunto, la información anterior indica que *Clonostachys rosea* es de origen monofilético ya que todas las cepas de *Clonostachys* incluidas en el árbol filogenético han evolucionado a partir de una población ancestral común. Esto indica que *Clonostachys rosea* C08-9 procede de una pequeña población fundadora que en el pasado adquirió patogenicidad (Tabla 9).

Existen muchos factores por el cual una cepa desarrolla patogenicidad, este radica en la variación en los fenotipos de patogenicidad y virulencia producidos por la acumulación de cambios genéticos recientes. Esto es posterior a la evolución del microorganismo y el área geográfica en que el huésped se encuentre.

Tabla 9. Información de las secuencias que componen el árbol filogenético de *Clonostachys rosea* (W6).

Especie	Cepa	Fuente de aislamiento	País	No. Access	
				ITS	EF-1 α
<i>Trichoderma stromaticum</i>	GJS 97-181	Cacao	USA	AF097910.1	AY937447.1
<i>Clonostachys rosea</i>	MzE3C3	Papa	Argeria	MK752438.1	MK752494.1
<i>Clonostachys rosea</i>	2R2	Papa	Argeria	MK752436.1	MK752493.1
<i>Clonostachys rosea</i>	1sidE4C2	Papa	Argeria	MK752439.1	MK752495.1
<i>Clonostachys rosea</i>	2sidE3C2	Papa	Argeria	MK752440.1	MK752496.1
<i>Clonostachys rosea</i>	(5Bordj01) A	Papa	Argeria	MK752434.1	MK752492.1
<i>Clonostachys rosea</i>	HQ-10-1	<i>Astragalus membranaceus</i>	China	MZ433204.1	MZ451398.1
<i>Clonostachys rosea</i>	HQ-6	<i>Astragalus membranaceus</i>	China	MZ433200.1	MZ451395.1
<i>Clonostachys rosea</i>	HQ-4	<i>Astragalus membranaceus</i>	China	MZ433199.1	MZ451394.1
<i>Clonostachys rosea</i>	HQ-3-1	<i>Astragalus membranaceus</i>	China	MZ433198.1	MZ451393.1
<i>Clonostachys rosea</i>	DG-5-1	<i>Angelica sinensis</i>	China	MZ425507.1	MZ451389.1
<i>Clonostachys rosea</i>	Maho4	Frutas	Tailandia	MT215574.1	MT415234.1
<i>Clonostachys rosea</i>	C08-9	Aguacate	México	OM473286.1	OM715999.1
<i>Clonostachys sp</i>	YFCC 892	Genus	China	MW199070.1	MW295970.1

7.4 Preparación de materiales

7.4.1 Extracción de aceites esenciales

La recolección de las especies vegetales se llevó a cabo en tres puntos: Yaonáhuac (*Pelargonium graveolens* 177901, *Ageratina rivalis* 177884 (hoja) y *Eupatorium petiolare* Moc. 177882 (flor)); Tepeaca (*Thymus vulgaris* L. 177883 y *Litsea glaucescens* Kunth 177881) y San Andrés Cholula (*Barkleyanthus salicifolius*).

Las especies vegetales, fueron certificadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) en la UNAM, el folio de registro y fichas técnicas se muestran en los anexos. Las plantas sometidas a extracción de aceite esencial se muestran en la Figura 32. Para la extracción con el método de hidrodestilación, se utilizó 100 g. de material vegetal por cada especie para poder obtener los rendimientos. Así mismo, en la Figura 32 se observa la coloración que presenta cada aceite esencial.

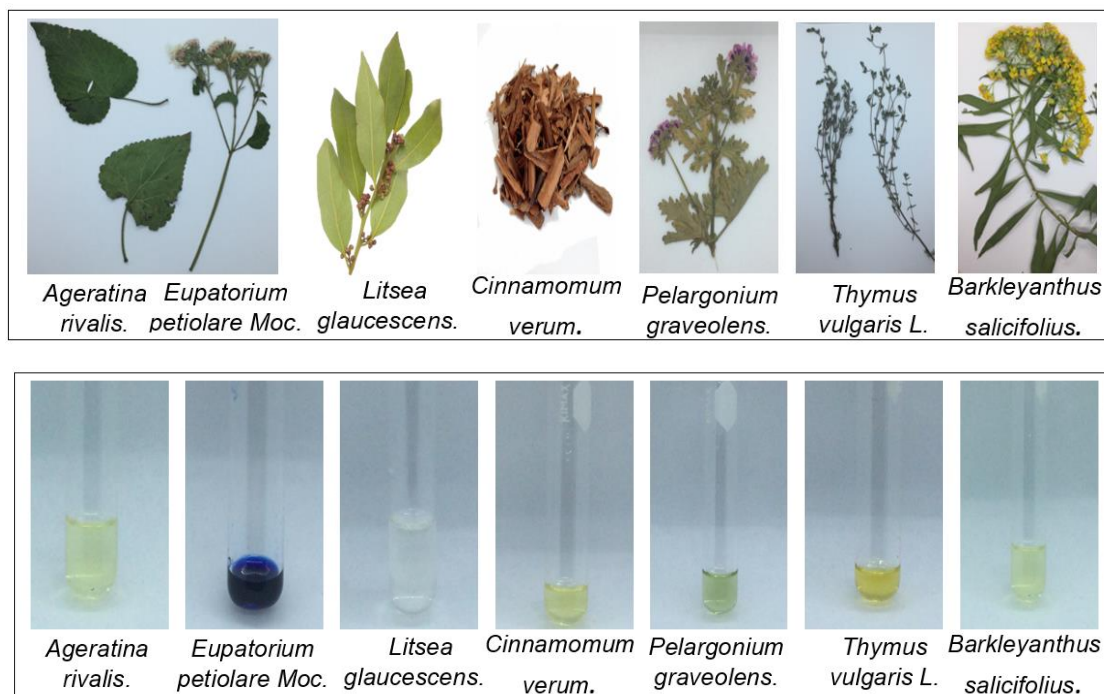


Figura 32. Coloración de cada aceite esencial extraído.

7.4.1.1 Caracterización química

La caracterización química se llevó a cabo por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas, GC-MS por sus siglas en inglés.

El análisis del aceite esencial de tomillo arrojó como componente mayoritario al compuesto timol con un 43.6% de total localizado a los 33 minutos, enseguida se encuentra el componente o-Cimeno con un 15.7% a los 18 minutos y como tercer compuesto se encuentra el gamma-Terpineno con un 12.4% localizado a los 20 minutos. En la Figura 33 se encuentra el cromatograma del análisis de este aceite que va acompañado de la Tabla 10 donde se presentan todos los compuestos que conforman el aceite esencial de tomillo. Muñoz-Acevedo *et al.* (2009) y Sellamuthu *et al.* (2013) reportaron como componente mayoritario al timol (34%) seguido de p-cimeno (17.7%) y como tercer compuesto se encontró el Gamma-Terpineno (6.8%). Si bien, el aceite esencial solo difiere en el terpeno o-cimeno y en el porcentaje de abundancia.

Coy & Eunice (2013) reportaron la presencia de 13 componentes más que en este trabajo donde su componente mayoritario es el β -pineno (29,0 %), el 1,8-cineol (21,5 %) y el o-cimeno (17,9 %). Al final esto componentes difieren por el 1,8-cineol ya que en el aceite analizado en el presente trabajo no se registró la presencia.

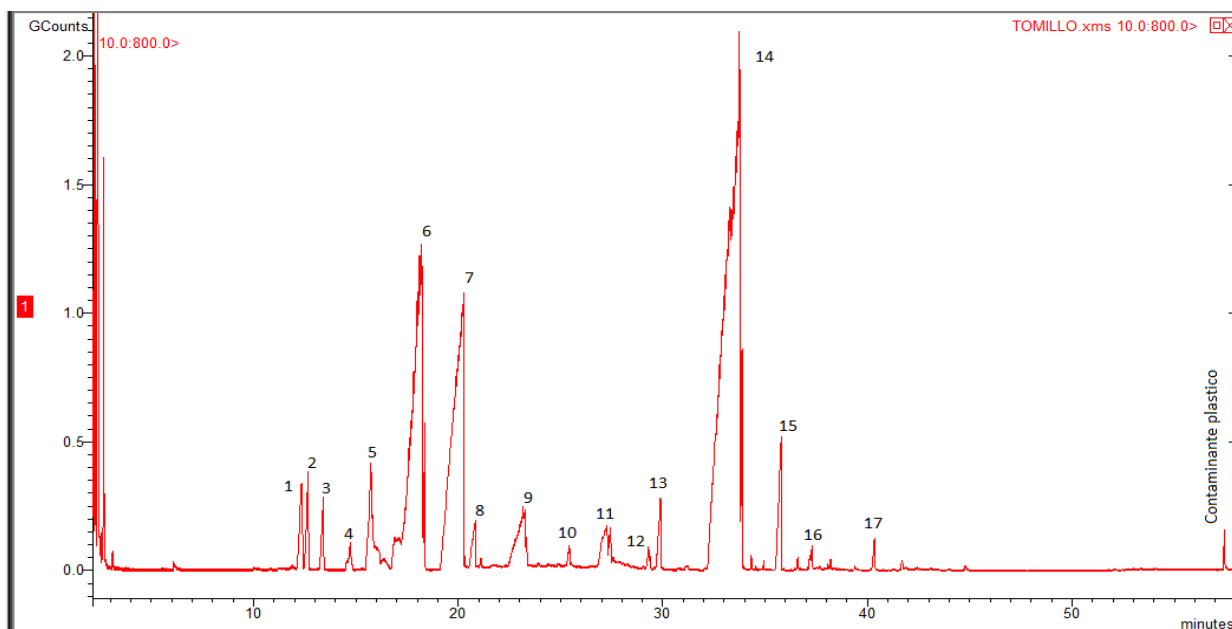


Figura 33. Cromatograma de la composición química de *Thymus vulgaris L.*

Tabla 10. Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	Alfa-Pineno	939	2.5
2	Canfeno	946	2.8
3	Beta-Pineno	974	2.1
4	Alpha-Felandreno	1002	0.5
5	(2E)-Hexenyl acetato	1010	2.9
6	o-Cimeno	1022	15.7
7	Gama-Terpineno	1054	12.4
8	Linalool	1095	1.6
9	1-Terpineol	1130	2.4
10	Canfor	1141	0.5
11	Borneol	1165	1.4
12	Alfa-Terpineol	1186	0.3
13	Timol, metil eter	1232	1.7
14	Timol	1289	43.6
15	Beta-Cubebeno	1387	3.3
16	Beta-Elemeno	1389	0.5
17	Beta-Cariofileno	1417	1.2
	TOTAL		95.4

Para *Cinnamomum verum* el principal componente mayoritario fue el cimaldehído con un 45.9 % del total de la composición presente como el décimo compuesto detectado (Figura 34) y colocada en la Tabla 11. También se encuentra 1,2,8-p-mentatriona con un 7.9% y como tercer componente mayoritario se encuentra el linalol ocupando un 6.8% y que es detectado a los 18 minutos. Otros trabajos como el reportado por Pajaro *et al.* (2017) mencionan al eugenol (59.39%) como compuesto mayoritario seguido del (E)-Cinnamaldehyde. Por otro lado, Osorio *et al.* (2017) concuerda con lo reportado en este escrito ya que como compuesto mayoritario tiene al (E)-cinnamaldehyde (89,25%) seguido del thymol (3.40%),

menthol (3.39%), linalool (2.13%) y camphor (1.13%). Sin embargo, no dejan de pertenecer al grupo de los terpenos. La mayoría de los aceites esenciales tienen principios activos y la actividad fungicida está asociada con sus fenoles monoterpénicos tales como: timol, carvacrol, aldehído, cinámico y geranio (Barrera & García, 2008).

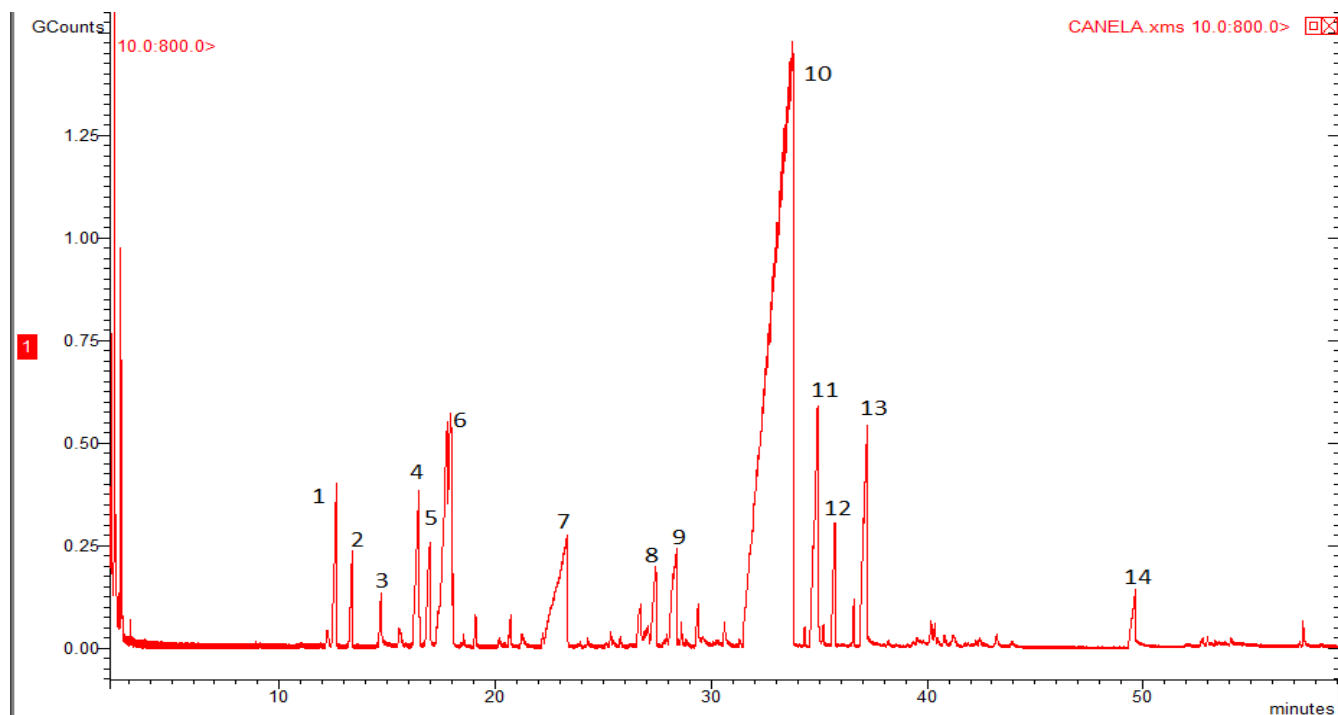


Figura 34. Cromatograma de la composición química de *Cinnamomum verum*.

Tabla 11. Composición química de *Cinnamomum verum*.

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	Alpha-Pineno	939	3.5
2	Canfeno	954	2.9
3	Beta-Pineno	979	1.7
4	Alfa-Felandreno	1002	4.1
5	Alfa-Terpineno	1017	3.5
6	Linalool	1095	6.8
7	1,3,8-p-Mentatriena	1110	7.9
8	Terpinen-4-ol	1174	1.6
9	Alfa-Terpineol	1186	2.3
10	(E)-Cinnamaldehído	1267	45.9
11	Eugenol	1356	5.5
12	(Z)-Cinnamil acetato	1389	3.6
13	Beta-Cariofileno	1436	4.7
14	Benzyl Benzoato	1760	1.8
	TOTAL		95.8

En el caso de *Pelargonium graveolens* comúnmente conocida como citronela. Su aceite esencial está compuesto por 14 compuestos de los cuales los tres compuestos mayoritarios son el geraniol con el 43.9% localizado en el pico 5 de la Figura 35 donde se presenta el cromatograma. En segundo lugar, se encuentra el citronelol con un 17.4% del total de los compuestos y finalmente en tercer lugar, está el compuesto mentona con un 9.5% el cual está localizado en el pico 2 y señalado en la Tabla 12.

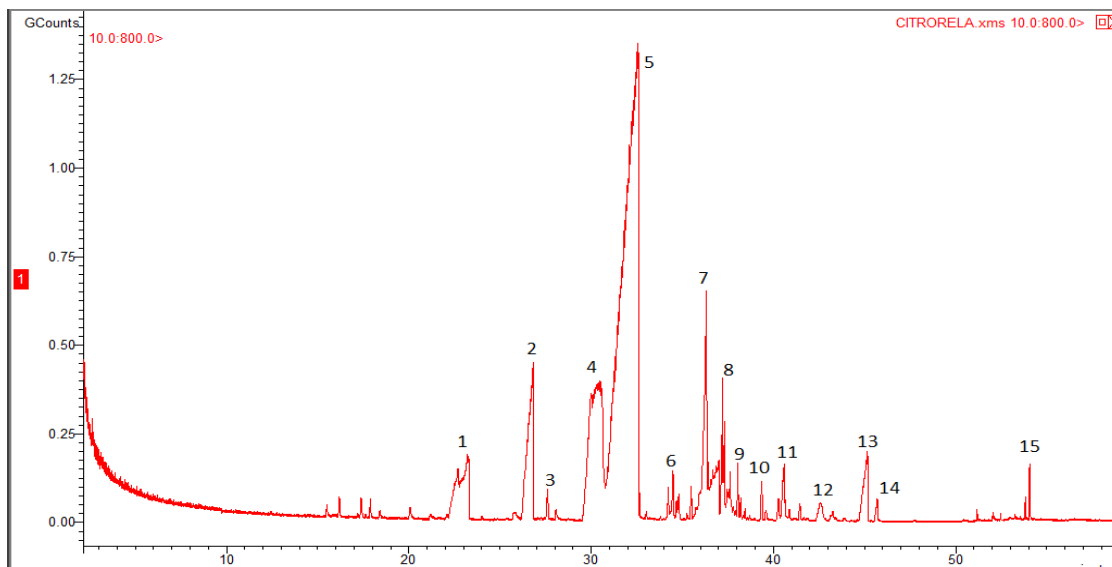


Figura 35. Cromatograma de la composición química de *Pelargonium graveolens*.

Tabla 12. Composición química de *Pelargonium graveolens*

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	Linalool	1095	6.9
2	Mentona	1148	9.5
3	Mentol	1167	1.3
4	Citronelol	1225	17.4
5	Geraniol	1252	43.9
6	Beta-Bourboneno	1388	1.6
7	Alfa-Gurjuneno	1409	7.4
8	Neryl propanoato	1454	2.7
9	Nerolidol	1532	0.7
10	Geranil acetato	1379	1.2
11	2-Phenil ethil tiglato	1584	2.2
12	Tau-cadinol	1640	0.8
13	Geranil tiglato	1696	2.5
14	(2Z,6E)-Farnesal	1715	0.5
	TOTAL		98.6

Se ha reportado el perfil químico del aceite comercial de *P. graveolens* donde se determinó la presencia de noventa y siete compuestos que representan el 99,04% del aceite total.

El componente mayoritario fue el citronelol (22,28%), seguido del geraniol (15,50%), acetato de geranio (13,13%), limoneno (9,27%), el alcohol feniletílico (5,93%) y el linalol. (5,59%) (Szutt *et al.*, 2019). A diferencia de este aceite esencial comercial contiene más componentes químicos que el descrito en este trabajo.

El análisis del aceite esencial de *Pelargonium graveolens* reportado por Kardan-Yamchi *et al.* (2020) mostró 52 componentes que representan el 99,4% de la composición del aceite. El β -citronelol (39,4%), el geraniol (23,7%) y el nerol (11,7%) fueron los principales componentes del aceite esencial, seguidos de la transmentan-3-ona (2,9%), p -mentona (2,7%), pero los componentes butirato de citronelil-n (2,6%), alcohol feniletílico (2,4%), acetato de geranio (1,5%) y óxido de rosa (1,5%) no se encontraron en la composición química del aceite analizado para este trabajo al igual que el nerol.

En la Figura 36 se muestra el cromatograma de la composición química de *Litsea glaucescens*, mejor conocido como laurel. Además, va acompañada de la Tabla 13 donde se enlistan los compuestos del aceite esencial de laurel.

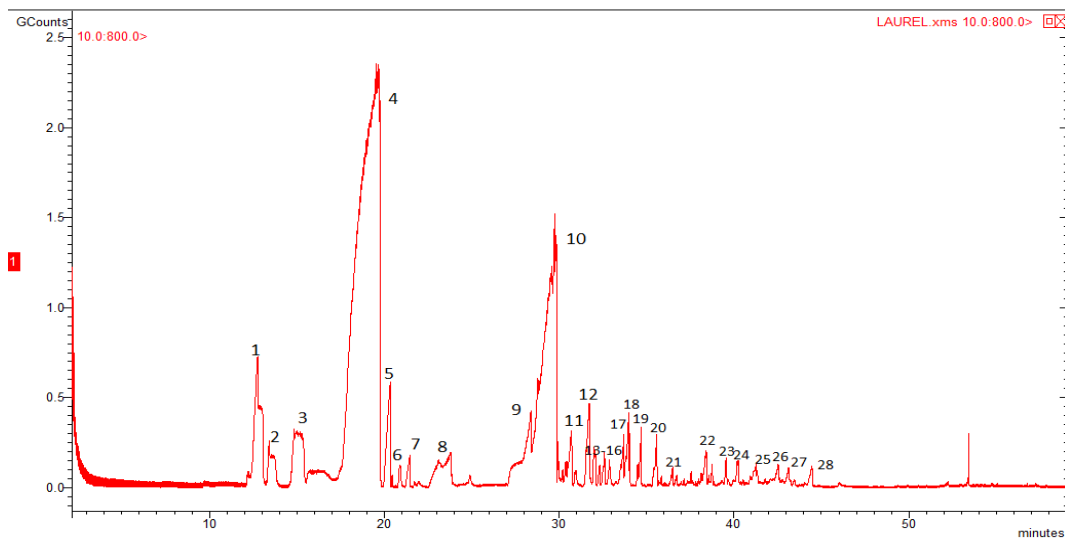


Figura 36. Cromatograma de la composición química de *Litsea glaucescens*.

El primer compuesto mayoritario se encuentra en el pico 4 y su nombre es 1,8-cineol, este conforma el 44.6% del total de los compuestos. En segundo lugar, se encuentra el dihidrocarveol con un 23.8% y fue detectado a los 29 minutos según lo observado en el pico10. El tercer compuesto mayoritario es el que se muestra en el pico uno, el α -pineno con un 5.1%. En total, este aceite esencial está formado por 28 compuestos que, en comparación con los demás aceites esenciales analizados, este es el que tiene más componentes.

Entre los componentes mayoritarios identificados, a través de la base de datos NIST, se encontraron eucaliptol (11.97%), linalool (10.35%), γ -terpineno (10.04%), β cymeno (9.40%), 2- norpineno (9.42%), (-)-terpinen-4-ol (8.42%) y (-)- β -pineno (8.06%) (Lazcano-Torres *et al.*, 2019).

Jiménez-Pérez *et al.* (2011) reportaron principalmente monoterpenos, presentando mayor contenido de eucaliptol, linalool, terpinen-4-ol y α -terpineol; además β -cymeno, α - y β -pineno; los cuales son compuestos comunes en estas especies. También, Guzmán-Gutiérrez *et al.* (2012) encontraron en el aceite de *L. glaucescens* mayor cantidad de eucaliptol y o-cymeno, seguido de otros constituyentes como limoneno, terpinen4-ol, linalool, α -, β -pineno, y γ terpineno. La mayoría de los componentes reportados por otros autores, se encuentran en la Tabla 13. Sin embargo, el aceite analizado en este trabajo tiene más componentes que los aceites esenciales que se han reportado.

Tabla 13. Composición química de *Litsea glaucescens*.

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	Alfa-Pineno	939	5.1
2	Canfeno	954	2.6
3	Beta-Pineno	979	3.1
4	1,8-Cineol	1026	44.6
5	Gama-Terpineno	1054	2.4
6	Terpinoleno	1086	0.3
7	Linalool	1095	0.5
8	1-Terpineol	1130	1.4

9	Terpinen-4-ol	1177	2.5
10	Dihidrocarveol	1193	23.8
11	Carvona	1243	0.9
12	Bornil acetato	1254	1.3
13	Trans-Carvona oxide	1276	0.3
14	neo-Isopulegil acetate	1277	0.4
15	Alil octanoato	1280	0.3
16	Safrol	1287	0.5
17	Trans-dihidro-alfa-Terpinil acetato	1300	0.7
18	Cis-Pinocaril acetato	1311	1.2
19	Geranil acetato	1379	0.9
20	Beta-Cariofileno	1408	0.9
21	Alfa -Humuleno	1452	0.3
22	Isobornil n-butanoato	1473	0.5
23	Alfa-Muuroleno	1500	0.4
24	(Z)-Nerolidol	1531	0.4
25	Caryofileno oxide	1582	0.4
26	Sesquiteriferol	1604	0.3
27	(Z)-Lanceol	1760	0.5
28	Butyl dodecanoato	1786	0.6
	TOTAL		97.1

El aceite esencial de *Ageratina rivalis* (hoja) es el segundo con más compuestos. Estos son 22 compuestos que son enlistados en la Tabla 14 en base al cromatograma que se presenta en la Figura 37. El primer componente mayoritario es el que está ubicado en el pico 22 y fue detectado a los 52 minutos, se trata de procerina con un 28.3%. En segundo lugar, se encuentra el α -felandreno ubicado en el pico 4 y finalmente está el pico 13 cuyo compuesto es el cedreno con un 5.7%.

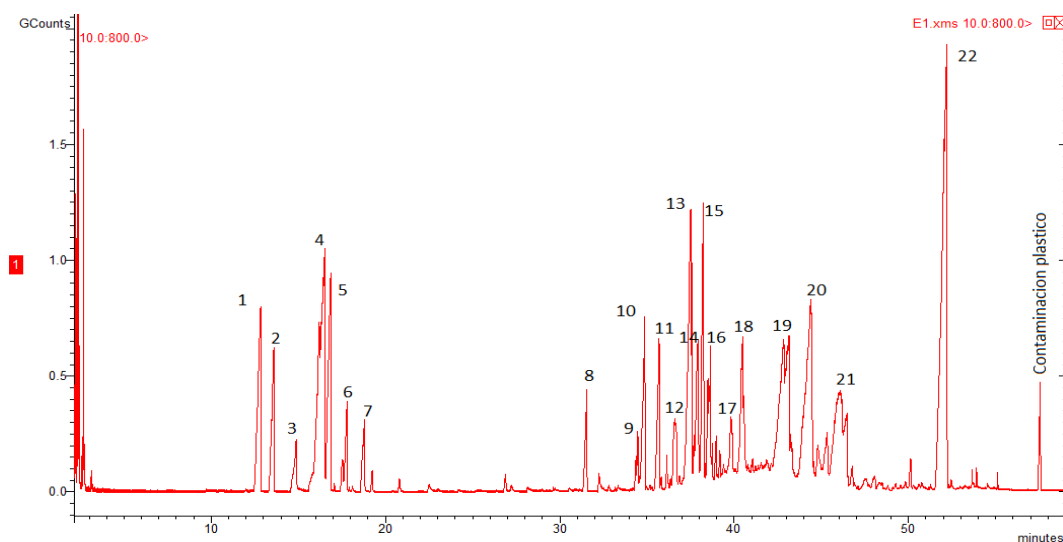


Figura 37. Cromatograma de la composición química de *Ageratina rivalis* (hoja).

Tabla 14. Composición química de *Ageratina rivalis* (hoja).

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	Alfa-Pineno	939	2.3
2	Canfeno	954	2.8
3	Beta-Pineno	979	1.2
4	Alfa-Felandreno	1002	6.1
5	Alfa-Terpineno	1017	3.8
6	Limoneno	1024	2.5
7	(E)-Beta-Ocimeno	1044	2.2
8	Bornil acetato	1254	2.7
9	Beta-Bourboneno	1387	1.9
10	Beta-Elemeno	1389	3.5
11	Beta-Cariofileno	1408	2.1
12	Beta-Farneseno	1440	1.2
13	Cedrano	1441	5.7
14	Gamma-Muuroleno	1479	3.1
15	Beta-Selineno	1490	3.9
16	Beta-Bisaboleno	1505	1.4
17	Germacreno D-4-ol	1574	1.9

18	1-epi-Cubenol	1627	2.7
19	Epi-Alfa-Cadinol	1638	3.8
20	(Z)-Lanceol	1760	4.4
21	14-hidroxi-alfa-Muuroleno	1780	5.4
22	Procerina	1931	28.3
	TOTAL		92.9

En la Tabla 15 se enlistan los componentes del perfil químico de *Eupatorium petiolare* (flor) con base en el cromatograma de la Figura 38. Este aceite esencial tiene 14 compuestos, de los cuales el compuesto mayoritario es α -cedreno ubicado en el pico 5 con un 33.7% de total de compuestos. En segundo lugar, se encuentra β -cubebeno con un 20.8% y finalmente está el compuesto bornil-acetato ubicado en el pico 3 y conforma el 7.3% del total de los componentes.

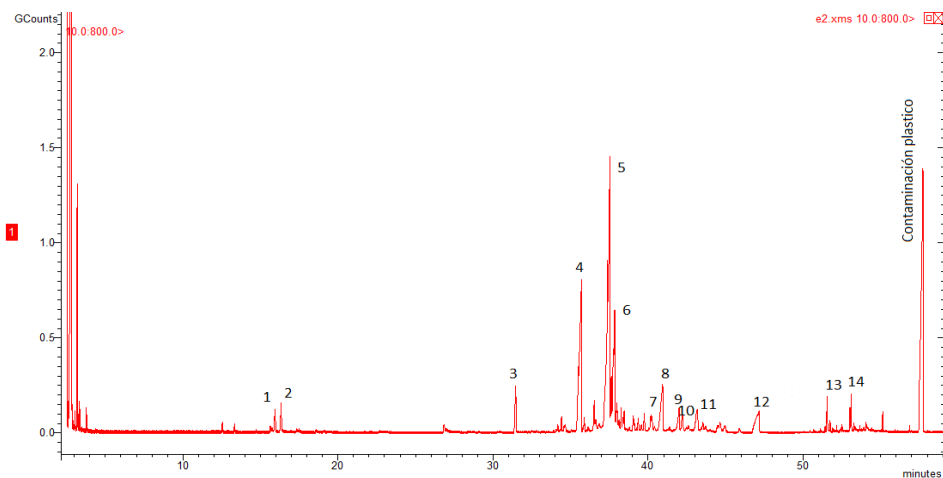


Figura 38. Cromatograma de la composición química de *Eupatorium petiolare* (flor).

Tabla 15. Composición química de *Eupatorium petiolare* (flor).

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	Triciclano	921	2.5
2	Alfa-Thujeno	924	3.6
3	Bornil acetato	1254	7.3
4	Beta-Cubebeno	1387	20.8
5	Alfa-Cedreno	1410	33.7

6	Alfa-Santaleno	1416	1.2
7	Elemol	1548	6.2
8	Saptulenol	1577	7.2
9	Globulol	1590	2.4
10	Guaiol	1600	2.1
11	1-epi-Cubenol	1627	1.1
12	Camazuleno	1731	2.4
13	(E)-Nuciferol	1756	2.6
14	Procerina	1931	1.2
	TOTAL		94.3

En el caso de *Barkleyanthus salicifolius* conocido como azomiate. Este aceite esencial comúnmente utilizado para remedios medicinales conste de 17 compuestos enlistados en la Tabla 16. El principal compuesto mayoritario es el epóxido de aromadendreno ubicado en el pico 12 del cromatograma en la Figura 39. Enseguida, se encuentra el Tau-murulol con un 7.7% y como tercer compuesto mayoritario, está localizado en el pico 6 se encuentra el α -farneseno.

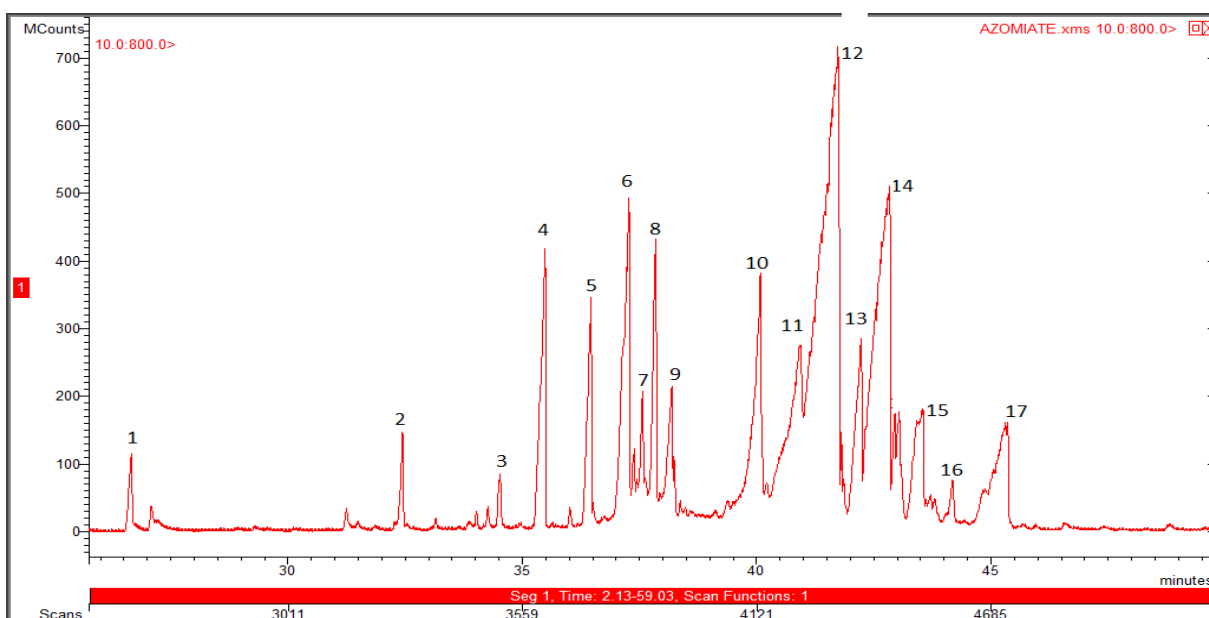


Figura 39. Cromatograma de la composición química de *Barkleyanthus salicifolius*.

Tabla 16. Composición química de *Barkleyanthus salicifolius*.

Pico	Nombre	IR	Abundancia (%)
1	1,3,5-Undecatrieno, (E,Z)-	1170	1.7
2	Beta-Cubebeno	1387	2.5
3	beta-Elemeno	1389	0.7
4	γ-Elemeno	1434	5.8
5	Beta-Cariofileno	1436	3.6
6	Alfa farneseno	1440	6.2
7	3-Buten-2-one,4-(2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexil)	1494	2.7
8	delta-Cadineno	1522	3.9
9	Nerolidol	1531	5.6
10	Elemol	1548	2.8
11	Carotol	1594	1.9
12	Epóxido de Aromadendreno	1639	37.6
13	Tau-cadinol	1640	2.1
14	Tau-Muurolol	1642	7.7
15	Cubenol	1645	2.3
16	Amil cinnamaldehido	1649	0.9
17	Sesquicineole-2-one	1702	4.3
	TOTAL		92.3

7.4.1.2 Obtención de rendimientos

Empleando la fórmula antes descrita en la siguiente Tabla 17 se observa la obtención de aceite esencial de cada especie vegetal por cada 100 gramos. Además, en la Figura 40 se aprecia una comparación en cuanto al porcentaje de rendimiento que cada aceite esencial.

Tabla 17. Porcentaje del rendimiento de cada aceite esencial.

Nombre científico	Nombre común	gr. AE	%RAE
<i>Thymus vulgaris L.</i>	Tomillo	9.696	0.22889518
<i>Cinnamomum verum</i>	Canela	8.269	0.32452904
<i>Pelargonium graveolens.</i>	Citronela	3.9996	1.2537931
<i>Litsea glaucescens Kunth.</i>	Laurel	0.588	0.41702128
<i>Ageratina rivalis.</i>	E1(hoja)	0.309	0.09307229
<i>Eupatorium petiolare Moc.</i>	E2(flora)	0.516	0.17793103
<i>Barkleyanthus salicifolius.</i>	Azomite	1.895	0.21907514

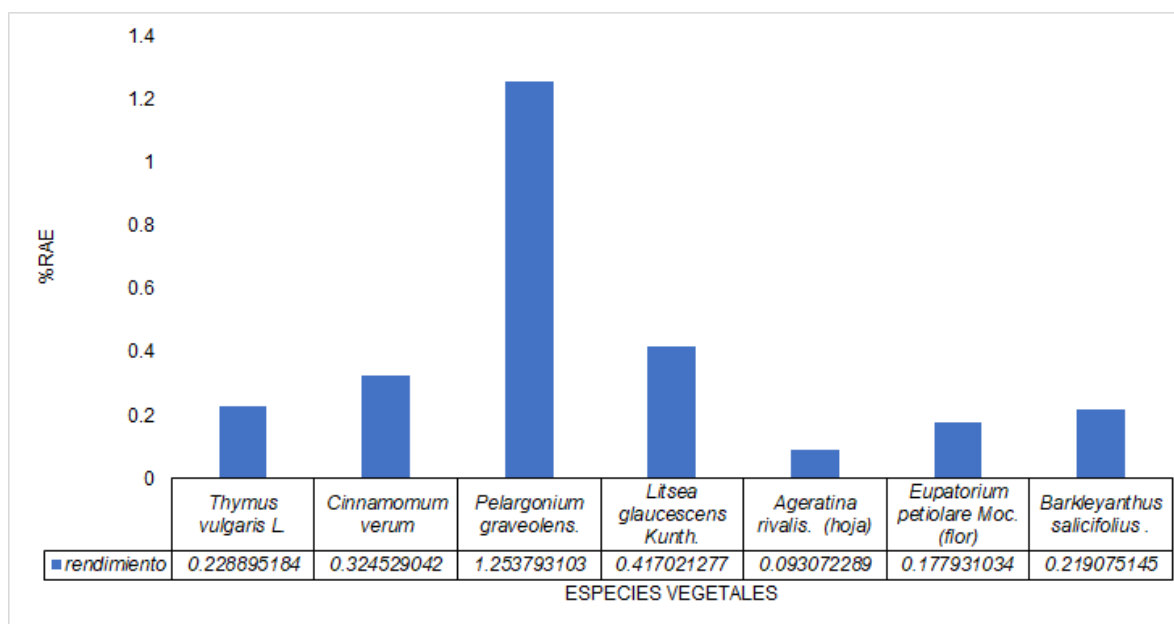


Figura 40. Comparación de los porcentajes de rendimiento de las especies vegetales.

En base al resultado del rendimiento de aceite esencial de *Thymus vulgaris* tuvo un rendimiento de 0.229 %. Este aceite esencial se le han atribuido propiedades por su acción anti-espasmódica, antitusiva, antimicrobiana, antifúngica y propiedades antioxidantes como lo menciona Guerrero-Lagunes *et al.*, (2011).

En cambio, para aceites esenciales como el de *Ageratina rivalis* (hoja), *Eupatorium petiolare* Moc (flor) y *Barkleyanthus salicifolius* su rendimiento es bajo comparado con los otros aceites esenciales extraídos de las especies vegetales. Normalmente las destilaciones por arrastre de vapor duran alrededor de 3 horas o más horas según la hierba que se trate, obteniéndose muy poca cantidad de esencia. Esto se debe a que el contenido en aceites de las plantas es bajo, y por ello se requiere destilar grandes cantidades de especies vegetales para obtener un volumen que justifique el gasto de destilación. En dicho caso, los rendimientos suelen ser menores al 1%, es decir destilando 100 kg. de hierba fresca, obtendremos menos de 1 kg. de aceite esencial.

Para las especies vegetales *Litsea glaucescens* Kunth, *Cinnamomum verum* comparadas con *Pelargonium graveolens*, el rendimiento es muy bajo. En la Figura 40 se puede observar que la especie vegetal que tiene mejor rendimiento comparado con las demás especies es *Pelargonium graveolens* (citronela).

7.5 Evaluación de materiales *in vitro*

7.5.1 Técnica de microdilución en caldo

En primera instancia se prepararon las soluciones stock donde se agregan 100µL de aceite esencial en 900 µL de etanol absoluto obteniendo las concentraciones que se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Concentraciones de las soluciones stock.

Nombre científico	Nombre común	mg/mL
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomillo	91.889
<i>Cinnamomum verum</i>	Canela	83.667
<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér. ex Aiton.	Citronela	53.222
<i>Litsea glaucescens</i> Kunth.	Laurel	89.778
<i>Ageratina rivalis</i> (Greenm.) King & Rob. (hoja)	E1(hoja)	68.111
<i>Eupatorium petiolare</i> Moc. ex DC (flor)	E2(flora)	64.111
<i>Barkleyanthus salicifolius</i> (Kunth) H. Rob. & Brettell.	Azomite	99.778

La evaluación de estos aceites consta en primer lugar de hacer pruebas preliminares. En estas pruebas preliminares se adicionaron 2 μL , 10 μL y 20 μL de la solución stock y cuyas concentraciones de aceite contenido en el pozo se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Concentración de la solución stock en 300 μL .

Aceite esencial	2 μL	10 μL	20 μL
Tomillo	0.427 mg/mL	2.137 mg/mL	4.274 mg/mL
Canela	0.599 mg/mL	2.993 mg/mL	5.985 mg/mL
Citronela	0.454 mg/mL	2.270 mg/mL	4.541 mg/mL
Laurel	0.355 mg/mL	1.774 mg/mL	3.548 mg/mL
E1	0.613 mg/mL	3.063 mg/mL	6.126 mg/mL
E2	0.558 mg/mL	2.789 mg/mL	5.578 mg/mL
Azomite	0.665 mg/mL	3.326 mg/mL	6.652 mg/mL

Se realizaron los cálculos para el control positivo (medio de cultivo PDB y disco de agar con micelio), control negativo (medio de cultivo PDB y la concentración máxima de aceite esencial), para 2 μL (288 μL de medio cultivo PDB y 2 μL de solución stock de aceite esencial), 10 μL (280 μL de medio de cultivo PDB y 10 μL de solución stock de aceite esencial) y para 20 μL (270 μL de medio de cultivo PDB y 20 μL de la solución stock de aceite esencial). Una vez llenado la placa se incubó a 27 °C por 24 horas para posteriormente agregar el indicador de viabilidad (resazurina) y se incubó por 24 horas más. Se hizo la lectura a 630 nm y se continuó con el cálculo del porcentaje de inhibición de la cual se obtuvieron los resultados de la Tabla 20 añadiendo la Figura 41 donde se muestra la coloración de los pozos por aceite esencial y concentración evaluada.

	W1	W2	W3	W6	W7
Controles (+, -)					
µL	2 10 20	2 10 20	2 10 20	2 10 20	2 10 20
Tomillo					
Canela					
Citronela					
E1					
E2					
Laurel					
Azomite					

Figura 41. Resultados de las pruebas preliminares de las cinco cepas seleccionadas.

Tabla 20. Concentraciones de aceite esencial con el porcentaje de inhibición del 100%.

	Tomillo	Canela	Citronela
<i>Fusarium verticillioides</i>		2.993±0.061 mg/mL	
<i>Fusarium solani</i>	2.137±0.042 mg/mL		
<i>Clonostachys rosea</i> (W3)	2.137 ±0.110 mg/mL	2.993±0.053 mg/mL	4.541±0.075 mg/mL
<i>Clonostachys rosea</i> (W6)	2.137 ±0.470 mg/mL	2.993±0.082 mg/mL	
<i>Clonostachys rosea</i> (W7)	2.137 ±0.002 mg/mL	2.993±0.053 mg/mL	4.541±0.102 mg/mL

Las casillas que están vacías en la Tabla 20, se debe a que la máxima concentración que se utilizó no fue suficiente para inhibir el crecimiento de hongo fitopatógeno o

en su defecto no tiene actividad antimicrobiana. Tal es el caso de la cepa W3 y W7 contra la máxima concentración de aceite esencial de laurel que no logró inhibir totalmente el crecimiento por lo cual se debería aumentar la concentración para lograr que no hay actividad antimicrobiana. Por otro lado, cuando el indicador vira a color rosa significa que hay actividad microbiana, pero en algunos ensayos preliminares el indicador se degradó aún más por lo que el color era más claro lo que puede indicar que el microorganismo tiene la capacidad de degradarlo generando otro compuesto. Cuando el indicador de viabilidad se torna en un color rosa la resazurina pasa a reducirse a resorufina. Pero hay casos donde el microorganismo es capaz de reducirlo aún más lo cual se genera dihidroresorufina.

F. verticillioides expuesto al aceite esencial de canela elimina por completo su desarrollo siendo así la MIC de 2.993 ± 0.061 mg/mL. Como componente importante, el cinamaldehído actúa inhibiendo la producción de enzimas intracelulares tales como las amilasas y proteasas lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular. Además, al exponer esta cepa frente a los demás aceites analizados no se tiene respuesta alguna del bloqueo de su desarrollo por lo tanto la actividad antimicrobiana de los demás aceites esenciales es nula.

Roselló *et al.*, (2015) reportaron que en la prueba *in vitro*, los aceites esenciales de canela, clavo y orégano redujeron el crecimiento de *F. verticillioides* en casi un 100%, siendo el orégano el aceite esencial más eficaz para inhibir el crecimiento de este. Además, para complementar estos resultados, realizaron la evaluación *in vivo*. Revelando que el efecto del aceite esencial de orégano sobre el desarrollo de este en granos de arroz inoculados demostró su efectividad.

Se ha reportado el uso de aceites esenciales extraídos de la hoja de canela, clavo de olor, orégano, hierba de limón y palmarosa (Velluti *et al.*, 2004) que inhiben el crecimiento de este hongo. También el uso de especies como *Zataria multiflora*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare*, *Pinaceae* y *Heracleum persicum* para extraer aceites esenciales y obtener una alta actividad antifúngica e inhibición de crecimiento micelial (Naeini *et al.*, 2010).

Para el hongo *F. moniliforme*, Medina-Romero *et al.*, (2021) evaluaron cuatro concentraciones de prueba (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 $\mu\text{L} / \text{mL}$) de aceite de *L. graveolens* mostraron una inhibición del crecimiento significativa del 98%.

Para el caso de W2 (*F. solani*) en la Figura 39 se observa que el aceite esencial de tomillo con una concentración de $2.137 \pm 0.042 \text{mg/mL}$ inhibe el 100% de la actividad microbiana. Además, cabe destacar que si se aumenta tan solo un poco la concentración del aceite esencial de canela y citronela también se lograra inhibir totalmente la actividad de este hongo.

Zaker (2014) concluyó que el extracto metanólico de hojas de *Artemisia annua* al 15%, es capaz de inhibir el crecimiento de *F. solani*. Rodríguez-Castro *et al.*, (2020) también probó que el extracto metanólico en solución con *Larrea tridentata* es efectivo para inhibir totalmente el crecimiento de *F. solani* hasta por diez días. Mientras que el extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* se puede usar para el manejo de este hongo con menor efectividad que el de *Larrea tridentata*.

Otro reporte menciona que *F. solani*, tuvo una inhibición superior al 60% a una concentración de 0.5 $\mu\text{L/mL}$ de aceite de *B. morelensis* de igual manera se aumentó la concentración de aceite a 4 $\mu\text{L/mL}$ para poder alcanzar al menos un 85% de inhibición. También evaluaron el aceite de *L. graveolens* resultando una inhibición superior al 75% a una concentración de 0.5 $\mu\text{L/mL}$ (Medina-Romero *et al.*, 2021).

La inhibición del crecimiento de *F. solani* con la presencia de aceites esenciales puede deberse a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes inherentes, que provocan la despolarización de las membranas mitocondriales, lo que disminuye el potencial de membrana, afectando los canales iónicos, reduciendo el gradiente de pH y que a la vez afecta al protón. Como resultado de todos estos procesos, hay un cambio en la fluidez de la membrana que hacen que las membranas se vuelvan anormalmente permeables, lo que provoca la fuga de radicales, citocromo c, iones de calcio y proteínas, como en el caso del estrés oxidativo y la insuficiencia bioenergética.

En cuanto a las cepas W3, W6 y W7 que pertenecen a *Clonostachys rosea*, la canela nuevamente aparece como una buena opción para inhibir el crecimiento ya que la concentración que inhibe el 100% del crecimiento es de $2.993 \pm 0.053 \text{mg/mL}$.

Sin embargo, los aceites esenciales de tomillo y citronela (W3 y W7) también inhiben el 100% de la actividad microbiana con 2.137 ± 0.110 mg/mL y 4.541 ± 0.075 mg/mL respectivamente.

Si bien, la información que se tienen acerca de esta cepa es que es un microorganismo antagonista (control biológico) y que solo hay dos reportes en todo el mundo donde *C. rosea* se comporta como microorganismo patógeno en plantas de haba y en raíz de soja. Respecto al control de este microorganismo como patógeno no hay referencias en frutos de aguacate.

Los aceites esenciales reducen o inhiben completamente la producción de conidios debido a los compuestos presentes en ellos, como terpenos, alcoholes, fenoles y cetonas (Kadogliou *et al.*, 2011). A nivel celular se conoce que, para entrar en la pared celular, los grupos hidroxilo interfieren con los lípidos de la membrana y generan cambios bioquímicos en el gradiente, el pH y los electrolitos. Debido a estos cambios, la adaptación de los hongos durante la colonización de frutas y verduras, particularmente durante la fase de germinación, se ve fuertemente afectada.

Los aceites esenciales afectan el crecimiento del micelio y la germinación de los conidios al disminuir la producción de ergosterol, que es el principal componente de esteroides de la membrana celular de los hongos y juega un papel vital en el mantenimiento de la función e integridad celular. La disminución del contenido de ergosterol conduce a un desequilibrio en la permeabilidad celular y la ruptura de los orgánulos celulares. También hay una fuga significativa de iones celulares vitales (Ca^{2+} , K^{1+} y Mg^{2+}), deformación en los conidióforos y depresiones notables en los conidios (Sachar *et al.*, 2016).

Al final de todo, los aceites esenciales tienen muchas ventajas ya que son agentes antimicóticos naturales, seguros, ecológicos, rentables, renovables y fácilmente biodegradables para la conservación de alimentos (Pandey *et al.*, 2017).

7.5.2 Evaluación de las arcillas

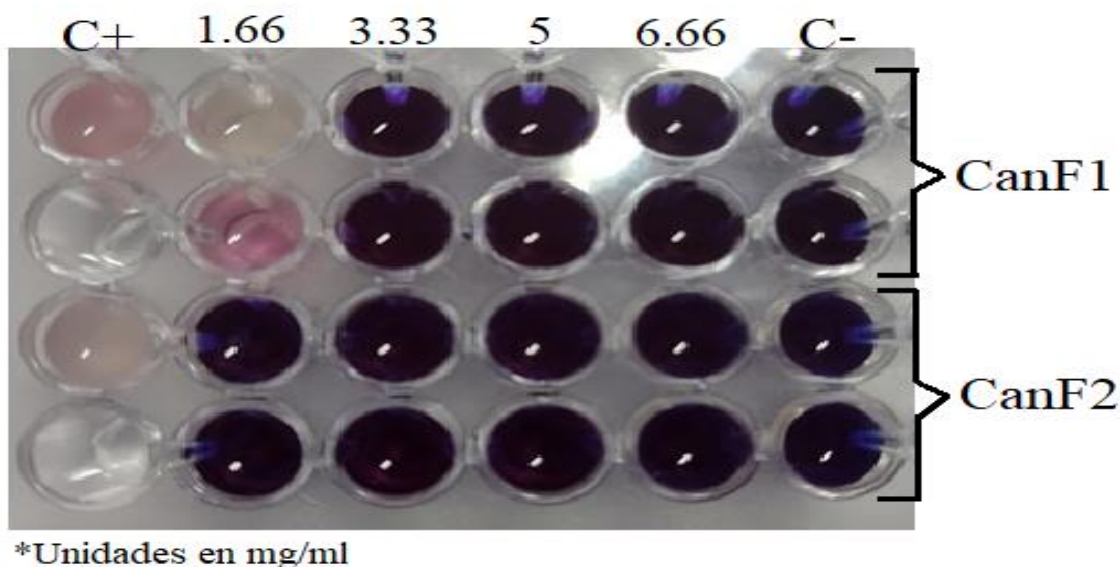


Figura 42. Resultados de las microdiluciones de hidrotalcitas con aceite esencial de canela vs *C. rosea*.

Los resultados de la evaluación de las arcillas (Figura 42) demuestra que ambas son efectivas contra el crecimiento de *Clonostachys rosea* en diferente concentración. Por otro lado, la halloysita Can-F1 tiene una concentración mínima inhibitoria de 3.33 mg/mL, la hidrotalcita Can-F2 tiene una concentración más baja, es decir, su concentración mínima inhibitoria es de 1.66 mg/mL.

Sin embargo, se hicieron experimentos en lentes de contacto suave que indican que tanto la halloysita Can-F1 (Figura 43A) como hidrotalcita Can-F2 (Figura 43B) son efectivas en el crecimiento de *Clonostachys rosea*. Para corroborar esto, se observaron en microscópico electrónico de barrido a 20X (Figura 44 y 45) donde se observa claramente la germinación de conidios en el control positivo mientras que en los tratamientos se observan conidios sin germinar.



Figura 43. Evaluación de arcillas en lentes de contacto suaves contra *C. rosea* A. Halloysita Can-F1, B. Hidrotalcita Can-F2.

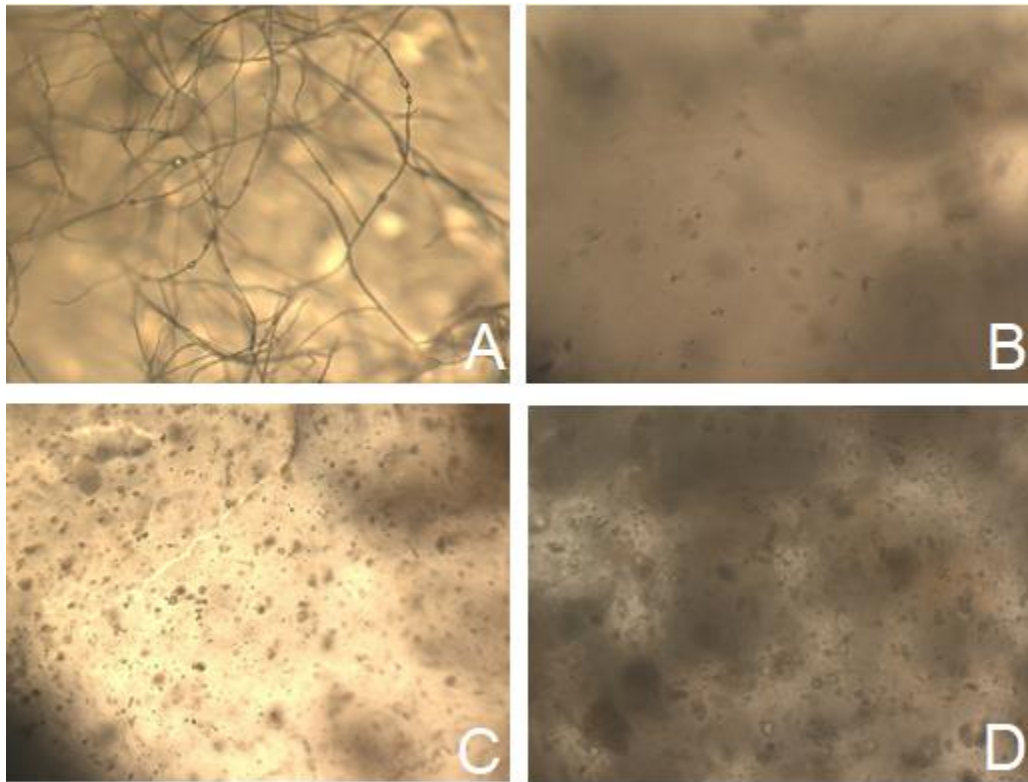


Figura 44. Resultados Can-F1; A. Control positivo, B. 0.2 mg, C. 0.4 mg, D.0.6 mg.

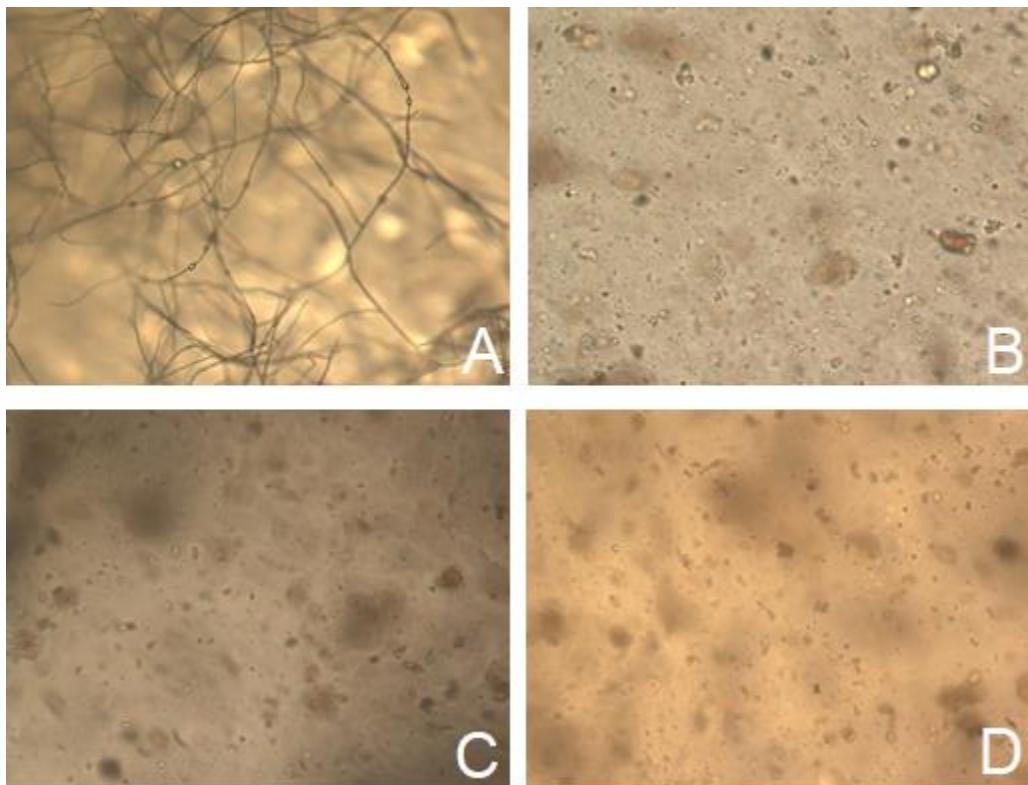


Figura 45. Resultados Can-F2; A. Control positivo, B. 0.2 mg, C. 0.4 mg, D.0.6 mg.

7.5.2.1 Difracción de rayos X

Este método es para el análisis de muestras cristalinas, cuyo fundamento es caracterizar la estructura cristalina que posee la muestra. Esto se lleva a cabo cuando la muestra se calienta o enfría en una atmosfera definida.

El difractograma de las muestras de las arcillas se realizó mediante una radiación de rayos X con una longitud de onda de 1.54060 Å (CuK α 1). La Figura 46 presenta los difractogramas correspondientes a la halloysita y halloysita impregnada con aceite esencial de canela. Ambas muestras mostraron picos bien definidos cuyos índices de Miller (001) y (002) se encontraron a 12 y 20° 2 θ , respectivamente, que son característicos de los planos cristalinos que se atribuyen a la halloysita. No obstante, en ambas muestras se observa la presencia de una impureza a 26° (2 θ), la cual corresponde, de acuerdo con el patrón de difracción 00-005-0490, a un SiO₂ que se conoce como cuarzo, el cual se encuentra en los yacimientos naturales junto a la halloysita. Por otro lado, se observa que el proceso de impregnación con el aceite esencial de canela no modificó la estructura original de la halloysita, demostrando que el proceso empleado es adecuado para la generación de materiales híbridos.

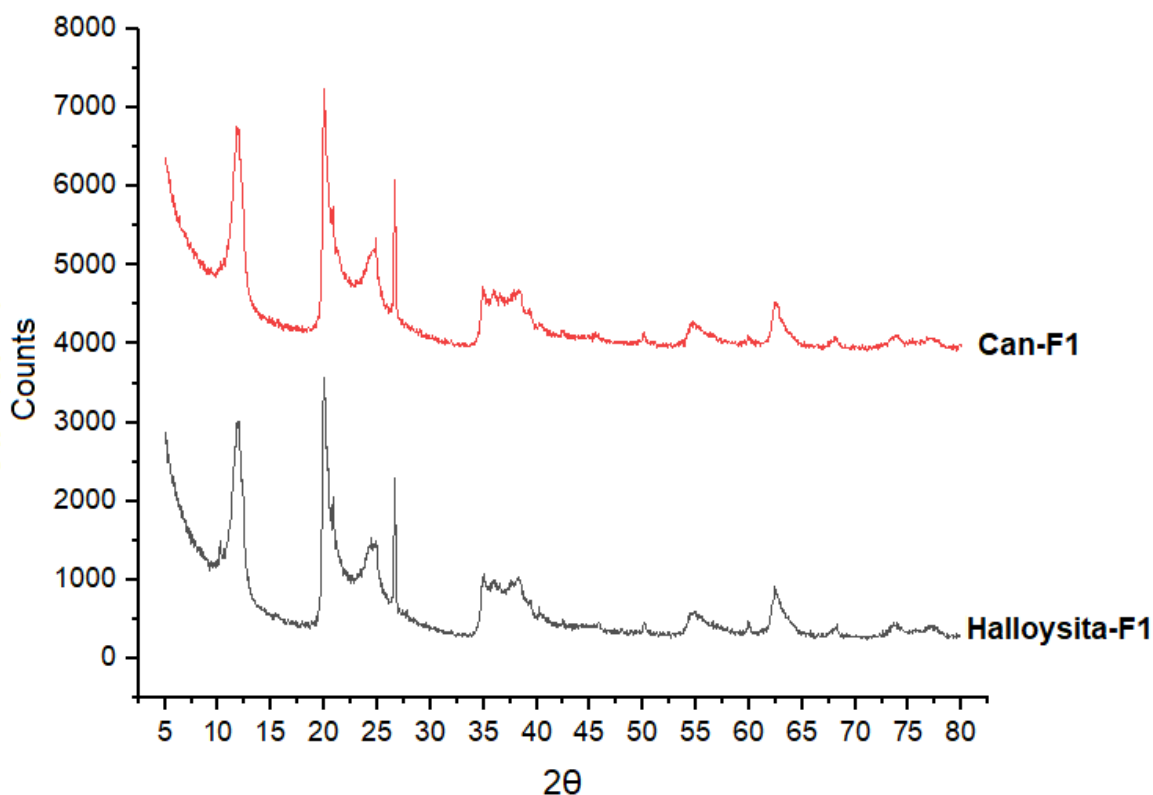


Figura 46. Difractograma de la halloysita y de la halloysita impregnada con aceite de canela Can-F1.

En la Figura 47 se observan los difractogramas de la hidrotalcita y la hidrotalcita impregnada con aceite esencial de canela (Can-F2). En ambas muestras se identificaron los planos cristalinicos característicos de los materiales tipo hidrotalcita, de acuerdo con el patrón de difracción JPDS 014–0191, a 10, 20, 30, 34, 61 y 62° 2θ, que corresponden a los índices de Miller (003), (006), (009), (012), (110) y (113), respectivamente. Del plano (003) se obtiene la distancia interplanar, cuyo valor es de 8.7 Å, lo cual se atribuye a la presencia de nitratos como aniones interlaminares, similar a lo reportado por Cruz-Hernández et al., (2020) para hidrotalcitas impregnadas con moléculas orgánicas como la melanina. Por otro lado, la hidrotalcita impregnada con aceite esencial de canela presentó un hombro en el plano (003), cuya distancia interplanar es de 7.7 Å, lo cual se atribuye a la presencia de aniones carbonato en el espacio interlaminares. Estos resultados indican que el proceso de impregnación no modificó la estructura interna de las muestras de

hidrotalcita, no obstante, propició el intercambio de aniones carbonato en el espacio interlaminar.

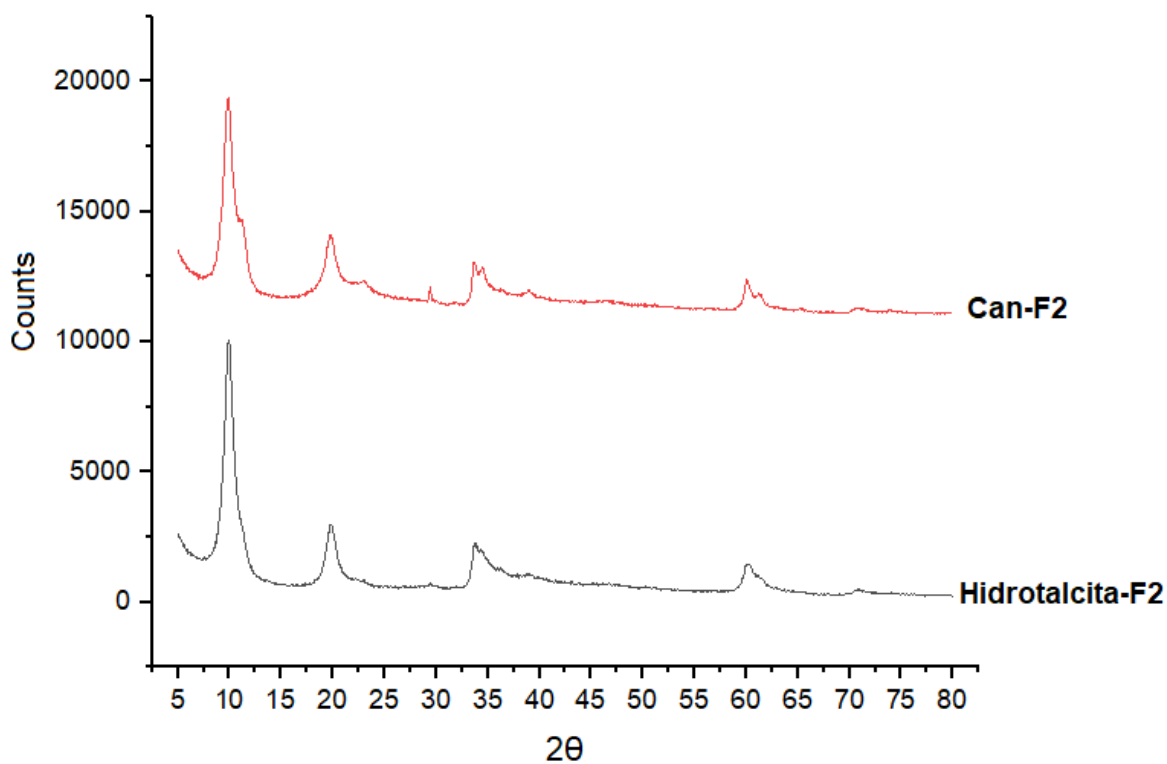


Figura 47. Difractograma de la hidrotalcita Can-F2.

7.5.2.2 TGA/DSC

Esta técnica determina la masa de una muestra cuando se calienta, se enfría o se mantiene a temperatura constante.

La Figura 48 muestra el análisis termogravimétrico de la halloysita (F1) y halloysita impregnada con aceite esencial de canela (CANF1). Ambas muestras presentan una pérdida de masa del 7% en temperaturas entre 30 y 170 °C. En temperaturas entre 170 y 600°C, la halloysita presenta una segunda etapa de pérdida de masa de 17%, mientras que la halloysita impregnada con aceite de canela presentó una segunda etapa de pérdida de masa de 9%. Con estos resultados se puede observar que la pérdida de masa de la halloysita impregnada con aceite esencial de canela es menor que la halloysita natural, esto puede deberse a que el aceite retiene parcialmente las moléculas de agua al inicio del proceso, no obstante, mantiene

estable a todo el material durante todo el análisis, en comparación con la muestra de halloysita sola.

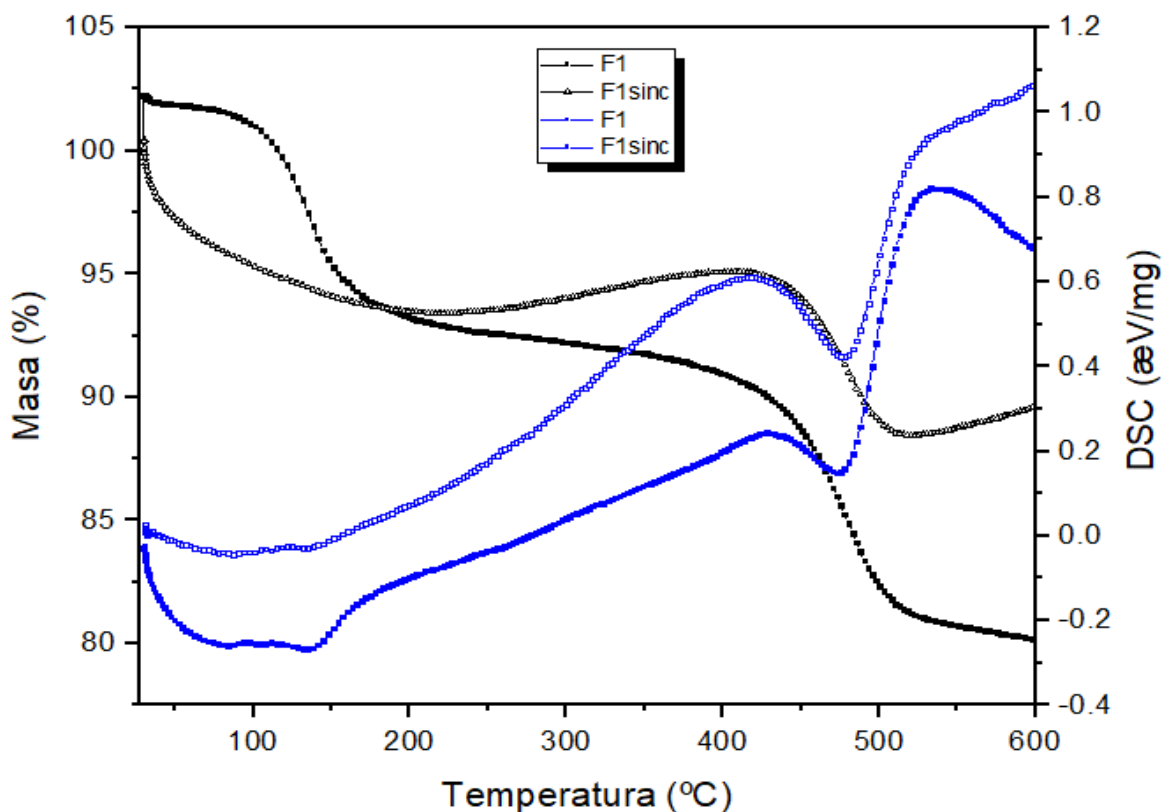


Figura 48. Curvas TGA/DSC de Can-F1

Por otra parte, en la Figura 49 se observa las curvas de pérdida de masa de la hidrotalcita (F2sinc) y la hidrotalcita impregnada con aceite esencial de canela (CANF2). En la hidrotalcita impregnada con aceite de canela se observan dos etapas de pérdida de masa, la primera con una pérdida de 43% en temperaturas entre 30 y 160°C; la segunda etapa con una pérdida de masa de 15% entre temperaturas de 170 y 600°C. Por otro lado, en la muestra de hidrotalcita sola, se observan tres etapas de pérdida de masa, la primera con una pérdida de 25% en temperaturas entre 30 y 240°C, la segunda etapa presentó una pérdida de masa de 5% en temperaturas entre 240 y 320°C; finalmente, la tercera etapa presentó una pérdida de 5% en temperaturas entre 320 y 600°C. En este caso, se observa que el contenido de aceite esencial de canela es mayor que en la halloysita (30%),

mostrando que la hidrotalcita es más afín a los compuestos orgánicos del aceite de canela.

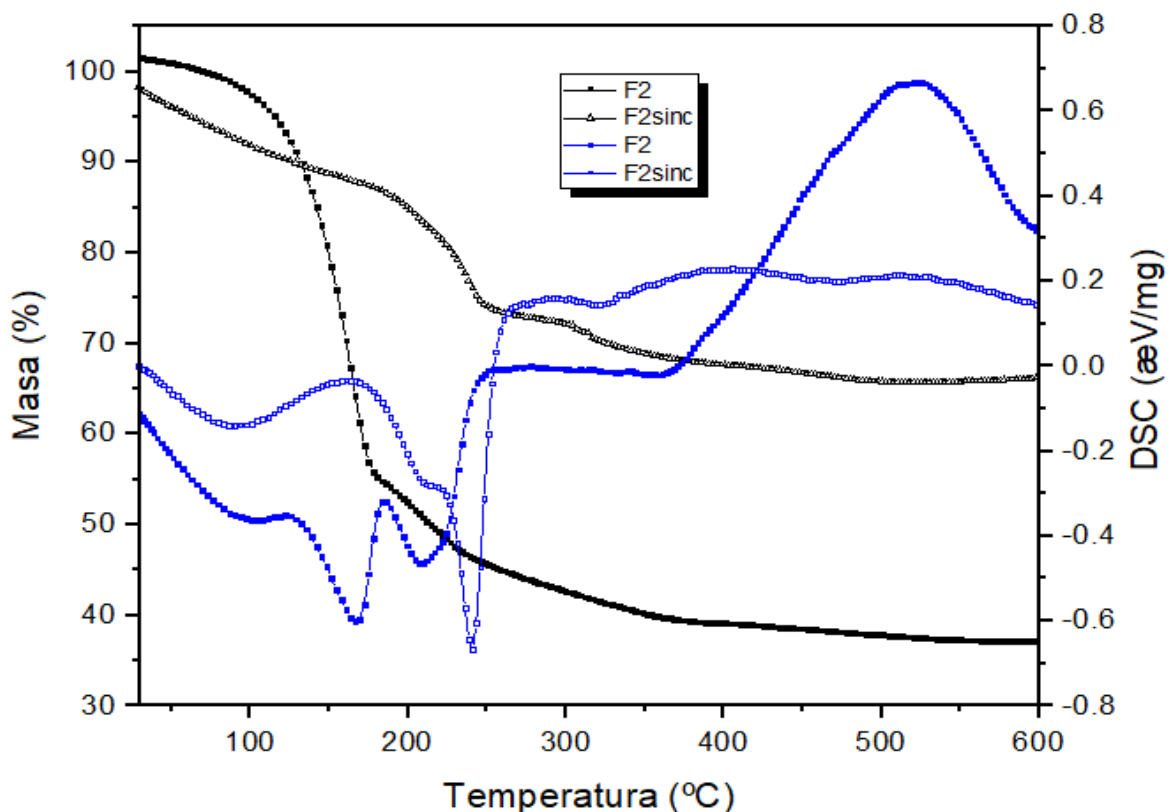


Figura 49. Curvas TGA/DSC de Can-F2

7.5.3 Elaboración de biopelículas

En la Figura 50, se observan las películas de quitosano con aceite esencial de tomillo y en la Figura 51 se encuentran las películas de quitosano con aceite esencial de canela. Se puede observar que conforme aumenta la cantidad de aceite esencial añadida a la formulación el color se torna blanco y después de tres días de secado. Al final, la película se torna color amarillo conforme a la concentración de aceite esencial. Entre más aceite esencial contenga la película la coloración se tornará amarilla.

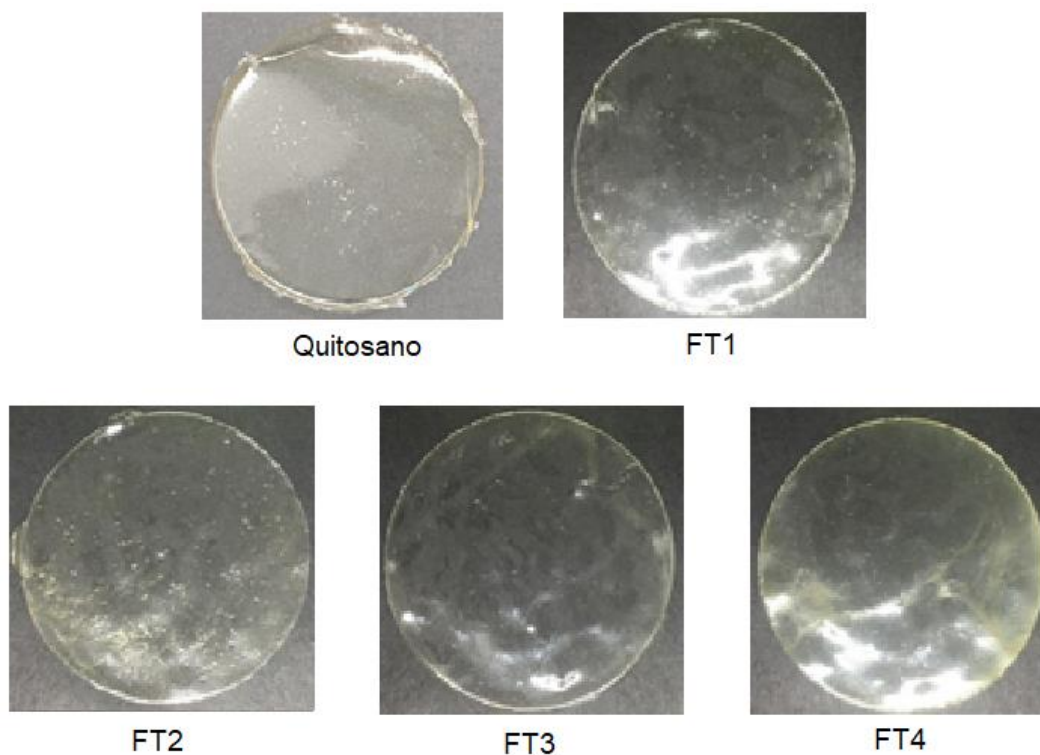


Figura 50. Películas de quitosano y aceite esencial de tomillo.

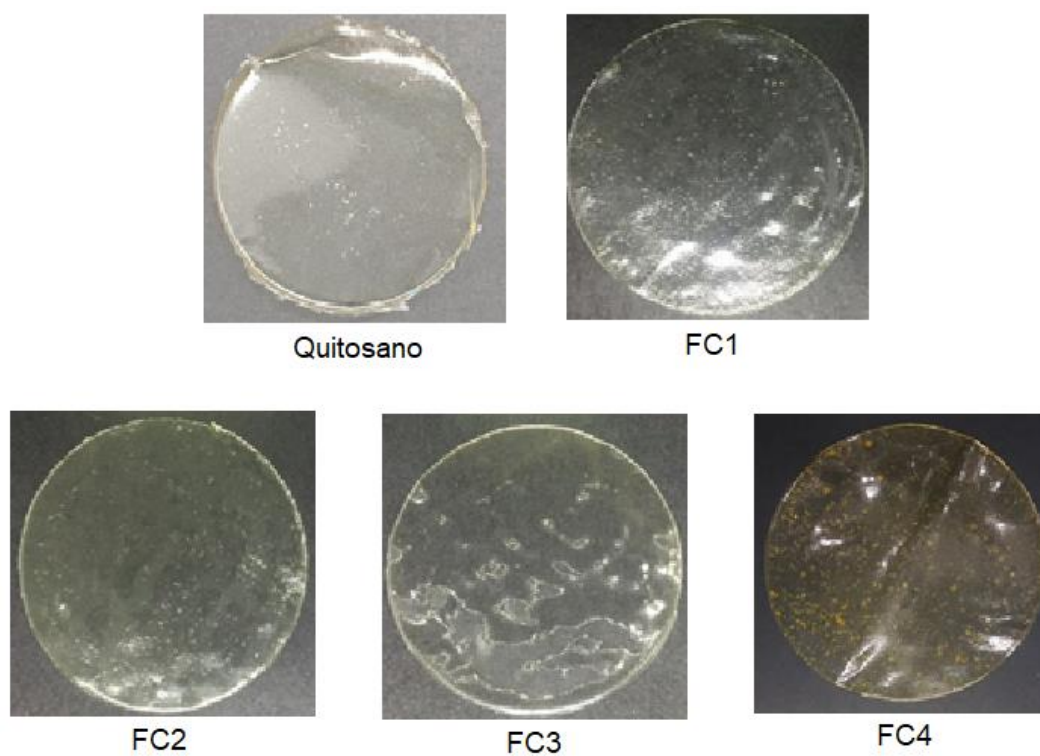


Figura 51. Películas de quitosano y aceite esencial de canela.

7.5.3.1 Caracterización por FT-IR y SEM

El espectro obtenido por FT-IR del aceite esencial de *Cinnamomum verum* (Figura 52A) muestra picos a 3486 cm^{-1} el cual es asociado a enlaces hidroxilo. Las señales encontradas a 2961 cm^{-1} y 2926 cm^{-1} son específicas para grupos CH_2 y CH_3 con vibración de estiramiento asimétrico y simétrico. En 1450 cm^{-1} , 1379 cm^{-1} y 1119 cm^{-1} corresponde a los grupos CH y al grupo C-O se trata del metabolito secundario linalol que se encuentra en el aceite esencial siendo esto corroborado con la investigación previa de Jabir *et al.*, (2019) y Das *et al.*, (2021). Las señales típicas de linalol se observan a 3486 cm^{-1} ya corresponde a la vibración de $-\text{OH}$ del grupo fenol. Las señales a 3486 cm^{-1} y 3070 cm^{-1} corresponde a la vibración del estiramiento del enlace C-H del anillo aromático del metabolito eugenol. Además, las bandas que se encuentran entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} corresponden a la vibración del estiramiento simétrico y asimétrico del enlace de los grupos metil y metileno. A 1450 cm^{-1} y 1379 cm^{-1} y 748 cm^{-1} son atribuidos a la vibración del enlace de flexión del grupo metil y metileno. Para el pico atribuido al enlace C=C se encontró a 1669 cm^{-1} y 1571 cm^{-1} pertenecientes al anillo aromático. Finalmente, a 976 cm^{-1} esta señal es atribuida al enlace del grupo vinilo ($-\text{C}=\text{CH}_2$) (Medvecká *et al.*, 2020).

Las bandas de nuestro compuesto mayoritario E- cinamaldehído aparecen a 3063 cm^{-1} del estiramiento del enlace C-H del anillo aromático. La señal a 2900 cm^{-1} y 2926 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace C-H y CH_2 , la banda encontrada 2816 cm^{-1} es debido al estiramiento del enlace C-H del grupo aldehído. La señal a 1732 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del doble enlace C=O del grupo carbonilo (Canales *et al.*, 2019).

El espectro de FT-IR de las películas elaboradas con aceite esencial de canela (Figura 52B) muestran señales que corresponden a la vibración de estiramiento de enlace de NH y OH a 3297 cm^{-1} mientras que las bandas de absorción 2941 cm^{-1} y 2877 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace de estiramiento asimétrico y simétrico de $-\text{CH}_3$ del grupo metilo esto se corrobora con las bandas entre 1400 cm^{-1} - 1470 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} - 1385 cm^{-1} que corresponden a la vibración de tensión simétrica y asimétrica del enlace CH_3 (δ_s y δ_{as}). Estos cambios han sido atribuidos

con la formación de cadenas de hidrógeno entre el quitosano y los átomos electronegativos de los volátiles presentes en el aceite esencial (Tao *et al.*, 2017; Morales-Rabanales *et al.*, 2022)

Deshmukh *et al.*, (2021), reportó una señal a 1562 cm^{-1} correspondiente a la vibración del enlace -NH y 1040 cm^{-1} que es asociado con el enlace C-O así como la probable interacción entre el aceite esencial y el quitosano. Es importante mencionar que al aumentar la concentración del aceite esencial no produce un cambio significativo en la longitud de onda.

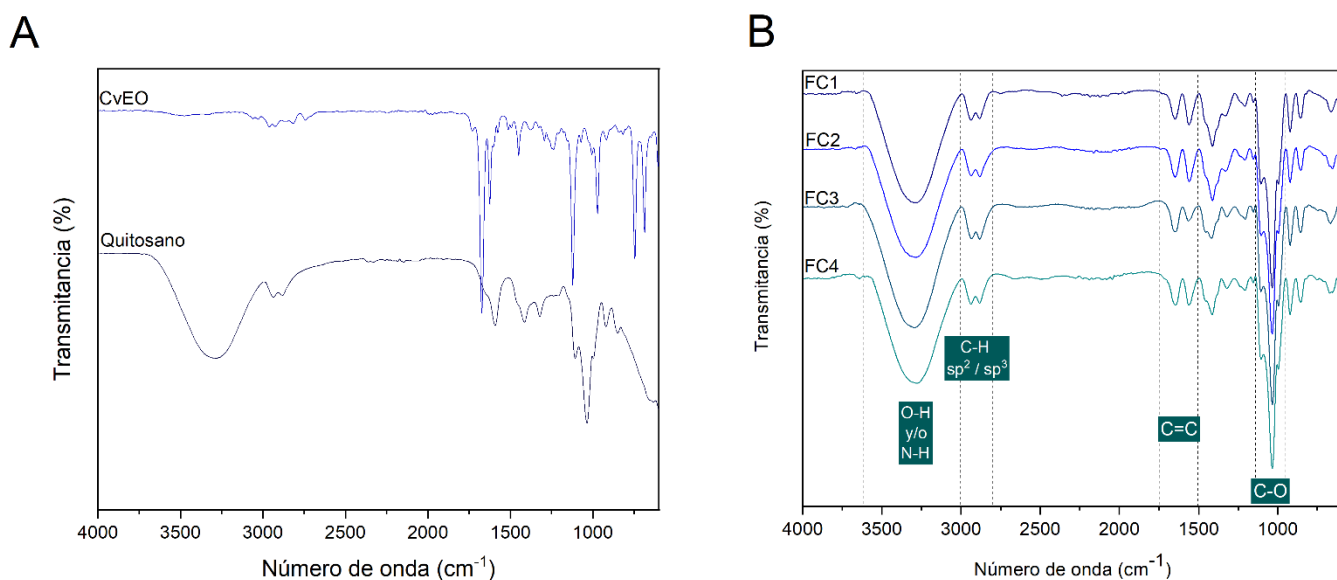


Figura 52. A. FT-IR del aceite esencial de canela, B. FT-IR de las películas de quitosano y aceite esencial.

El espectro del aceite esencial de tomillo (Figura 53A) muestra una señal a 3329 cm^{-1} debido al estiramiento de los grupos O-H enlazados con H por la presencia del grupo fenol en el timol que en su estructura presenta un grupo OH.

Damián *et al.*, (2016) menciona que se produce un ensanchamiento de banda cuando hay enlaces por puente de hidrógeno y se observa una ligera disminución en la frecuencia de absorción (3600 cm^{-1} - 3000 cm^{-1}).

La señal a 2930 cm^{-1} representa el estiramiento característico de las vibraciones asimétricas y simétricas del grupo CH_2 presente, pero en baja intensidad que concuerda con lo reportado por Berechet *et al.*, (2020). Hay señales que muestran

la presencia de estiramiento y vibración de $\text{CH}_3(\nu_{\text{as}})$ de acuerdo con los picos en 2962 cm^{-1} y 2877 cm^{-1} que podrían corresponder al beta-cubebeno. La señal en 1718 cm^{-1} indica el sobretono de flexión fuera del campo C-H, la señal es intensa y presenta estiramiento debido al carbonilo presente en el compuesto (2E)-Hexenyl acetate. La banda en 1624 cm^{-1} corresponde al estiramiento C=C-C. El pico en 1585 cm^{-1} indica la presencia de un grupo aromático lo que concuerda por la presencia del anillo aromático en el timol. La señal 1459 cm^{-1} indica vibración de flexión de CH_2 solapada con la flexión asimétrica del grupo metilo lo cual concuerda con los reportado en Damián *et al.*, (2016). Esta señal corresponde a alpha-pinene lo cual se corrobora con la señal en 1016 cm^{-1} . El pico a $1484\text{-}1359\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración de flexión de los grupos C-H presentes en camphene (Genc *et al.*, 2015). La señal en 1424 cm^{-1} indica flexión asimétrica de $-\text{CH}_3$ y las señales en 1285 y 1226 cm^{-1} son por la presencia del estiramiento C-O-C y 940 cm^{-1} es la señal característica para denotar la presencia de γ -terpineno (Berechet *et al.*, 2020) el cual es un componente mayoritario en el aceite esencial de tomillo. A 1151 cm^{-1} se observa la señal de la banda de absorción del C-OH Catauro *et al.*, (2017). La señal en 806 cm^{-1} corresponde a la superposición de la señal relacionada con C-H debido a la presencia de timol y o-cimeno.

Además de ello, el espectro del quitosano muestra una señal a 3282.09 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento del enlace O-H y el grupo amino debido a la presencia del polímero ya que es grande y ancha.

Las señales a 2937.01 y 2883.66 cm^{-1} se relaciona con el estiramiento del grupo CH_3 del quitosano. Así mismo, las señales en 1414.94 y 1322.35 cm^{-1} son característicos del estiramiento de flexión simétrico (δ_s) y asimétrico (δ_{as}) del grupo metilo. Morales *et al.*, (2022) mencionan que las señales producidas se deben a la presencia de enlaces electrostáticos entre el aceite esencial y el quitosano. Además, la señales a 1593 cm^{-1} producida por el grupo NH y una señal a 1036.4 cm^{-1} del grupo C=O son como huellas dactilares que cotejan lo mencionado anteriormente.

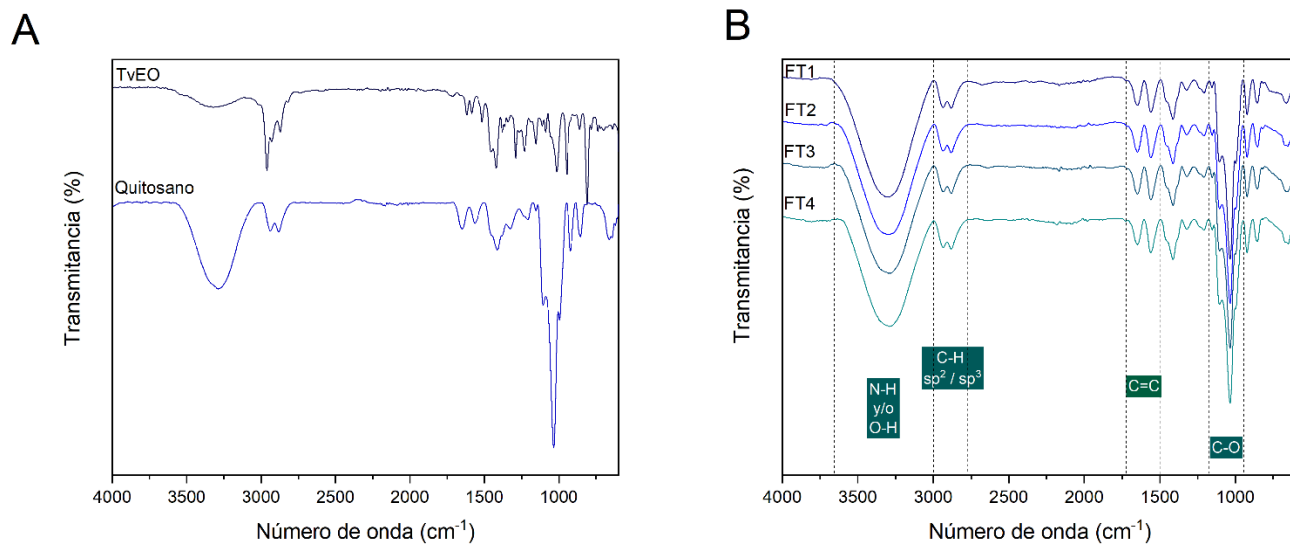


Figura 53. A. FT-IR del aceite esencial de tomillo, B. FT-IR de las películas de quitosano y aceite esencial.

La microestructura de la película puede ofrecernos información acerca de la distribución de los componentes y dar un mayor entendimiento de las propiedades de la película.

La superficie de las películas FC1 a FC4 (Figura 54A) mostraron una estructura continua, lisa y homogénea al igual que la película de quitosano puro. Esta misma morfología fue reportada por Kadam *et al.*, (2021) donde también utilizaron quitosano y extracto de *Cedrus deodara* para demostrar su importancia como material antioxidante para el desarrollo de un material de envasado polimérico activo buscando implementarlo en la industria alimentaria.

La vista transversal (Figura 54B) muestra la homogeneidad de los componentes dado que no se observa ninguna irregularidad como gotas, burbujas de aire y grietas. Algunos trabajos han reportado que la adición de aceites esenciales en soluciones poliméricas genera una morfología densa y la aparición de gotitas de aceites esenciales (Valderrama *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2019). Sin embargo, en la película cuya concentración es de 1.3% (FC4) presenta pequeñas cavidades por la presencia del aceite esencial.

También se percibe un aumento en el grosor de las películas FC1- FC4 conforme aumenta la concentración del aceite esencial. El grosor de las películas de canela

FC1, FC2 FC3 y FC4 fue de 0.234 mm, 0.268 mm, 0.284 mm y 0.350 mm respectivamente.

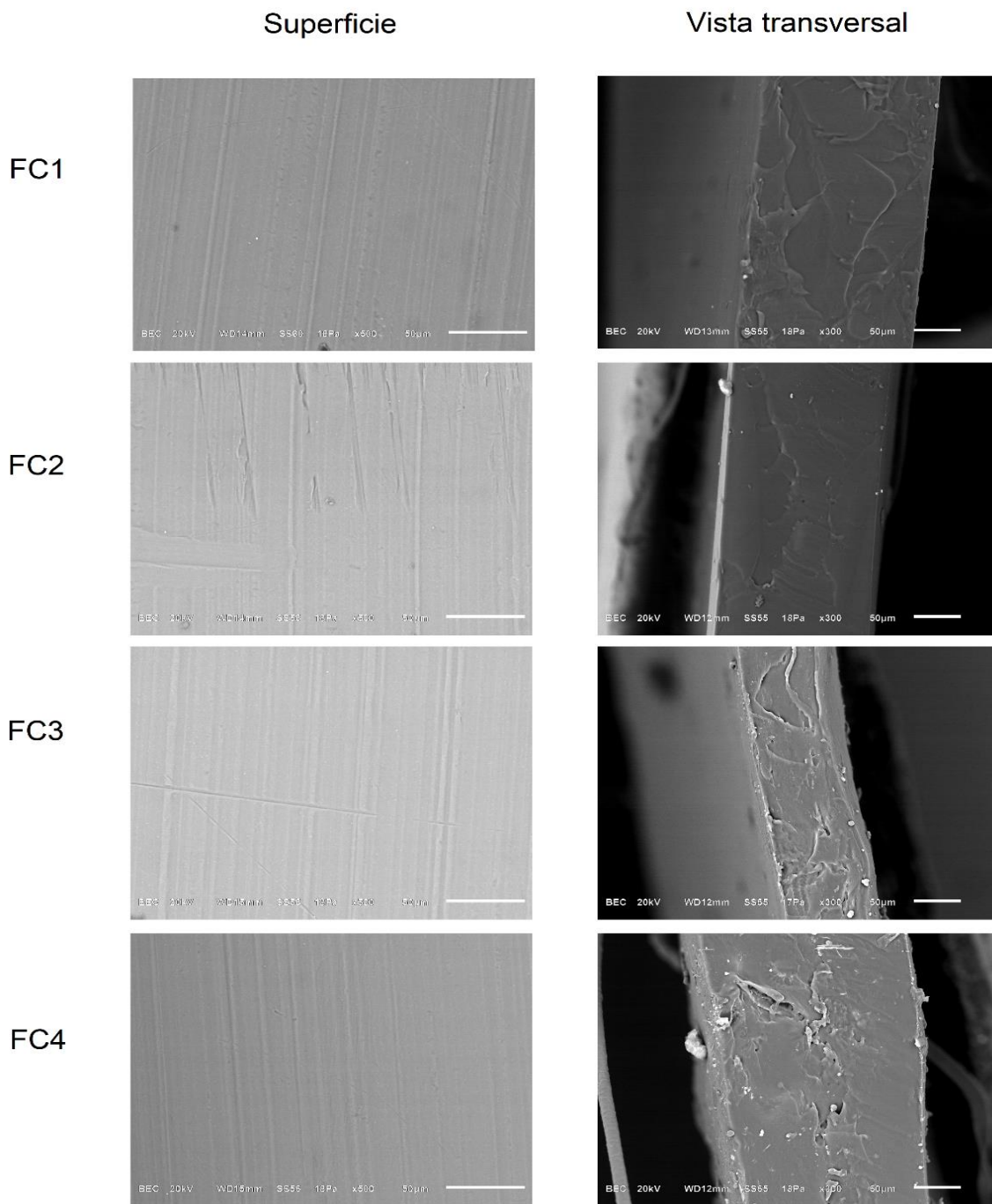


Figura 54. Micrografías de A) superficie y B) vista transversal de las películas de quitosano y aceite esencial de canela.

En cuanto a las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo muestran una superficie homogénea (Figura 55A). Todas las películas muestran una superficie sin fracturas. Se observan diferencias no significativas entre todas las películas por lo cual se afirma que el aceite esencial de tomillo se incorporó totalmente al quitosano conforme aumenta la concentración.

En cuanto a la vista transversal (Figura 55B), las películas que contienen mayor cantidad de aceite esencial presentan una superficie más homogénea que las que contienen menor concentración. Cabe resaltar que las películas FT1 y FT2 son las que presentan pequeños gránulos que, a comparación de las películas de canela, los gránulos son menos evidentes. En vista de esto, se plantea que el método de fundición con solvente generó una miscibilidad uniforme por lo que la distribución de aceite esencial hace clara la evidencia de un buen comportamiento en conjunto con el polímero.

Al igual que las películas de canela, en las películas de tomillo se percibe el aumento de grosor en base a la concentración de aceite esencial. El grosor de las películas de tomillo FT1, FT2 FT3 y FT4 fue de 0.1823 mm, 0.2385 mm, 0.2394 mm y 0.302 mm respectivamente.

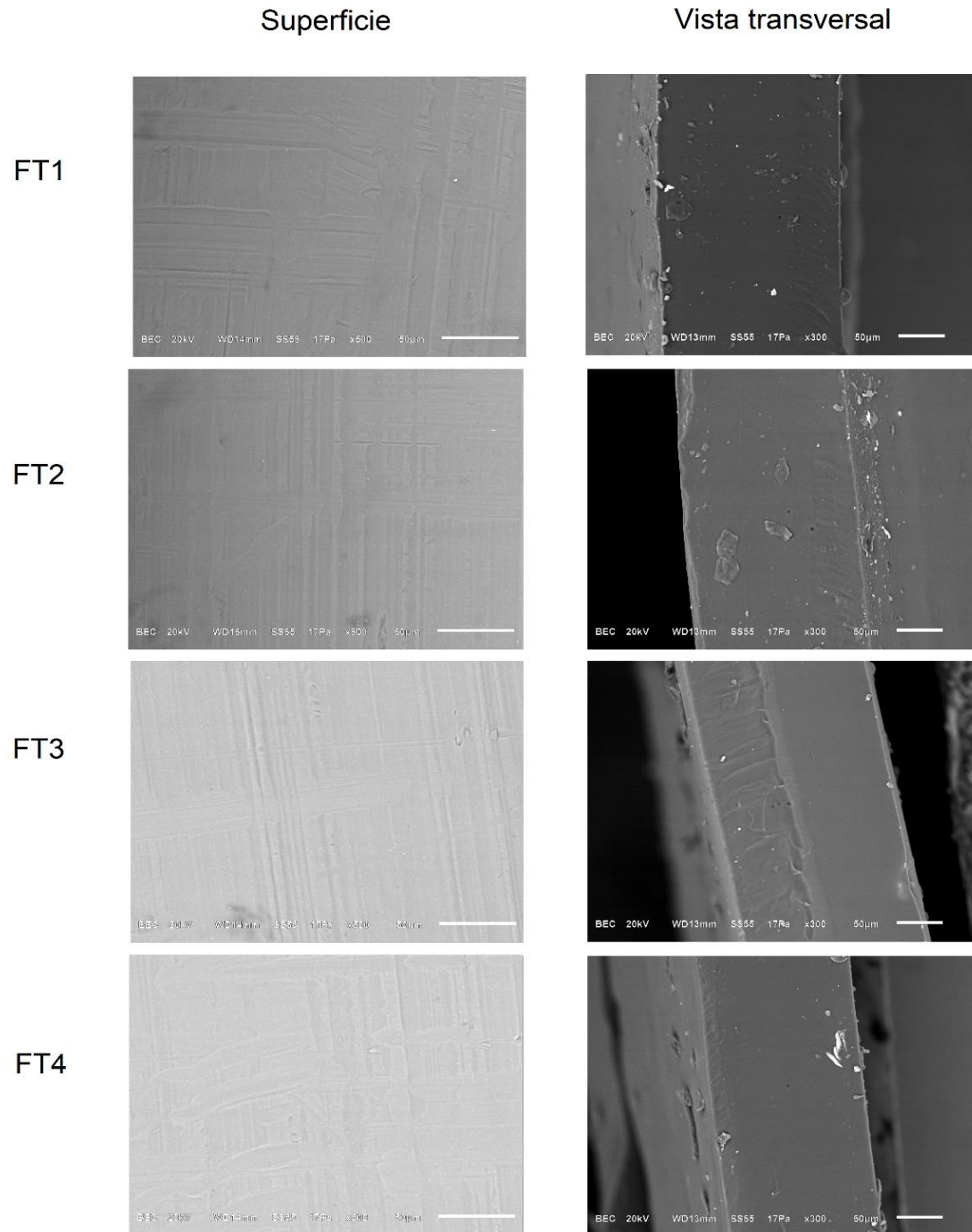


Figura 55. Micrografías de A) superficie y B) vista transversal de las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo.

7.5.3.2 Evaluación de transmitancia y opacidad

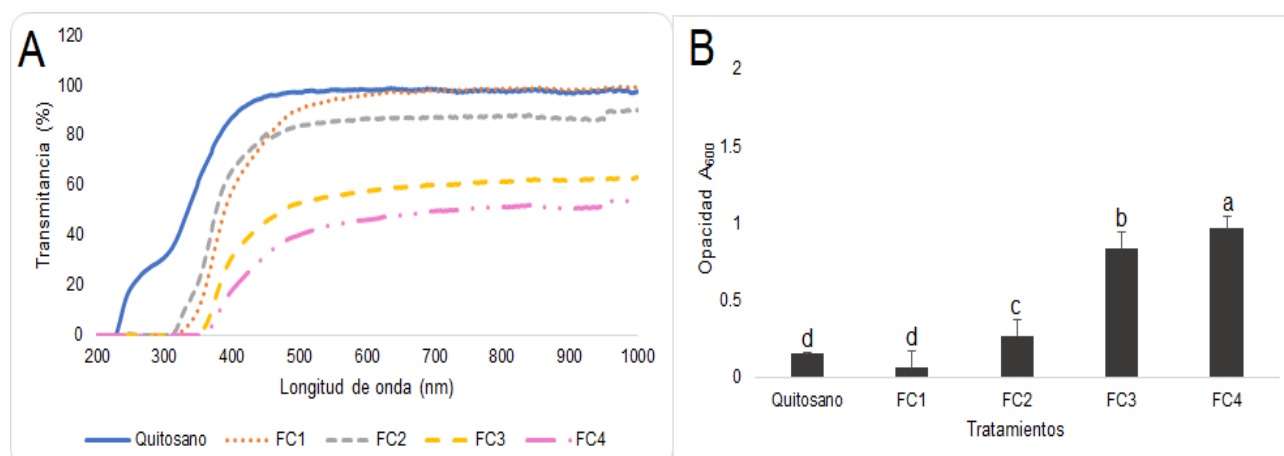


Figura 56. A) Transmitancia y B) opacidad de las películas de quitosano y aceite esencial de canela.

Una de las características deseable del material es la de proteger el alimento de los efectos de la luz especialmente de la radiación UV (Kanatt *et al.*, 2012).

El resultado de la transmitancia (UV-Vis) a través de películas de quitosano que contienen diversas cantidades de aceite esencial de canela se muestra en la Figura 56A. La transmitancia de UV (190-300 nm) y luz visible (350-800) fue menor en películas que contenían 1.0 y 1.3% de aceite esencial de canela (FC3-FC4) que en aquellas que contenían quitosano puro. Sin embargo, las películas cuya concentración era 0.4% en 700-900 nm se observa un comportamiento parecido al del quitosano puro.

Este resultado indica que las películas híbridas de quitosano que contienen aceite esencial tienen la capacidad de mejorar las propiedades de barrera del quitosano puro. Por tanto, la incorporación de aceites esenciales puede disminuir la penetración de la luz ultravioleta mejorando su eficacia como potencial material de envasado para evitar la peroxidación lipídica.

Los resultados de la opacidad para las diferentes películas se muestran en la Figura 54B la cual denota que conforme aumenta la concentración de aceite esencial, las películas serán más opaca que las demás. Y también las películas de quitosano puro eran menos opacas que otras películas lo que concuerda con Gutiérrez &

Alvarez, (2017) quienes informaron resultados similares para películas de arcilla de almidón de maíz que contienen extractos de arándanos.

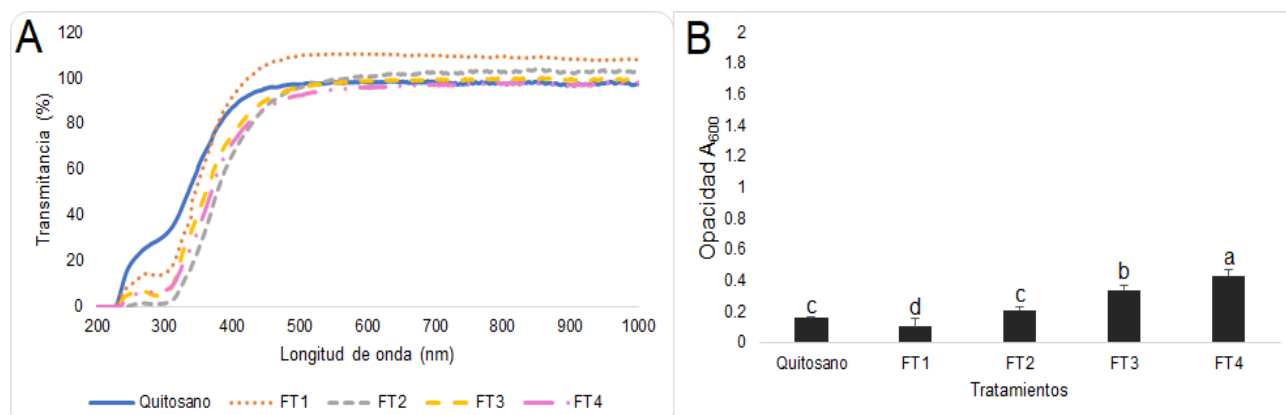


Figura 57. A) Transmitancia y B) opacidad de las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo.

El resultado de la transmitancia (UV-Vis) a través de películas de quitosano que contienen diversas cantidades de aceite esencial de tomillo se muestra en la Figura 57A. Cabe resaltar que la transmitancia es más alta que la transmitancia de las películas que contienen canela. Es decir, que las películas de tomillo son menos opacas de las películas de canela. Al observar la Figura 57A se denota que la película de aceite esencial de tomillo a una concentración de 0.4% es menos opaca que la película de quitosano lo cual también se observa en la Figura 57B. También la transmitancia de las películas de aceite esencial de tomillo y a diferentes concentraciones siguen el patrón del comportamiento de la película que solo tiene quitosano.

Según Sukhija *et al.*, (2016), los materiales de envasado opacos protegen los alimentos de la degradación oxidativa producida por la radiación UV. Así, las películas que contienen las mayores concentraciones de aceite esencial de canela (las más opacas), pueden ejercer mejores propiedades de conservación en los alimentos envasados (Gutiérrez & Alvarez, 2017; Sukhija *et al.*, 2016).

7.6. Evaluación de materiales *in vivo*

7.6.1 Evaluación de la biopelícula en aguacates sanos

La incorporación de la película híbrida que es una combinación de dos agentes antifúngicos (quitosano y el aceite esencial de *Cinnamomum verum*) resultó como un efecto protector de los síntomas provocados por la invasión de *F. verticillioides* hasta por un periodo de 21 días. En la Figura 58 se muestra una cinética de crecimiento donde se comparan todos los tratamientos. En base a esto, se observó que conforme aumentaba la concentración de aceite esencial, el crecimiento del hongo se fue retrasando en comparación con el aguacate infectado con este microorganismo.

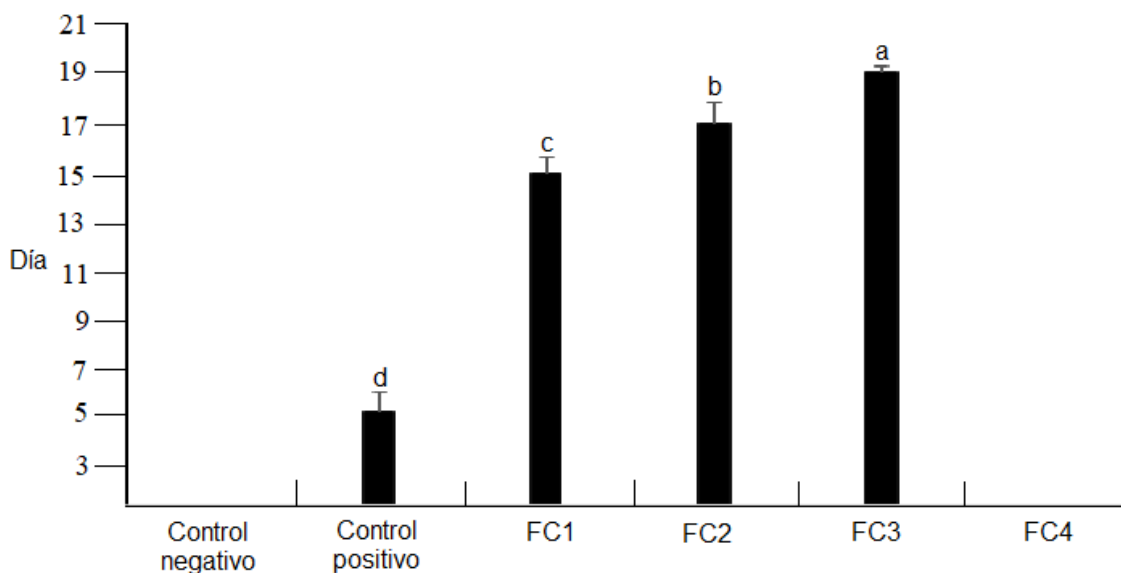


Figura 58. Cinética de crecimiento de *Fusarium verticillioides* en aguacates tratados.

En la Figura 59 se puede observar que los aguacates infectados con el hongo filamentoso presentan indicios de crecimiento desde el día 5 lo contrario a lo que ocurre con los aguacates que contienen la película. Así mismo se observa que las películas denominadas como FC1 y FC2 al día 9 ya presentan crecimiento por lo

cual se deja en claro que estas películas no ayudan a disminuir el crecimiento del microorganismo.

No obstante, el aguacate tratado con la película FC3 presenta crecimiento de este microorganismo en el día 9. La parte positiva es el crecimiento se encuentra fuera del área de donde se encuentra la película. Hasta el día 21, se observa crecimiento de este microorganismo sobre la película sin afectar al fruto.

Interesantemente, los aguacates tratados con la película FC4 no mostraron algún signo de infección por *F. verticillioides* hasta el día 21 al igual que los aguacates que ayudaron como grupo control negativo. Por lo tanto, las películas cumplieron con su función de retrasar o controlar el crecimiento de *F. verticillioides*. En la Figura 60, se observa el experimento de germinación de conidios el cual demuestra que estos fueron incapaces de proliferar sobre la superficie de la película FC3 y FC4 durante un periodo de 7 días de incubación en condiciones óptimas de crecimiento. Como puede observarse en la Figura, los controles de viabilidad de conidios (conidios germinados en PDA) contrastan el efecto fungistático del nuevo material generado material que puede funcionar como una barrera preventiva sobre la colonización de *F. verticillioides* y probablemente de otras especies relacionadas.

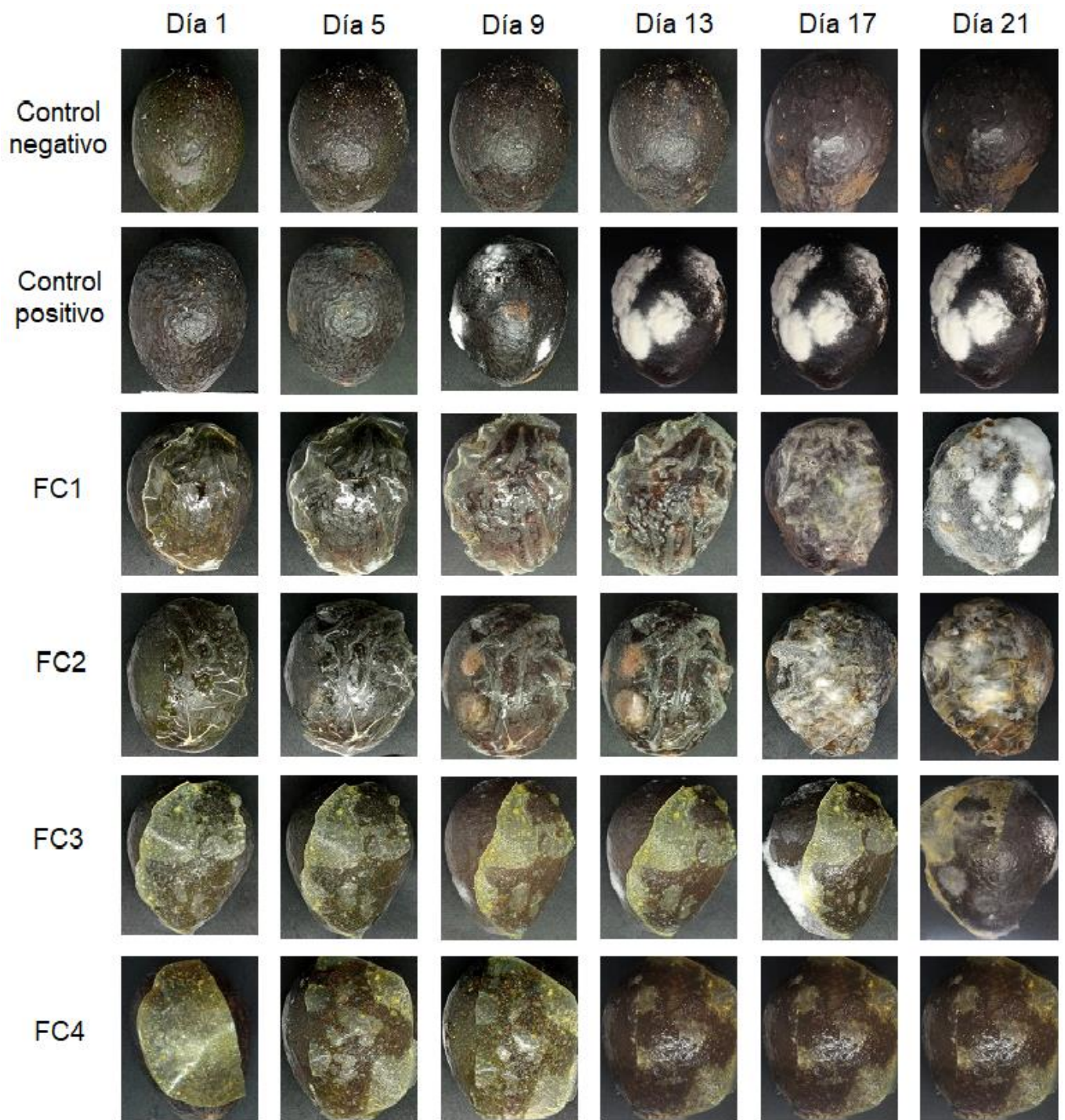


Figura 59. Evaluación de películas de quitosano y aceite esencial (*Cinnamomum verum*) vs *F. verticillioides*.

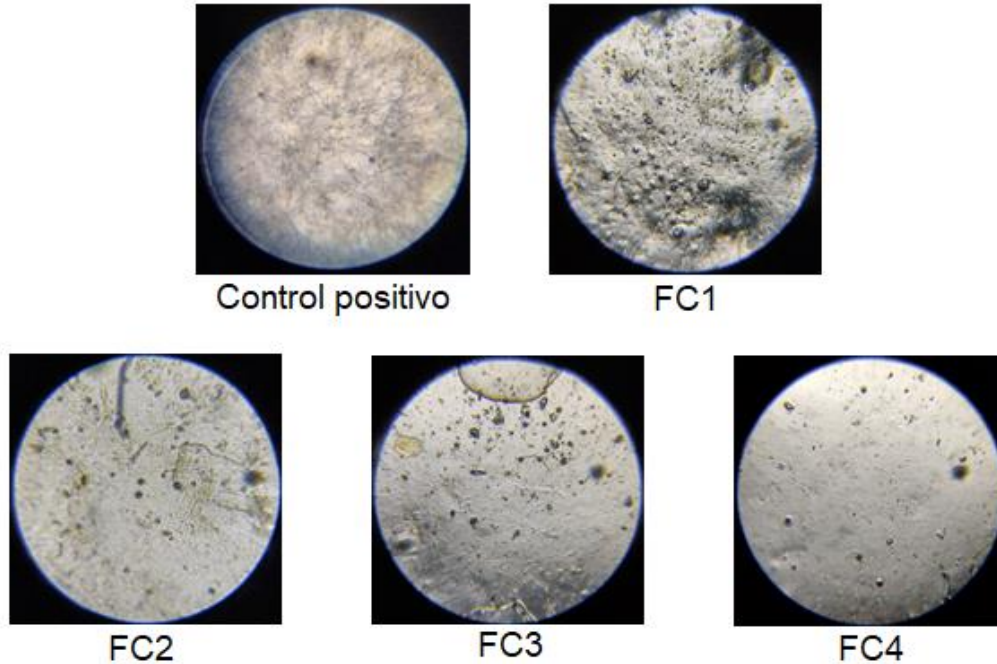


Figura 60. Evaluación in situ de películas de quitosano y aceite esencial (*Cinnamomum verum*) vs *F. verticillioides*.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial se ha atribuido a la presencia de compuestos aromáticos y grupos fenólicos como el eugenol el cual está presente en el aceite esencial de canela.

Algunos estudios como el reportado por Silva *et al.*, (2013) también utilizaron aceite esencial de hojas de canela en frutos de fresa poscosechada. Aquí se pudo comprobar que el uso de este aceite esencial provocó una disminución del crecimiento de micelios del hongo *Botrytis cinerea* Pers en la superficie de las fresas.

En la evaluación *in vivo* de *Fusarium solani* contra aceite esencial de tomillo, muestran una clara evidencia que el aceite esencial de tomillo previene el crecimiento y mantiene por más tiempo la integridad del fruto. En la Figura 61 se muestra una cinética de crecimiento de *F. solani* vs películas. En esta figura se aprecia que los aguacates infectados presentan crecimiento en el día 3. Mientras que, en el tratamiento con películas de puro quitosano hay indicios de crecimiento en el día 4.

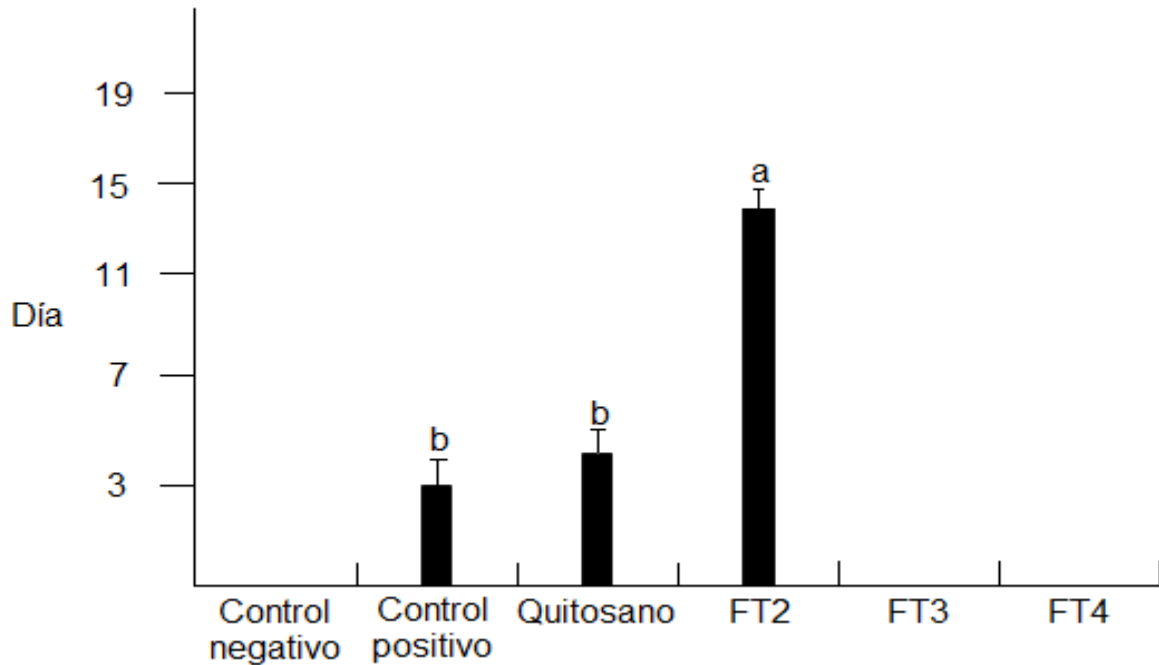


Figura 61. Cinética de crecimiento de *Fusarium solani* en aguacates tratados.

Esto es una clara evidencia que el quitosano puro no controla el crecimiento de microorganismos y de manera visual esta información se presenta en la Figura 62. Además, se realizó la evaluación in situ de las películas y los resultados se muestran en la Figura 63. Donde a pesar de descartar la evaluación del tratamiento con 0.4%, la concentración a 0.7% presenta crecimiento sobre la película en un lapso de 7 días. La razón por la que se eliminó el tratamiento a la concentración más bajo fue porque se ha observado en las demás evaluaciones, que una concentración muy baja no ayuda a inhibir el crecimiento del microorganismo.

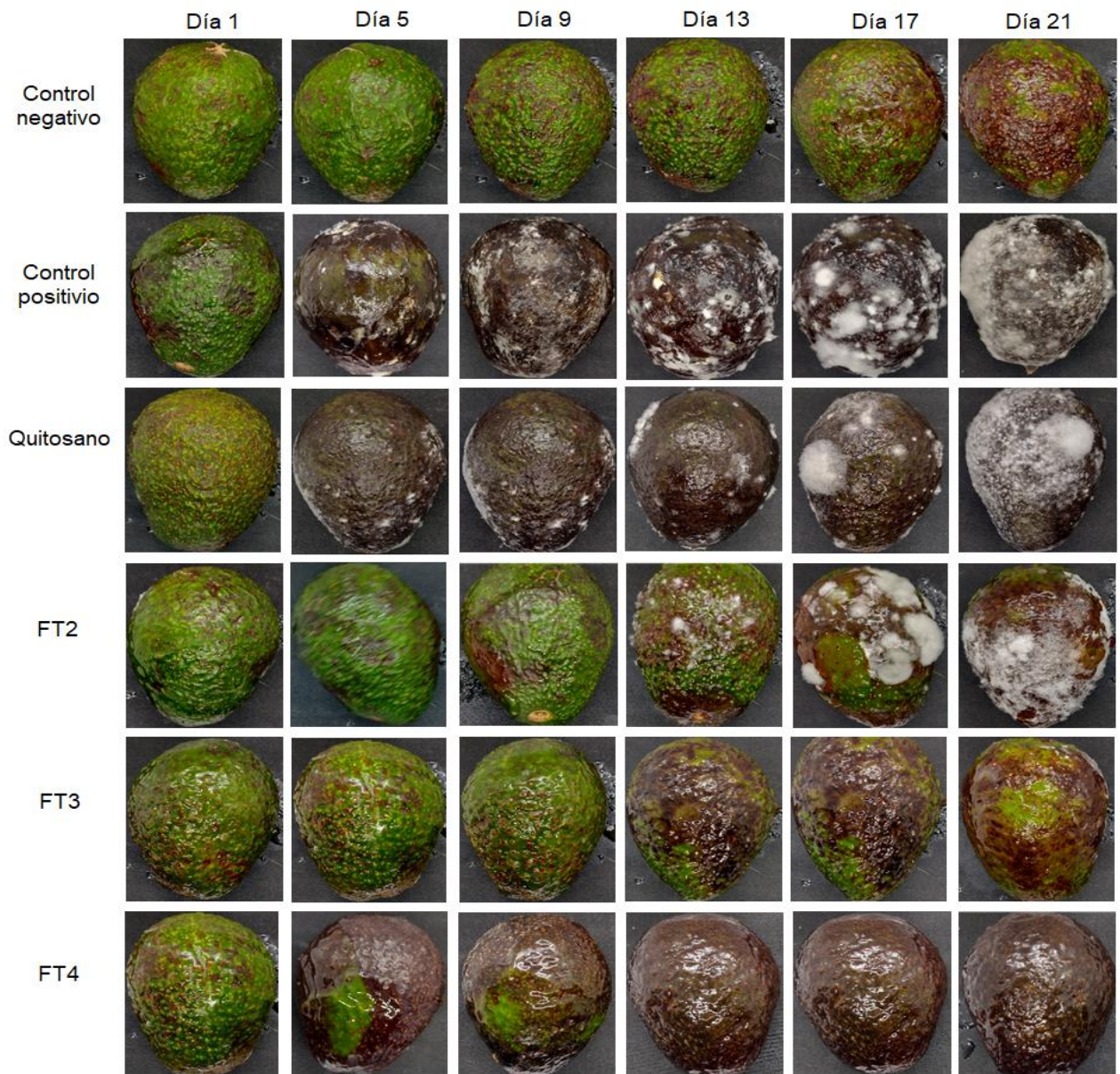


Figura 62. Evaluación de películas de quitosano y aceite esencial (*Thymus vulgaris*) vs *F. solani*.

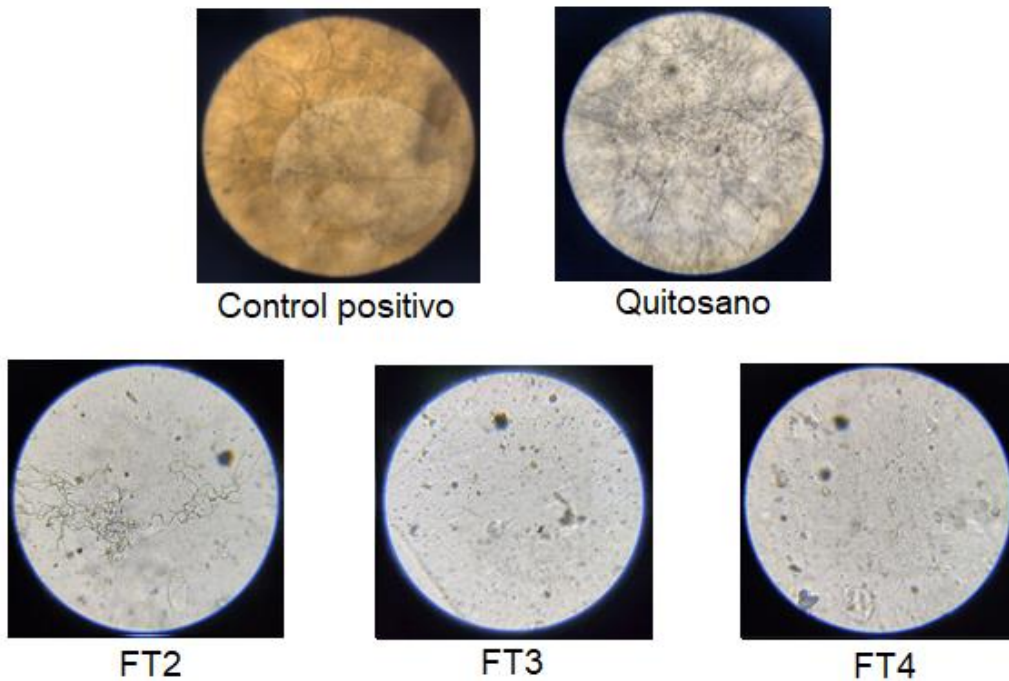


Figura 63. Evaluación in situ de películas de quitosano y aceite esencial (*Thymus vulgaris*) vs *F. solani*.

En la Figura 64 se observa la cinética de crecimiento y en la Figura 65 la evaluación de las películas de canela contra la cepa W6 de *Clonostachys rosea*. Se denota que las concentraciones bajas al igual que en los otros experimentos, no inhiben por completo el crecimiento de este hongo en comparación con las concentraciones altas. Esto se puede corroborar en la Figura 66 donde se presenta la evaluación *in situ* que arroja un ligero crecimiento en las concentraciones bajas en un lapso de 7 días.

C. rosea en específico la cepa con el código W6, fue la que presentó mayor daño por lo cual fue la que se empleó para los ensayos *in vivo*. En los resultados de esta evaluación se observa que el aguacate infectado presenta un crecimiento al día 11 por lo contrario a la cepa de *F. verticillioides*. En cambio, el tratamiento con la película FC1 el crecimiento es retrasado hasta el día 17, con la película FC2 hasta

el día 19 y con FC3 hasta el día 21. Por lo contrario, la película FC4 logran inhibir el crecimiento manteniendo intacto el fruto en el área donde es cubierto por el material.

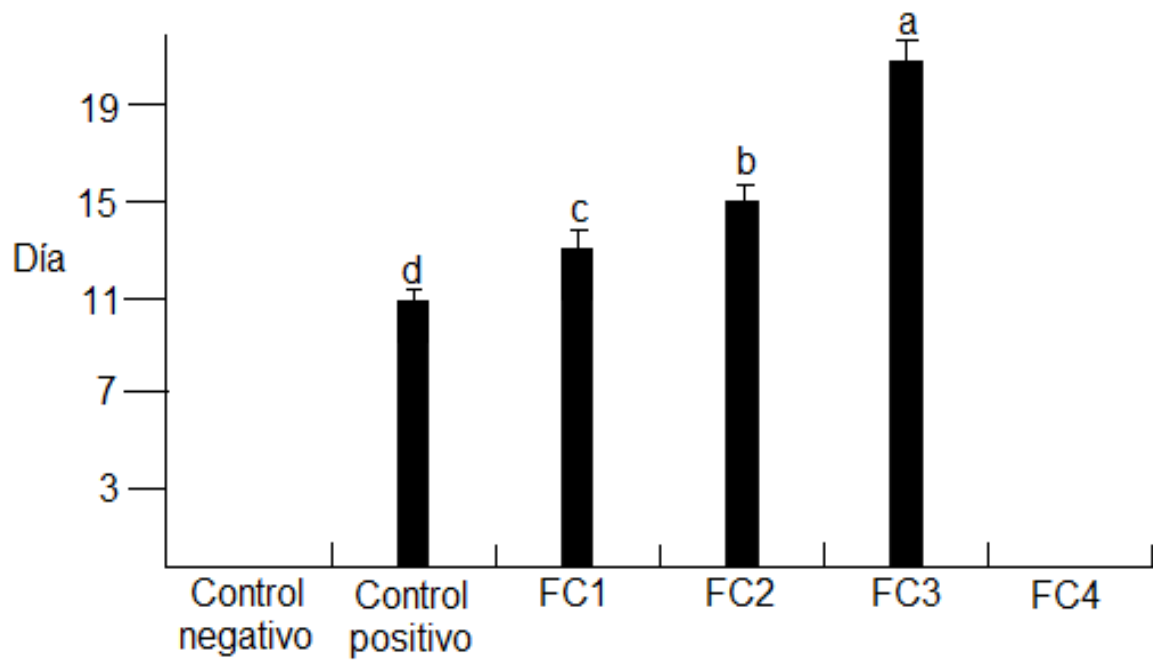


Figura 64. Cinética de crecimiento de *C. rosea* en aguacates tratados.

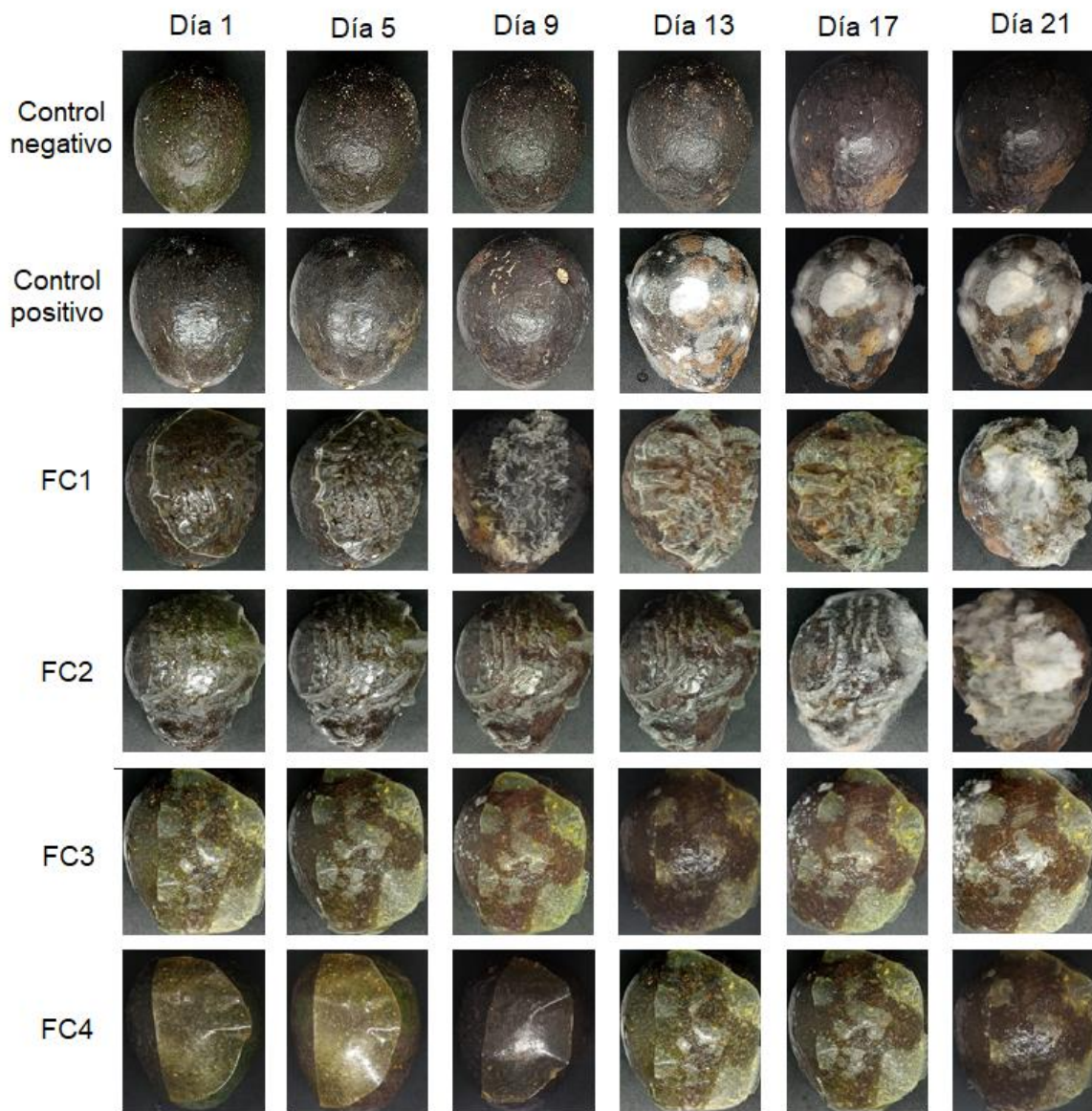


Figura 65. Evaluación de películas de quitosano y aceite esencial (*Cinnamomum verum*) vs *C. rosea*.

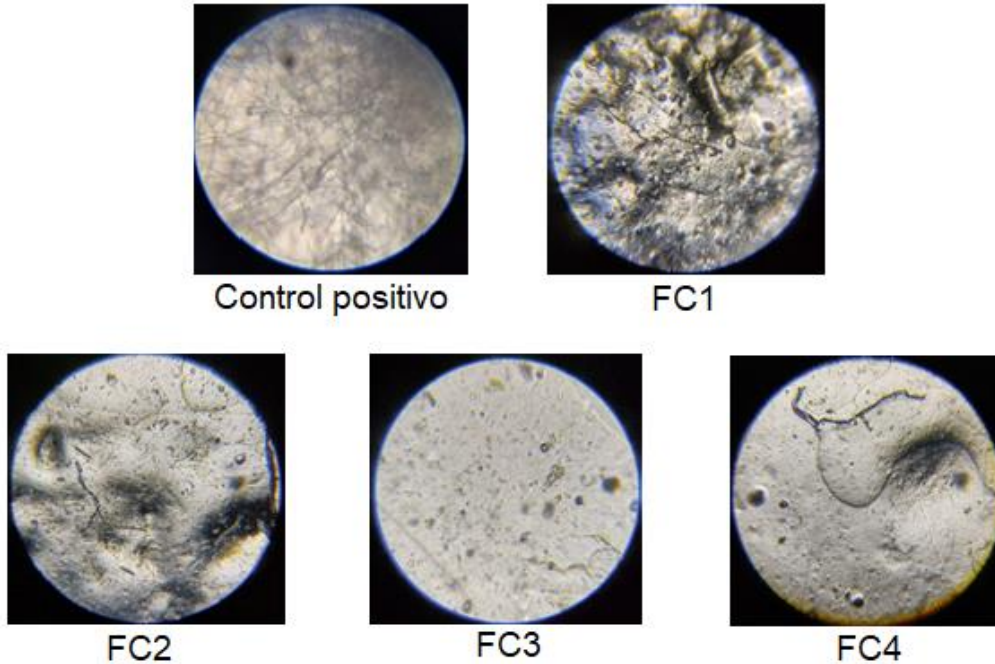


Figura 66. Evaluación in situ de películas de quitosano y aceite esencial (*Cinnamomum verum*) vs *C. rosea*.

En la Figura 67 se observa que el tratamiento con 0.4% de aceite esencial muestra crecimiento al día 19. En cuanto al tratamiento con aceite esencial al 0.7% en el día 21 presenta un ligero crecimiento. Sin embargo, presenta un mayor control del crecimiento en comparación con el tratamiento FT1 (Figura 68).

Por el contrario, las películas cuyas concentraciones son 1.0% y 1.3% no presentan crecimiento al día 21, lo cual indica que las películas cumplen con la función de potencializar el efecto fungicida. Esto se puede corroborar en la Figura 69 donde se presentan como control positivo el crecimiento de conidios en medio de cultivo PDA y los tratamientos fueron cuadros de película inoculado con el mismo número de conidios.

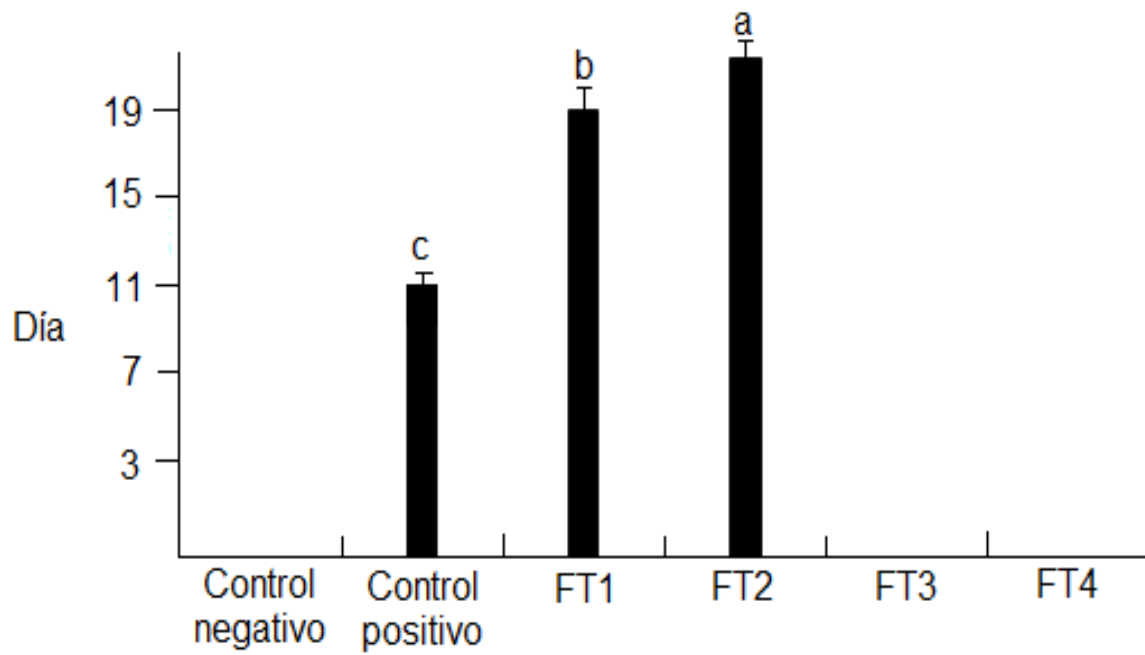


Figura 67. Cinética de crecimiento de *C. rosea* en aguacates tratados.

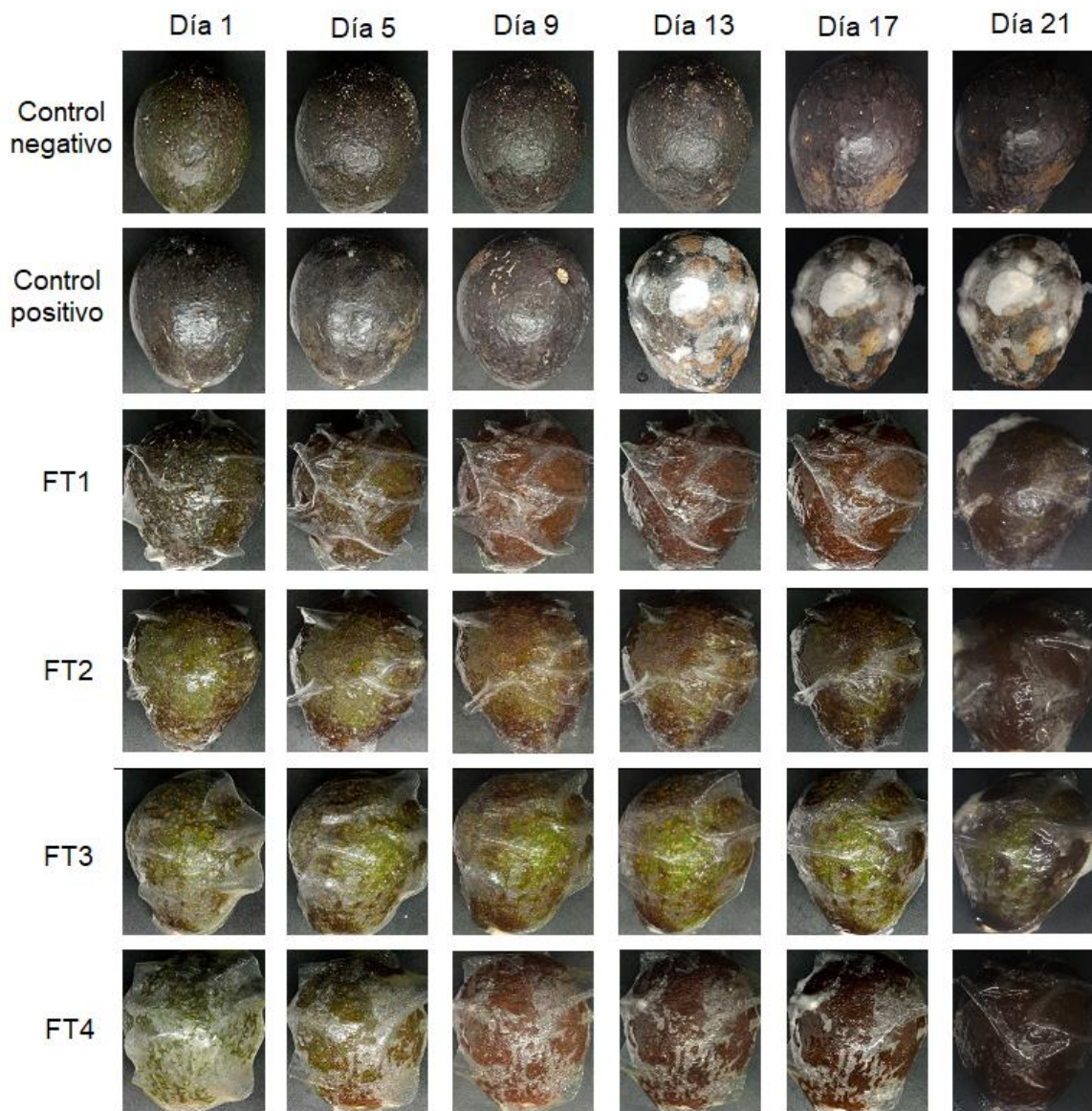


Figura 68. Evaluación de películas de quitosano y aceite esencial (*Thymus vulgaris*) vs *C. rosea*.

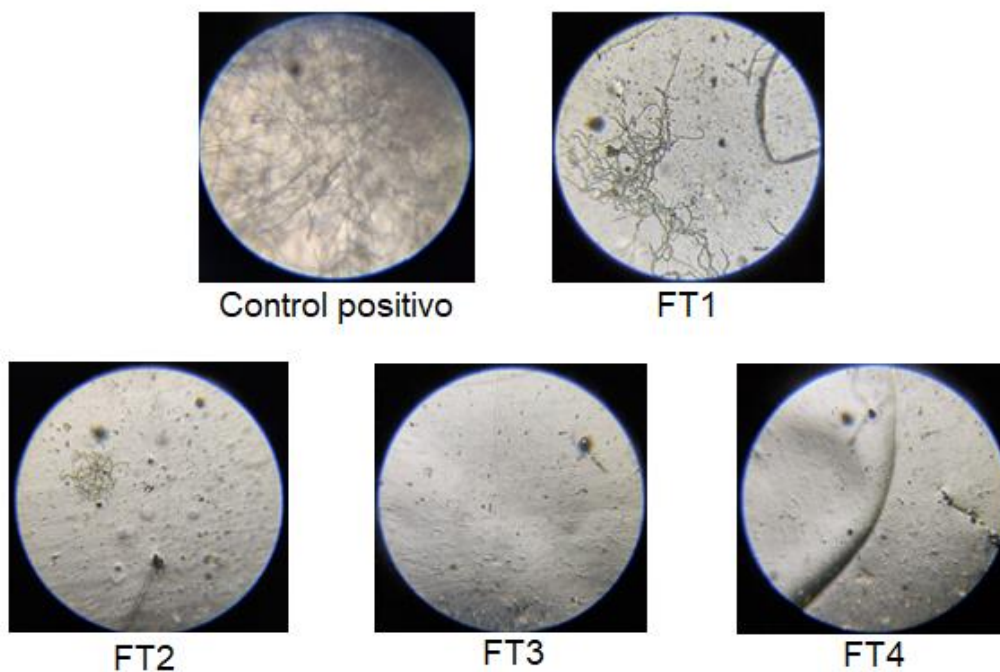


Figura 69. Evaluación in situ de películas de quitosano y aceite esencial (*Thymus vulgaris*) vs *C. rosea*.

Adicionalmente, las películas lograron retrasaron el crecimiento de microorganismos y la pigmentación causada por la acumulación de melanina, en comparación con el grupo de aguacates sanos.

Hernández *et al.*, (2018) hicieron uso de películas biodegradables de quitosano, cera de abeja, ácido oleico y aceites esenciales de tomillo, clavo y canela a la concentración del 1 % que inhibieron el desarrollo de hongos fitopatógenos de papaya *in vitro*. Sin embargo, se empleó el uso de las películas sobre frutos de papaya y se observó un mejor efecto en el control de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides* cuando los frutos se conservaron a temperatura controlada (14 ± 2 °C), sin afectar los parámetros fisiológicos de las frutas tratadas, lo que permitió extender hasta 19 días la vida útil y calidad de los frutos de papaya.

El quitosano es un polímero que se ha reportado que presenta cambios en la morfología de hongos que son expuestos a él causando ruptura de la pared celular, desorganización de la membrana celular, distribución tanto anormal como cuerpos de inclusión no membranosos en el citoplasma así como engrosamiento de las paredes de las hifas dando lugar a las deformaciones (Romanazzi *et al.*, 2017; Chávez *et al.*, 2019)

El mecanismo por el cual el recubrimiento conserva la calidad de frutas y vegetales esto es debido a que crean una barrera física a los gases permitiendo modificar la atmósfera interna de la fruta y de esta manera retardar la maduración y senescencia (Fernández *et al.*, 2015).

Este tipo de recubrimientos como posible empaque orgánico se ha reportado en frutos como el mango donde la función fue reducir la pérdida de agua, las propiedades sensoriales y se inhibió el crecimiento de microorganismos (Po-Jung *et al.*, 2007; Berumén *et al.*, 2015). También se ha reportado en brócoli con el fin de reducir la carga microbiana mesófila (Rojas-Graü *et al.*, 2007).

Sarkhosh *et al.*, (2017) probó las propiedades inhibitorias de extractos de plantas como los aceites esenciales extraídos de la menta, ajedrea, tomillo, canela y lavanda para extender la vida útil del fruto de aguacate. Este estudio concuerda con el trabajo realizado ya que el aceite esencial de tomillo es un método alternativo que puede ser utilizado para la mejora y mantenimiento de la vida útil del aguacate. Además, en el estudio reportado por estos autores mencionan que el aceite esencial de ajedrea tiene un buen potencial para el control poscosecha de la antracnosis del aguacate puesto que actúa directamente sobre el patógeno.

Otros trabajos han reportado el uso de quitosano en combinación con aceites esenciales para inhibir el crecimiento de *Alternaria citri* usando *Thymus vulgaris* (Arras & Usai, 2001), *Botrytis cinerea* con *Cymbopogon martini* Rox (Wilson, 1997), hongos del género *Penicillium* con aceite esencial de *Thymus vulgaris*, *C. sinensis* y *Poncirus trifoliata* (Arras & Usai, 2001) y *Fusarium graminearum* con *Citrus aurantifolia* (Mishra & Dubey, 1994). Todos estos también fueron reportados como especies de hongo fitopatógenos en poscosecha de frutos.

Al final, el quitosano si cumple su objetivo en conjunto con los aceites esenciales, el cual es potencializar la actividad fungicida. Ya que el uso combinado de quitosano y aceites esenciales es una buena alternativa para combatir microorganismos patógenos (Chávez *et al.*, 2019). En investigaciones la principal base para generar una iniciativa es que hay la necesidad de controlar las enfermedades poscosecha integrando actividades con la finalidad de seguir impulsando un sistema productivo que beneficie al consumidor al contar con productos que satisfagan los requerimientos calidad sin impactar de forma negativa al ambiente

7.7 Evaluación de la firmeza del fruto

La firmeza es un parámetro muy importante en la calidad de frutos perecederos. La presencia de enfermedades en frutos hace que disminuya la turgencia llevando a los productos a ser inservibles. Así mismo, cuando los frutos presentan esta pérdida, tienden a ser susceptibles al daño mecánico derivado del manejo poscosecha (Morales-Rabanales *et al.*, 2022). De ella depende la aceptabilidad del fruto, puesto que es uno de los parámetros que el consumidor toma en cuenta para la adquisición del fruto (Jha *et al.*, 2012).

La firmeza de los aguacates que fueron inoculados con *F. verticillioides* (Figura 70) mostraron una pérdida evidente de su turgencia hasta en un 80% al día 21. Sin embargo, se observa claramente que el fruto de aguacate en el día 7 ha perdido ya el 35% de firmeza ($p < 0.01$). Por otro lado, los aguacates que fungieron como control negativo mostraron una pérdida de turgencia entre el 10 y 20% desde día 0 hasta el día 21.

Las películas FC1($1.38 \pm 0.1 \text{ kg/cm}^2$), FC2 ($1.06 \pm 0.1 \text{ kg/cm}^2$), FC3($1.56 \pm 0.5 \text{ kg/cm}^2$) y FC4 ($1.76 \pm 0.2 \text{ kg/cm}^2$) conservaron significativamente la firmeza de los aguacates ($p < 0.01$) al día 21 en comparación con el aguacate infectado con el hongo. Cabe resaltar que la firmeza de los frutos sanos y aquella de los frutos infectados pero tratados con la película FC4 disminuyó aproximadamente 20% al día 21. Esto se debe al proceso natural de senescencia del fruto de aguacate.

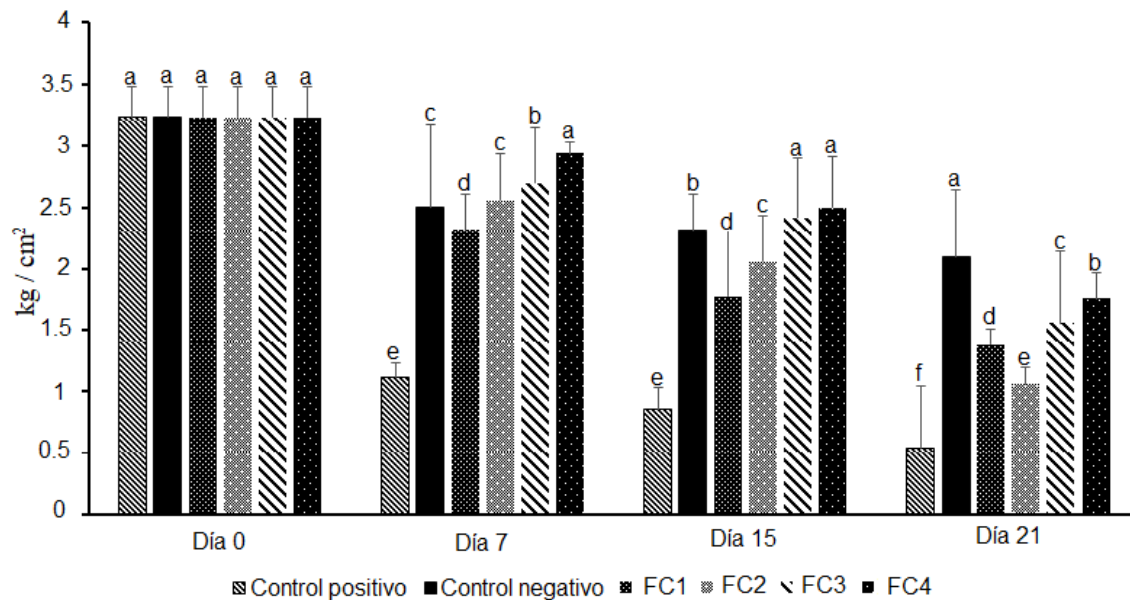


Figura 70. Evaluación de firmeza en aguacates infectados con *F. verticillioides* vs películas de quitosano con aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*).

En la Figura 71 se observa que la firmeza de los aguacates que fueron inoculados con *F. solani*, tienen una pérdida evidente de su turgencia hasta en un 69.5% al día 21. Esto en base a que la firmeza del aguacate infectado al día 21 fue de 3.16 ± 0.2 kg/cm² y en un aguacate sano la firmeza fue de 4.02 ± 0.3 kg/cm², Los resultados del análisis estadístico demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en comparación con los aguacates sano y tratados.

Por otro lado, los aguacates que fungieron como control negativo mostraron una pérdida de turgencia entre el 19.5%, 33.3% y 26.6% menos entre cada día evaluado día 0 hasta el día 21. Así mismo, los aguacates que contienen las películas de quitosano sin aceite esencial tienen una pérdida de 13% más que el aguacate sano lo cual demuestra que las películas por sí mismas no ayudan a mantener la calidad del fruto.

Las películas FT2 (5.06 ± 0.2 kg/cm²), FT3 (6.12 ± 0.2 kg/cm²) y FT4 (7.46 ± 0.2 kg/cm²) conservaron significativamente la firmeza de los aguacates ($p < 0.01$) al día 21 en comparación del aguacate infectado con el hongo e incluso del aguacate sano.

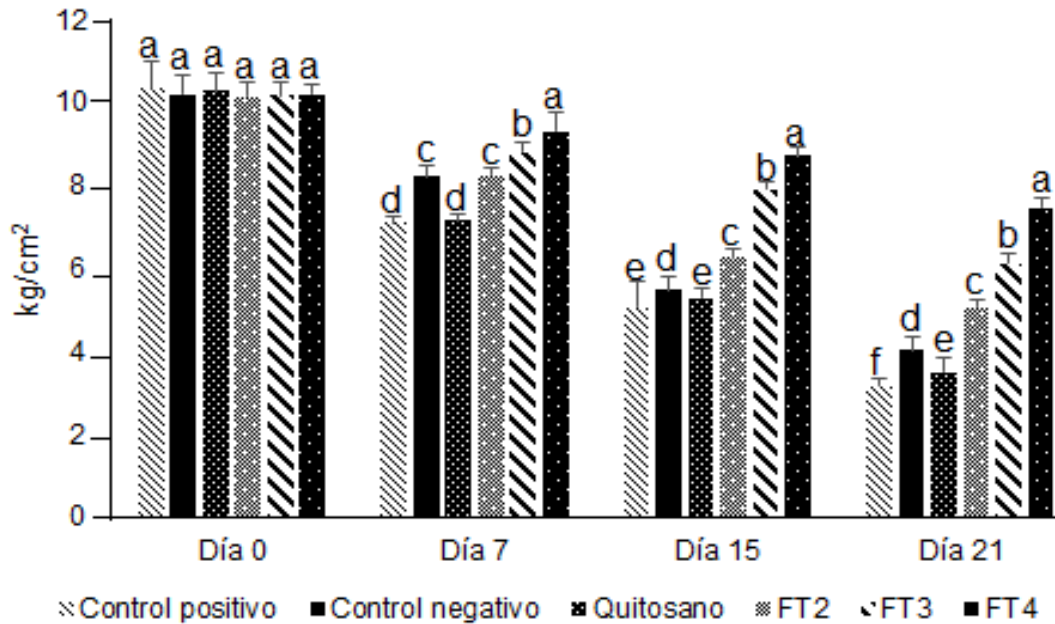


Figura 71. Evaluación de firmeza en aguacates infectados con *F. solani* vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*).

La cepa de *Clonostachys rosea* muestra que del día 0 al día 21 causa una pérdida de firmeza de 77.7% ya que su firmeza en el día 0 fue de 3.24 ± 0.3 kg/cm² y al día 21 fue de 0.72 ± 0.2 kg/cm² (Figura 72). Por el contrario, los aguacates sanos muestran una pérdida de 24% menos que el aguacate infectado al día 21.

En el caso de los aguacates tratados con las películas FC1(1.14 ± 0.1 kg/cm²), FC2(1.54 ± 0.2 kg/cm²), FC3(1.88 ± 0.1 kg/cm²) y FC4(2.04 ± 0.1 kg/cm²) al día 21. Por lo cual, se registraron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.01$ entre los tratamientos y en comparación con el grupo “control positivo”. Sin duda una vez más las películas de quitosano y aceite esencial cumplen con su función de potencializar el efecto fungicida.

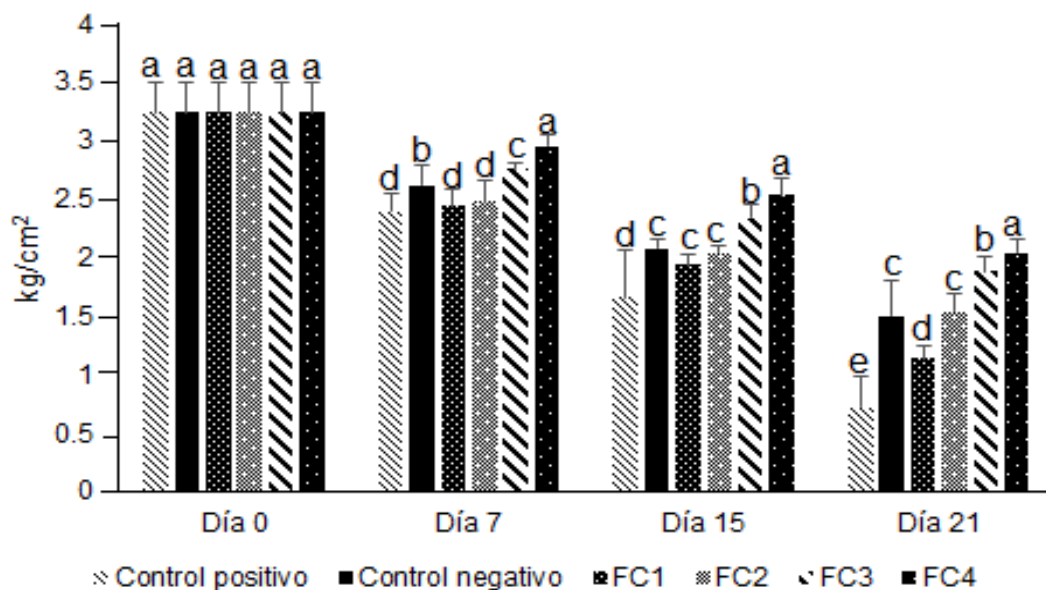


Figura 72. Evaluación de firmeza en aguacates infectados con *C. rosea* vs películas de quitosano con aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*).

Por último, se encuentra la evaluación de las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo vs *C. rosea* (Figura 73). Se observa que al día 7 solo se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con máxima concentración de aceite con respecto de los controles y los tratamientos con baja concentración de aceite. Esto mismo se observa en el día 15.

Para el día 21 ya se observa claramente una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento FT4 y FT3 con respecto de los demás grupos. Al día 21, los tratamientos FT3 y FT4 conservan más del 100% de su firmeza en comparación de un aguacate infectado con este microorganismo.

La firmeza de los aguacates tratados con los tratamientos FT1(), FT2(), FT3() y FT4() conservaron más la firmeza de los aguacates en comparación de los tratados con aceite esencial de canela.

Curiosamente, todos los aguacates tratados con el aceite esencial de canela y expuestos con diferentes microorganismos pierden la cantidad de melanina situada en el fruto. Por otra parte, con el aceite esencial de tomillo ocurre lo contrario y esto se observa en la evaluación *in vivo* y se refleja en la firmeza del fruto.

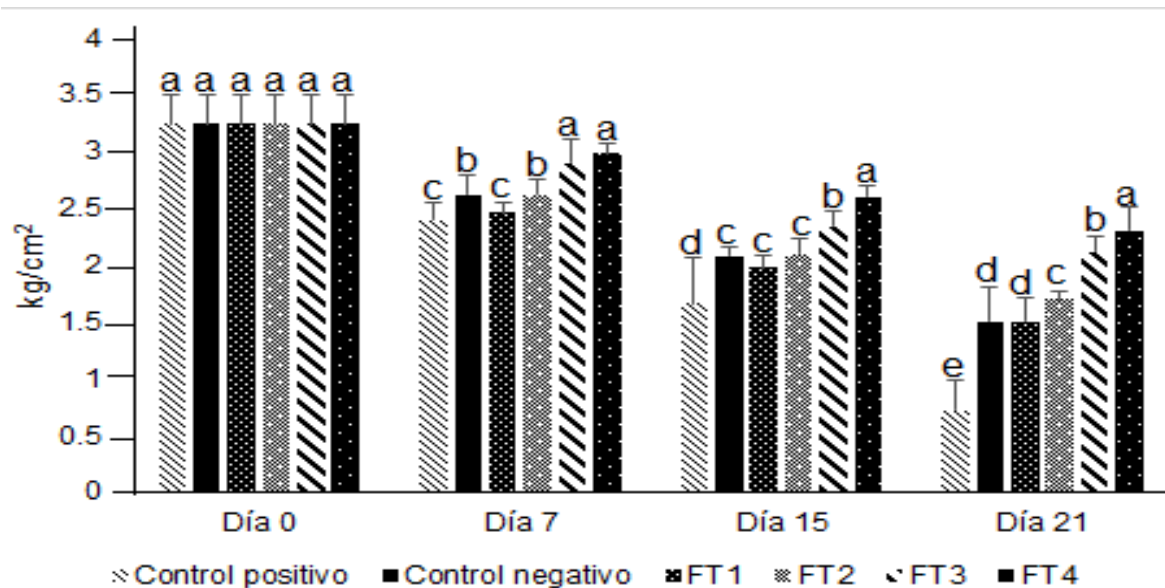


Figura 73. Evaluación de firmeza en aguacates infectados con *C. rosea* vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*).

Bello *et al.*, (2016) resalta en su trabajo de investigación que la firmeza de los frutos de aguacate poscosechado disminuyó durante el almacenamiento. Además, reportaron que los frutos recubiertos con pectina a 1.5% presentaron una mayor firmeza que los frutos que no tienen el recubrimiento. Este comportamiento puede atribuirse a la degradación de los componentes de la pared celular, principalmente pectinas, debido a la acción de enzimas específicas como la pectinesterasa y la poligalacturonasa (Huber *et al.*, 2001). Las modificaciones a nivel celular traen como consecuencia la pérdida de agua por parte de los tejidos vegetales, lo que también se ha señalado como un factor importante en los cambios de textura (Del valle *et al.*, 2005; Bello *et al.*, 2016).

7.8 Análisis bromatológico

La pulpa de aguacate contiene de 13.5 a 24 % de lípidos, 0.8 a 4.8 % de carbohidratos, 1.0 a 3.0 % de proteína y 1.4 a 3.0 % de fibra (Duarte *et al.*, 2016). Además, el aguacate es el fruto más rico en proteínas y azúcares incluida la sucrosa de entre las demás frutas (Landahl *et al.*, 2009).

De acuerdo con los resultados de los análisis bromatológicos, la cantidad de grasa, proteínas, fibra y azúcares reductores disminuyó notoriamente en los aguacates infectados con *F. verticillioides*. Este resultado puede estar relacionado con el parasitismo ejercido por el hongo al requerir nutrientes para proliferar. En el caso de la cantidad de proteínas, se observó que los aguacates infectados con *F. verticillioides* disminuyeron hasta en un 40% este parámetro al día 21 en comparación con el control negativo (aguacate sano) ($p < 0.01$). Una tendencia similar fue observada en la cantidad de fibra y azúcares reductores ($p < 0.01$). Respecto al contenido de grasa total (Figura 74A), el aguacate infectado tuvo una reducción de aproximadamente 50% al día 21 ($p < 0.01$). Es de importancia mencionar que la grasa es un parámetro muy importante para el contenido nutricional del aguacate.

Por otro lado, la cantidad de proteínas (Figura 74B) en los aguacates tratados con las películas FC1, FC2, FC3 y FC4 muestran diferencias estadísticamente significativas con el grupo control positivo. Se observa que las películas cuya concentración es 1.0% (2.5 ± 0.1 g/100g) y 1.3% (2.46 ± 0.1 g/100g) mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en el día 7. Sin embargo, a partir del día 15 es notoria la cantidad de proteínas que presenta los aguacates tratados con las películas en comparación con el grupo control.

La cantidad de grasas en los aguacates infectados disminuye a 7.1 ± 0.4 g/100g al día 21. En el caso de los aguacates que fueron tratados con las películas FC1 (11.04 ± 0.7 g/100g), FC2 (12.98 ± 0.5 g/100g), FC3 (14.68 ± 0.3 g/100g) y FC4 (14.9 ± 0.3 g/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas al día 21 ($p < 0.01$). La protección que brindan las películas y sobre todo la FC4 hace que preserven un 52.34% más de la cantidad de grasas en comparación con la cantidad hallada en un aguacate infectado. Si bien, la grasa contribuye a la mayoría de las calorías en un aguacate (Amado *et al.*, 2019). Una porción de aguacate de 1000 kJ contiene alrededor de 25 g de grasa, la mayoría de los cuales son ácidos grasos monoinsaturados saludables. El contenido de lípidos en los aguacates es más alto que en otras frutas. La mayoría de los lípidos que se encuentran en los aguacates son lípidos polares (glucolípidos y fosfolípidos), que juegan un papel fundamental

en diversos procesos celulares como el funcionamiento de las membranas celulares como segundos mensajeros (Bao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015)

La fibra constituye la mayor parte de su contenido de carbohidratos y puede alcanzar hasta 13.5 g en aguacates más grandes. La mayor cantidad de fibra insoluble y soluble (70% y 30%, respectivamente) se encuentran en la pulpa (Bhuyan *et al.*, 2019).

No obstante, la cantidad de fibra que se observó al día 21 (Figura 74D) en aguacates sanos presentaron un decaimiento natural (4.34 ± 1.43 g/100g). En cuanto a la cantidad de fibra en los aguacates tratados con la película FC1(5.72 ± 0.1 g/100g), FC2 (5.98 ± 0.8 g/100g), FC3 (6.86 ± 0.2 g/100g) y FC4 (6.92 ± 0.1 g/100g) muestran diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control positivo (3.72 ± 0.1 g/100g) al día 21 ($p < 0.01$). Se puede afirmar que las películas ejercer un efecto protector sobre el contenido de fibra. Este resultado podría estar fuertemente relacionado con los resultados de firmeza. Nuestros resultados globales sugieren que la aplicación de la película FC4 es capaz de preservar en al menos un 59.44% la composición nutrimental del aguacate Hass.

Los componentes principales de la gran mayoría de frutos son los azúcares de manera que conforme incrementa el periodo de madurez de los frutos, los niveles de azucares totales aumentan (Figura 74C). Así mismo, el porcentaje de sólidos solubles totales puede determinar el estado de madurez útil de un fruto (Torres *et al.*, 2013). A diferencia de las otras biomoléculas orgánicas, los azúcares reductores se calcularon en mg/100g de muestra. No obstante, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivos (72.58 ± 3.2 mg/100g) y los aguacates tratados con las películas FC1(214.58 ± 7.7 mg/100g), FC2(239.88 ± 12.5 mg/100g), FC3(256.3 ± 7.0 mg/100g) y FC4(266.14 ± 7.7 mg/100g) al día 21. De esta manera se afirma que las películas preservan un x en comparación con los aguacates infectados. Se observa claramente en la gráfica x que al día 7 ya se observan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). El menor índice de madurez a través de una menor evolución de los azucares se ha observado en frutos de aguacate recubiertos con cera de abeja o cera carnauba (Feygenberg *et al.*, 2005).

Cabe destacar que los frutos tratados con la película FC4 mostraron niveles estables de grasa, proteína, fibra y azúcares reductores, los cuales fueron muy similares a aquellos encontrados en los aguacates sanos. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros bromatológicos de los aguacates sanos y aquellos tratados con la película FC4. Estos resultados sugieren que el uso de la película FC4 es altamente efectiva como agente fungistático, ya que los aguacates tratados con este material ya habían sido infectados con *F. verticillioides*.

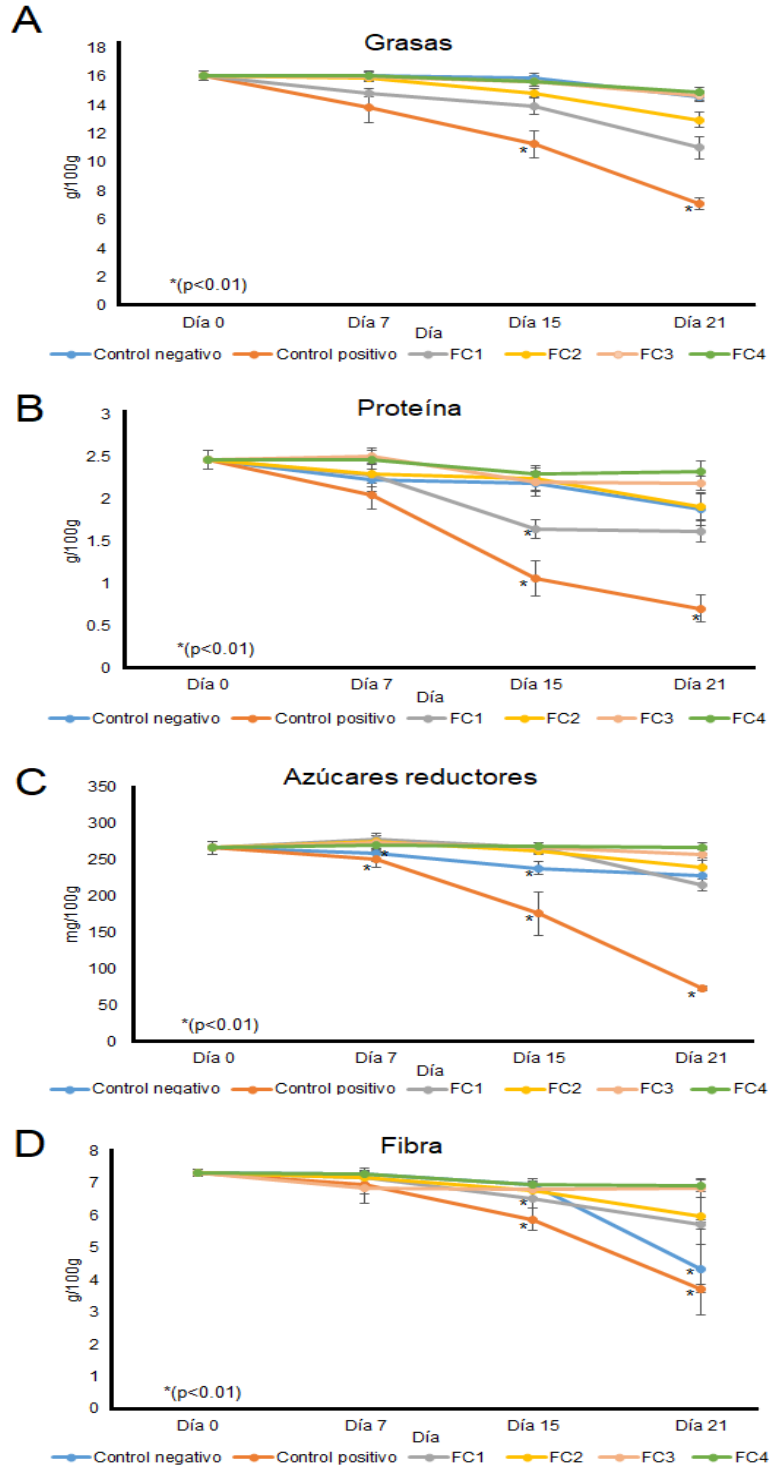


Figura 74. Cantidad de A. grasas. B, proteína. C, azúcares reductores. D, fibra en aguacates infectados con *F. verticillioides* vs películas de quitosano con aceite esencial de canela.

En el caso *F. solani*, la cantidad de grasas (Figura 75A) en los aguacates infectados disminuye a 1.36 ± 0.4 g/100g al día 21. Por lo contrario, los aguacates que fueron tratados con FT3 (13.5 ± 1.2 g/100g) y FT4 (15.025 ± 0.2 g/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas al día 21 ($p < 0.01$). Sin embargo, aquellos frutos que fueron tratados con las películas de quitosano (3.24 ± 0.8 g/100g) y FT2 (4.14 ± 0.4 g/100g) no presentaron diferencias estadísticamente significativas con los frutos infectados, pero sí con los frutos sanos al día 21. Respecto al contenido de grasa total en el aguacate infectado tuvo una reducción de más del 60% al día 21 ($p < 0.01$).

La cantidad de proteínas (Figura 75B), se observó que los aguacates infectados con *F. solani* disminuyeron hasta en un 49% al día 21 en comparación con el control negativo (aguacate sano) ($p < 0.01$). Así mismo, se observa que los aguacates infectados, aguacates con película de quitosano y con la película FT2 no presentan diferencias estadísticamente significativas ya que al día 21 presentan casi la misma cantidad de proteínas. Sin embargo, los aguacates con película FT4 (2.875 ± 0.2 g/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) incluso con respecto de un aguacate sano (2.1 ± 0.2 g/100g) ya que preserva hasta en 37% más el contenido de proteínas al día 21. Por otra parte, los azúcares reductores (Figura 75C) disminuyen hasta en 90% en frutos infectados con este microorganismo al día 21. En adición al día 21 los aguacates infectados (25.28 ± 5.9 mg/100g) y los aguacates tratados con quitosano (101.48 ± 13.2 mg/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas respecto del contenido de azúcares en un aguacate sano (203.98 ± 9.5 mg/100g) ($p < 0.01$) pero sí entre ellos. Finalmente, el contenido de fibra (Figura 75D) en aguacates infectados con *Fusarium solani* demuestra que existe también una pérdida del 90% del día 0 al día 21. Los tratamientos con quitosano (1.98 ± 0.4 g/100g) y FT2 (3.34 ± 0.2 g/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) al día 21 con respecto de los aguacates sanos ya que hay una pérdida del 70% y 21% respectivamente. Sin embargo, aunque los tratamientos FT3 (6.14 ± 0.3 g/100g) y FT4 (7.35 ± 0.1 g/100g) mantienen un poco más el contenido de fibra no es lo suficiente para presentar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con respecto del aguacate sano.

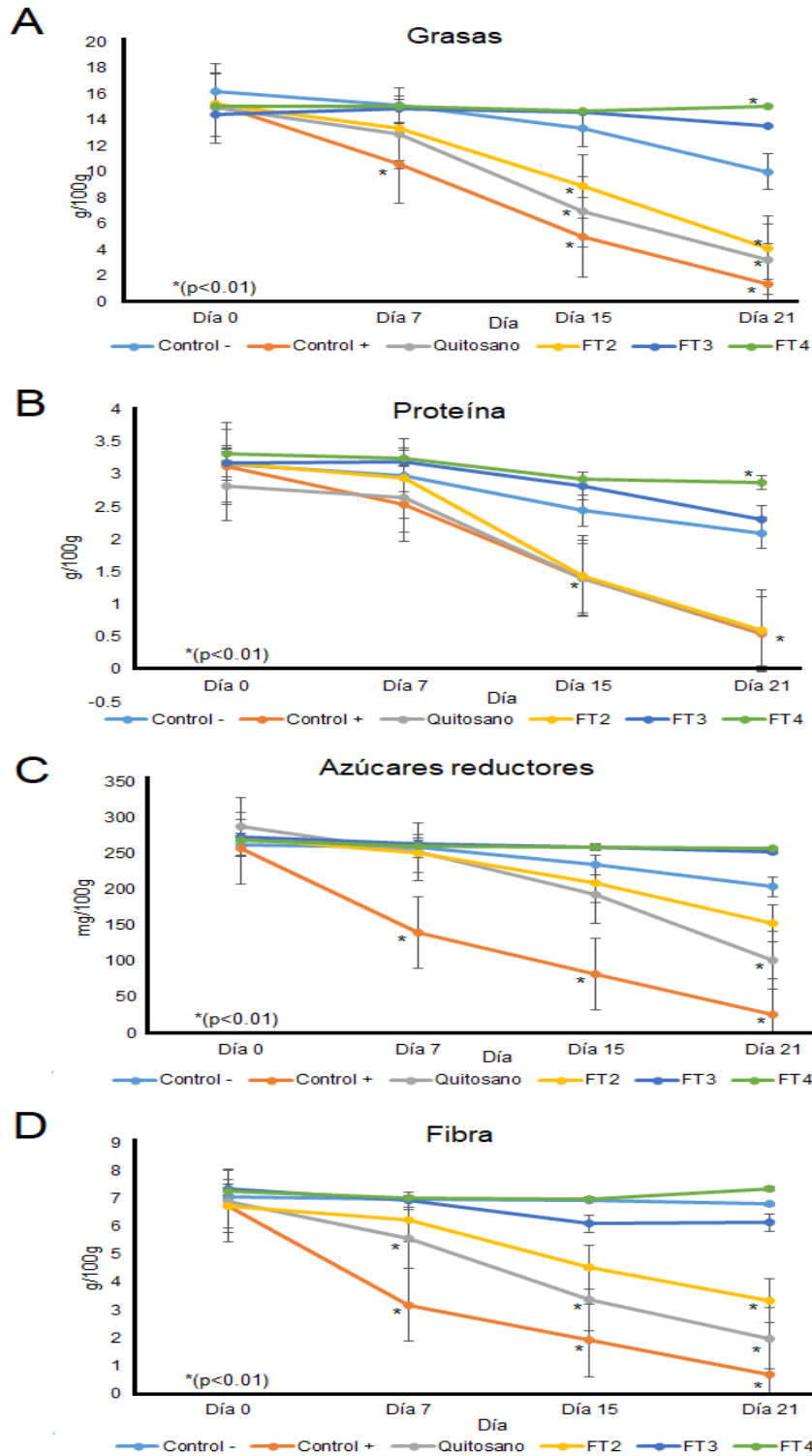


Figura 75. Cantidad de A. grasas. B, proteína. C, azúcares reductores. D, fibra en aguacates infectados con *F. solani* vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.

En cuanto a los resultados de la evaluación de las películas de quitosano con aceite esencial de tomillo contra *C. rosea* se observan en la Figura 76. En vista de que este microorganismo fue el más agresivo, los análisis demuestran una pérdida aun mayor que en los aguacates infectados contra las cepas de *Fusarium*.

En la Figura 76A se observa que la cantidad de grasas de los aguacates infectados con el microorganismo (4.68 ± 0.6 g/100g) presentan una pérdida del 70.9% del día 0 al día 21 lo cual demuestra lo mencionado anteriormente. Cabe resaltar que el tratamiento con 0.4% de aceite esencial no presenta diferencias estadísticamente significativas con los frutos infectados. Por otro lado, los tratamientos cuyas concentraciones son 1% (14.22 ± 1.3 g/100g) y 1.3% (14.44 ± 0.7 g/100g) de aceite esencial, estas si presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con el grupo control positivo. Sin embargo, entre ambas concentraciones ocurre lo contrario, es decir que no hay diferencias estadísticamente significativas. En cambio, un aguacate tratado con la película FT4 resguarda el 16.8% del contenido de grasas más que un aguacate sano.

En el caso de la cantidad de proteínas (Figura 76B), se observó que los aguacates infectados disminuyeron hasta en un 78.6% al día 21 en comparación con el control negativo (aguacate sano) ($p < 0.01$). En adición, la cantidad de proteínas presente en los aguacates tratados con las películas FT4 (2.42 ± 0.08 g/100g) muestran diferencias estadísticamente significativas con el grupo control negativo al día 21. Además, un aguacate tratado con las películas FT1, FT2, FT3 y FT4 resguardan en mayor porcentaje de proteínas contenidas en el aguacate que en un aguacate infectado con el microorganismo al día 21.

Para la cantidad de azúcares reductores (Figura 76C), se observa que un aguacate infectado pierde el 76.8% del día 0 al día 21. En base a esto, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con respecto de los demás tratamientos. Así mismo, al día 21 los aguacates tratados con FT3 y FT4 presentan diferencias estadísticamente significativas con aguacates sanos (216.58 ± 5 mg/100g) ya que preservan el 9.6% y el 20% respectivamente.

Finalmente, la cantidad de fibra en aguacates infectados y tratados con FT1 presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en el día 15 y 21

con respecto a los otros tratamientos. Así mismo, en el día 21 el aguacate tratado con la película FT4 presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con respecto al aguacate sano.

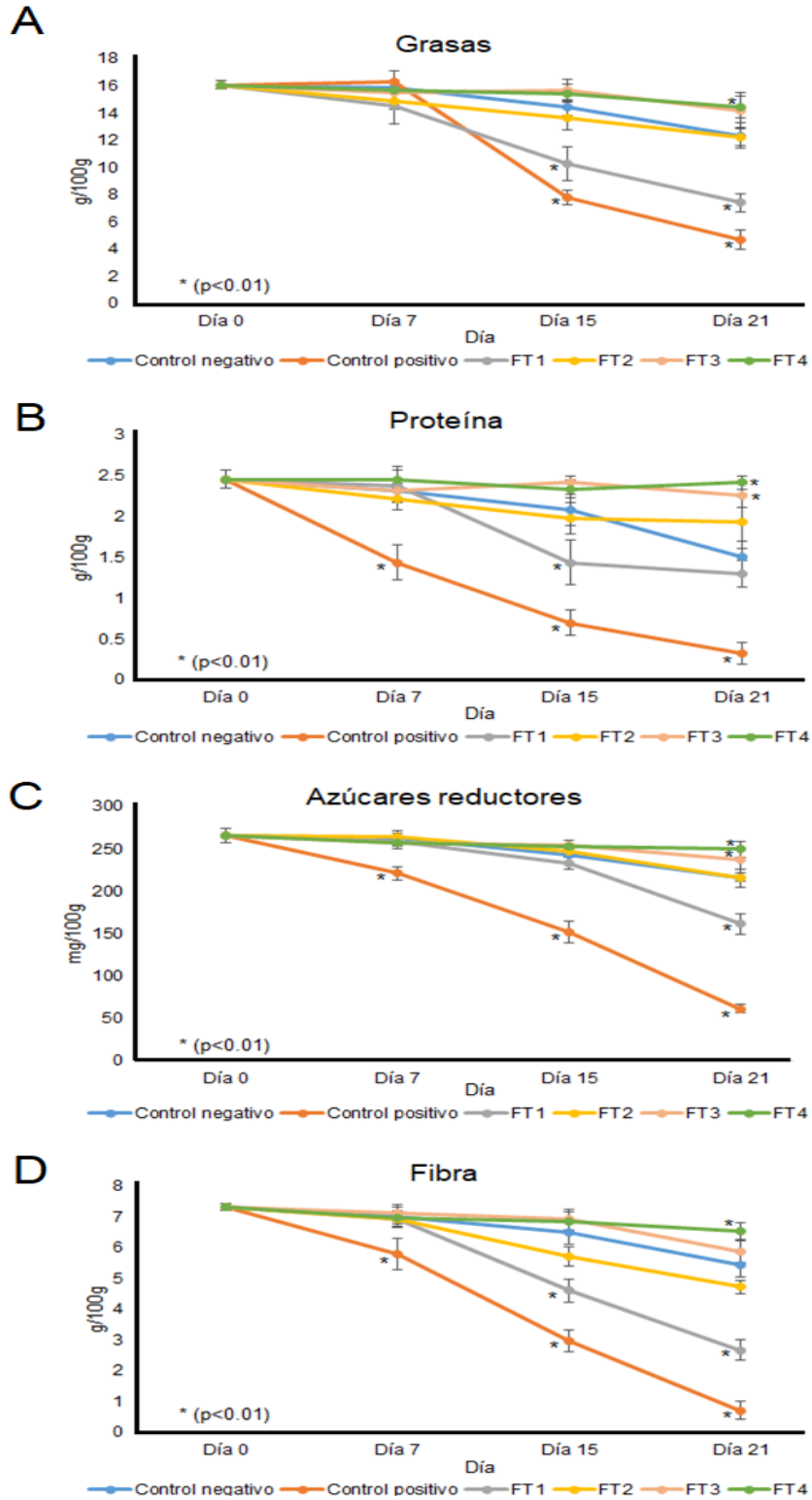


Figura 76. Cantidad de A. grasas. B, proteína. C, azúcares reductores. D, fibra en aguacates infectados con *C. rosea* vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.

7.9 Determinación de ácidos grasos.

El ácido oléico es el principal ácido graso del aguacate, representando el 45% de sus ácidos grasos totales (de Melo *et al.*, 2019), y durante el proceso de maduración, el contenido de ácido palmítico disminuye y el contenido de ácido oleico aumenta (Carvalho *et al.*, 2015).

Otros ácidos grasos presentes incluyen los ácidos palmítico y palmitoleico con cantidades más pequeñas (Bao *et al.*, 2011; Bhuyan *et al.*, 2019). Sin embargo, las composiciones de estos ácidos grasos dependen en gran medida de los cultivares, la etapa de madurez y parte de la fruta y la ubicación geográfica del crecimiento de la planta (Duarte *et al.*, 2016).

Adicionalmente, el ácido linoléico (Figura 77A) es un ácido graso poliinsaturado que cubre del 8%-13% del total de la composición lipídica. Este ácido graso al día 15 ya presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre los aguacates tratados con la película y el aguacate infectado con el microorganismo denotando que este ácido graso se preserva en mayor contenido en los aguacates que fueron cubiertos con las películas de quitosano y aceite esencial de canela. Este ácido graso fue el que más se preservó en aguacates tratados con película hasta en un 44.0% a 61.4% al día 21 en comparación con los otros tres estudiados en este trabajo.

Por otro lado, se encuentra el ácido oléico (Figura 77B), del cual se demuestra que del día 15 al día 21 se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con el aguacate infectado. Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre el aguacate sano y los tratamientos con película FC3 y FC4.

El ácido palmítico (Figura 77C) es un ácido graso saturado que conforma entre el 16% y 20% de la composición lipídica. El contenido de este ácido graso se pierde hasta en un 51.1% en un aguacate infectado al día 21. No obstante, los aguacates tratados con las películas muestran una preservación hasta el día 21 de 41.8% a 52.2% más que en un aguacate infectado. De lo cual, notoriamente los tratamientos con las películas demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en comparación con el aguacate infectado.

Al final, se observó que el contenido de ácido palmítico en aguacates tratados y no tratados con la película es bajo mientras que el contenido de ácido oleico es alto debido a la madurez del fruto lo cual concuerda con Carvalho *et al.*, (2015) donde observan que el ácido palmítico disminuyó significativamente con estados crecientes de madurez del fruto (23.8-16.9%), mientras que el ácido oleico aumentó ligeramente con la madurez (56.5-59.1%). Así mismo, Bhuyan *et al.*, (2019) y de Melo *et al.*, (2019) mencionan lo mismo al dar a conocer el aporte nutrimental de un aguacate.

Si bien se conoce que el ácido palmitoleico y el ácido oleico son ácidos grasos monoinsaturados que conforman entre el 66% y 72% del total de su composición lipídica (Vivero *et al.*, 2019). En el primer caso, el contenido de ácido palmitoleico (Figura 77D) en los primeros 7 días no se registran diferencias. Sin embargo, al día 15 ya se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre el aguacate infectado y los aguacates tratados con las películas. Al día 21, los aguacates tratados con las películas FC1, FC2, FC3 y FC4 presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) incluso contra el aguacate sano. Se observa que el recubrimiento resguarda entre el 40.4% a 50.5% del contenido de este ácido en comparación con el aguacate infectado. Además, si se compara el aguacate sano contra los aguacates tratados con película, se preserva entre el 18.4% al 30% más que un aguacate sano.

En el caso del ácido palmitoléico y el ácido linoleico se llevan por un 8% más que el ácido linoleico lo cual Carvalho *et al.*, (2015) menciona en su estudio que el contenido de ácido palmitoleico aumentó significativamente con la etapa de madurez para todas las localidades de su estudio y el linoleico disminuyó ligeramente con la maduración.

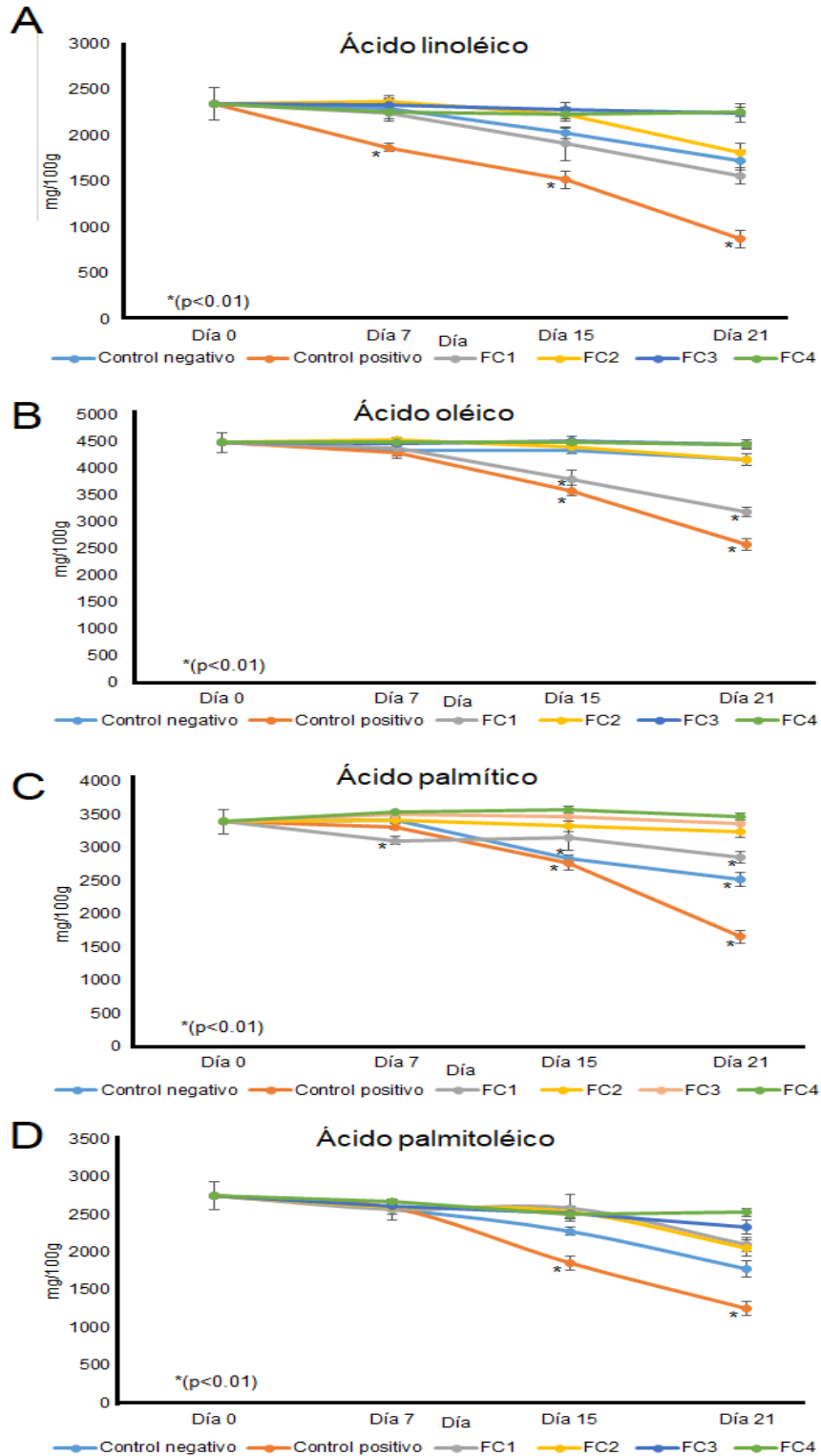


Figura 77. Contenido de A, ácido linoléico. B, oléico. C, palmítico. D, palmitoléico en aguacates infectados con *F.verticillioides* vs películas de quitosano con aceite esencial de canela.

Para *F. solani*, la cantidad de ácido linolèico (Figura 78A) en los aguacates infectados disminuye a 491.02 ± 120.34 mg/100g al día 21. Por lo contrario, los aguacates que fueron tratados con FT4 (2489.7 ± 65.72 mg/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas al día 21 ($p < 0.01$) con respecto de aguacates sanos. Sin embargo, aquellos frutos que fueron infectados y otros tratados con las películas de quitosano ($11.91.04 \pm 123.2083$ mg/100g) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero sí con los frutos sanos al día 21. Respecto al contenido de ácido linoléico total en el aguacate infectado tuvo una reducción de más del 70% al día 21 ($p < 0.01$).

La cantidad de ácido oléico (Figura 78B), se observó que los aguacates infectados con *F. solani* disminuyeron hasta en un 44.6% al día 21 en comparación con el control negativo (aguacate sano) ($p < 0.01$). Así mismo, se observa que los aguacates infectados (2007.06 ± 1106 mg/100g), aguacates con película de quitosano presentan diferencias estadísticamente significativas al día 21 con respecto de los aguacates sanos. Sin embargo, los aguacates con película FT4 (4432.9 ± 53.97 mg/100g) no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con respecto de un aguacate sano al día 21.

Por otra parte, ácido palmítico (Figura 78C) disminuyen hasta en 63.5% más en frutos infectados con *Fusarium solani* al día 21 que en frutos sanos. En adición al día 21 los aguacates infectados (910.44 ± 69.54 mg/100g) y los aguacates tratados con quitosano (1653.76 ± 79.97 mg/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas respecto del contenido alojado en un aguacate sano (2497.84 ± 89.10 mg/100g) ($p < 0.01$). De la misma forma los aguacates tratados con las películas FT3 y FT4 presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al aguacate sano ya que preservan el 37.14% y 40% respectivamente.

Finalmente, el contenido de ácido palmitoleico (Figura 78D) en aguacates infectados con *Fusarium solani* demuestra que existe también una pérdida del 67.6% con respecto del aguacate sano al día 21. Los tratamientos con quitosano (935.7 ± 55.4 mg/100g) y FT2 (1387.58 ± 100 mg/100g) presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) al día 21 con respecto de los aguacates sanos. Sin embargo, aunque los tratamientos FT3 (2499.74 ± 45.17 mg/100g) y

FT4(2588.6±65.6 mg/100g) mantienen un poco más el contenido de este ácido no es lo suficiente para presentar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con respecto del aguacate sano.

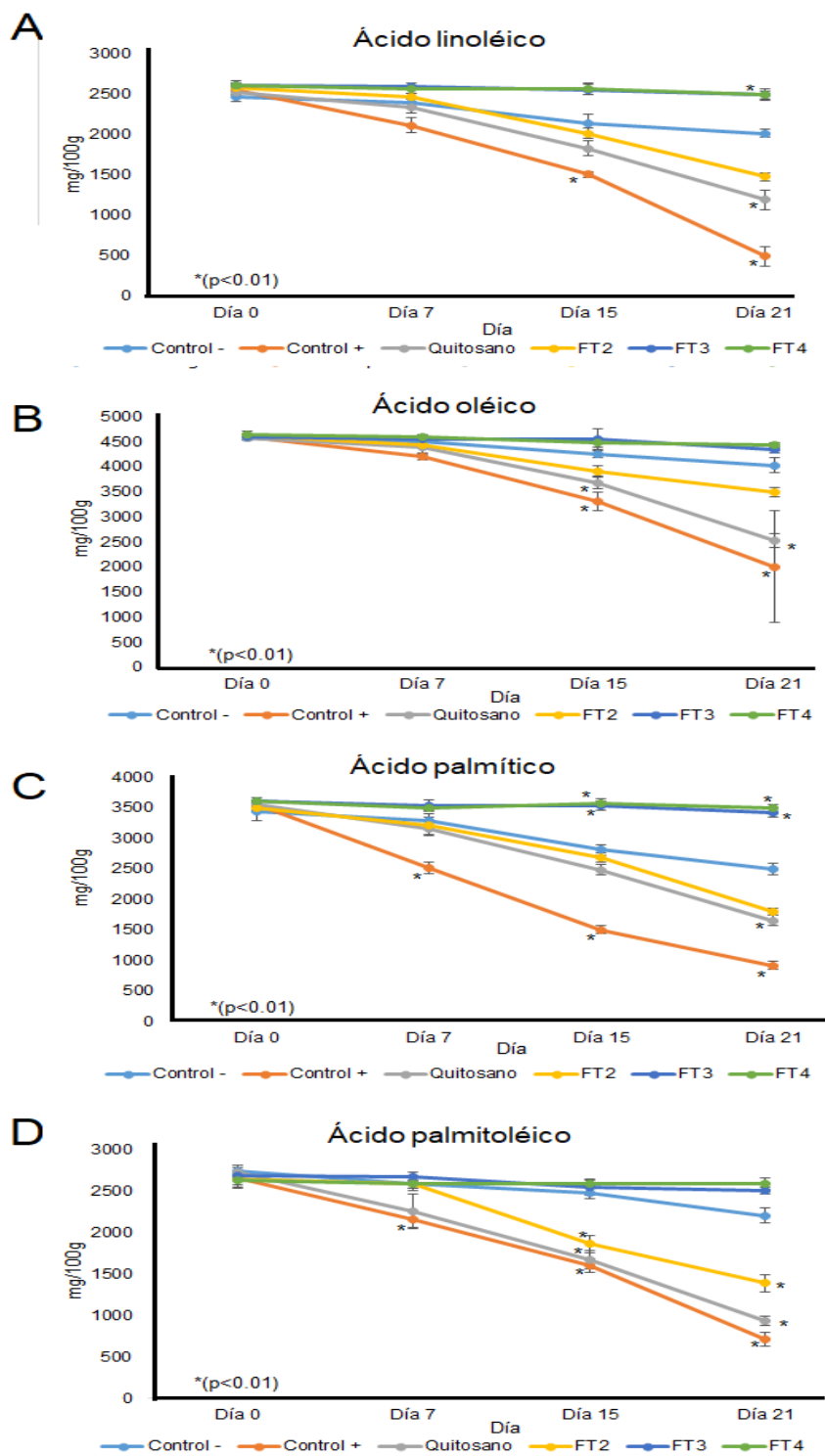


Figura 78. Contenido de A, ácido linoléico. B, oléico. C, palmítico. D, palmitoléico en aguacates infectados con *F. solani* vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.

En la Figura 79A se observa que el contenido de ácido linoléico en un aguacate infectado presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) desde el día 7 al día 21 con respecto a los demás. También se observa que la pérdida de este ácido graso en el aguacate infectado es de 78.7% del día 0 al día 21. Para el día 15, FT1 (646.88 ± 47.6 mg/100g) ya presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con respecto de un aguacate sano (1941.54 ± 60.7 mg/100g). Siendo así que al día 21 los tratamientos FT3 y FT4 preservan el 24.5% y 26.6% el contenido de ácido linoléico que en un aguacate sano.

El contenido de ácido oléico (Figura 79B) en un aguacate infectado disminuye en un 70.8% del día 0 al día 21. Además, este grupo presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) desde el día 7. No obstante, los tratamientos FT3 y FT4 nuevamente preservan el contenido de ácido que en un aguacate sano. Entre los tratamientos se presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) ya que mientras las concentraciones altas preservan el contenido de este ácido, las concentraciones bajas o bien presentan una cantidad casi igual al fruto infectado (FT1) o al fruto sano (FT2).

Por otra parte, la cantidad de ácido palmítico (Figura 79C) contenido en el fruto infectado presenta diferencias estadísticamente significativas desde el día 7 con respecto a los demás tratamientos. Se puede observar una pérdida del 63.2% del día 0 al día 21. Sin embargo, al día 21 los aguacates con el tratamiento FT4 preservan 2112.52 mg/100g más que un aguacate infectado. Y con respecto a un aguacate sano, el tratamiento FT4 mantiene 557.34 mg/100g de lo cual la película nuevamente preserva el contenido nutrimental de un aguacate en comparación de un aguacate que no lleva tratamiento.

Por último, en la Figura 79D se observa indiscutiblemente que el aguacate infectado al día 7 pierde más del 50% de su contenido. Y es a partir de este día hasta el día 21 que se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) con respecto de los demás tratamientos. Así mismo, la cantidad de ácido palmitoléico contenido en un aguacate tratado con FT2 (2066.82 ± 113.09 mg/100g) y un aguacate sano (2093.24 ± 81.07 mg/100g) no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas al día 21. Pero si hay diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre el contenido de ácido palmitolèico en un aguacate tratado con FC4 y un aguacate sano al día 21.

Los cambios en el contenido de ácidos grasos alojados en un aguacate pueden estar relacionado con la madurez del fruto y al metabolismo por el cual pasen los ácidos grasos durante la respiración del fruto. Ozdemir & Topuz (2004) mencionan que en aguacates Hass y Fuerte durante periodos de cosecha y poscosecha la composición de ácidos grasos en especial el ácido oleico aumentó significativamente con una cosecha tardía y otros ácidos grasos disminuyeron. Tal es el caso del ácido palmítico ya que en su estudio disminuyó 46.5% entre entre el mes de noviembre y enero.

Otros trabajos como el de Villa *et al.*, (2011) reportaron al ácido oléico como el principal ácido graso ya que conforma entre el 67-70% del total de la composición lipídica en aguacates 'Hass', observando un aumento significativo de ácidos grasos monoinsaturados y saturados durante la maduración del aguacate, mientras que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados disminuyó. Así mismo, Landahl *et al.*, (2009) y Pedreschi *et al.*, (2014) observaron una acumulación de ácidos en frutos de aguacate 'Hass' durante su maduración.

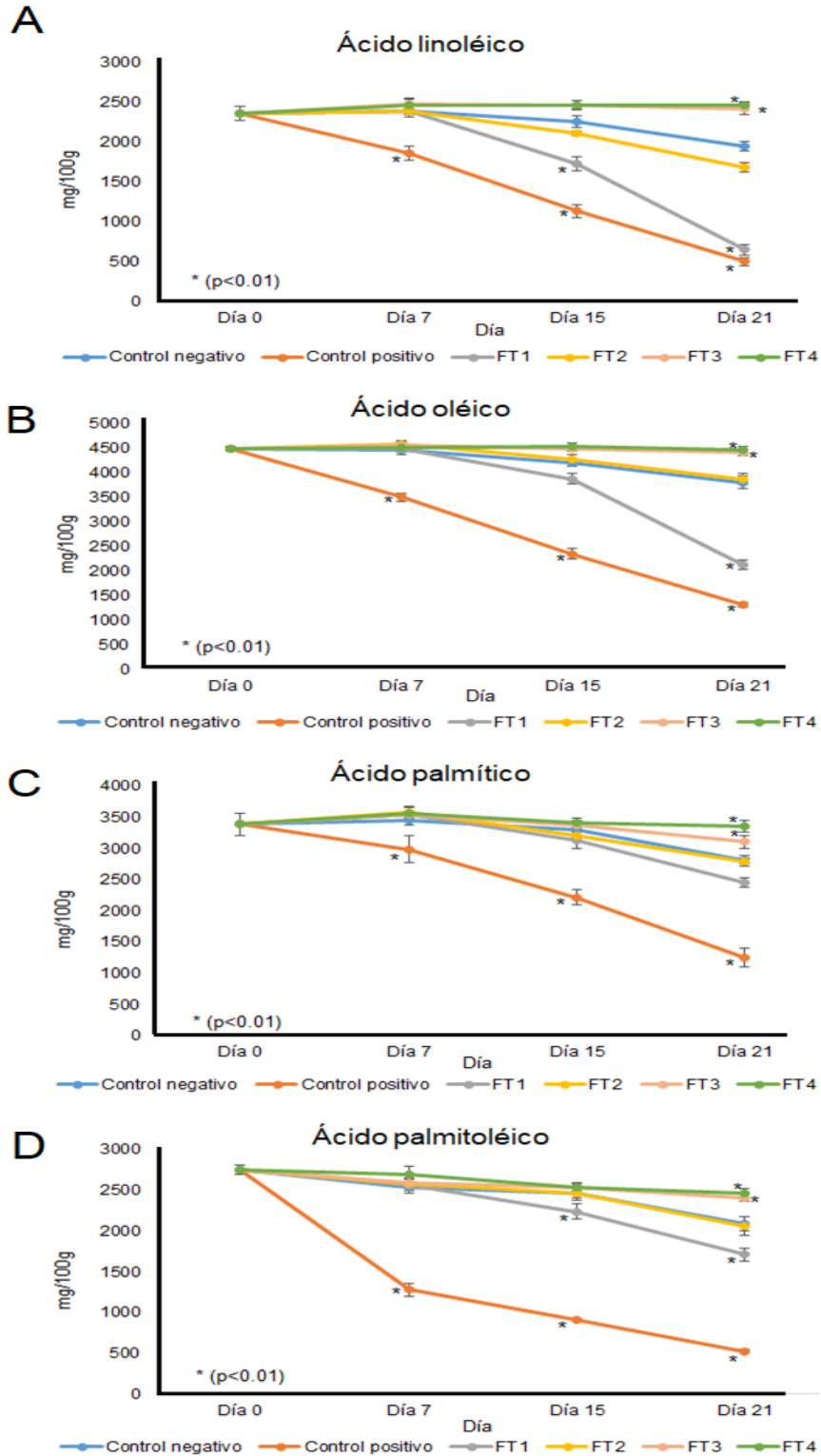


Figura 79. Contenido de A, ácido linoléico. B, oléico. C, palmítico. D, palmitoléico en aguacates infectados con *C. rosea* vs películas de quitosano con aceite esencial de tomillo.

8. CONCLUSIONES

Actualmente el uso de aceites esenciales está en tendencia como antimicrobiano. Sin embargo, no es común su uso en frutos poscosechados. Es por ello que se encontró una alternativa para poder hacer uso de tecnologías que promuevan una agricultura orgánica. Esta tecnología fue la elaboración de materiales que comprobaron ser efectivos contra hongos silvestres de aguacate Hass poscosechado de Yaonáhuac, Puebla.

En primera se logró caracterizar cada uno de los hongos demostrando que el género *Fusarium* (*F. verticillioides* y *F. solani*) sigue presente como hongo fitopatógeno y *Clonostachys rosea* se ha desarrollado como hongo fitopatógeno de aguacate Hass. Cabe resaltar que *Clonostachys rosea* presentó mayor daño en el fruto a comparación de los otros hongos pertenecientes al género *Fusarium*.

Por otro lado, dentro de los aceites esenciales que se obtuvieron, el aceite de citronela, el falso laurel, canela y tomillo presentan un buen rendimiento. Pero de los siete aceites esenciales los más efectivos fueron el aceite esencial de tomillo y aceite esencial de canela con MIC de hasta 3.0 mg/mL.

Así mismo, se prepararon dos tipos de arcillas impregnadas con aceite de canela y ambos materiales generados fueron caracterizados para demostrar que en su composición química se encuentra impregnado el aceite esencial de canela. Los materiales híbridos resultantes fueron empleados en la inhibición del hongo *C. rosea*. Los resultados indicaron que la halloysita CANF1 tuvo una MIC de 3.33 mg/mL y la hidrotalcita CANF2 una MIC de 1.66 mg/mL, demostrando que los dos materiales híbridos son muy efectivos como agentes fungicidas, y que, además, la hidrotalcita impregnada con canela resultó ser más activa que la halloysita también impregnada. Cada hongo demostró que afecta la calidad del fruto que a la larga afecta la economía de cada eslabón de la producción y distribución del fruto. Se observó que a lo largo de 21 días los hongos caracterizados y sobre todo *Clonostachys rosea* disminuye el contenido nutrimental del fruto en más del 50% del contenido total.

El uso de las películas de quitosano con aceite esencial demostró conservar la firmeza del fruto. En adición, específicamente el aceite esencial de tomillo mantiene la pigmentación verde del aguacate (melanina) durante 21 días en comparación con

el aceite esencial de canela. Este parámetro de calidad va de la mano con el contenido de fibra alojado en el fruto.

Por otra parte, el contenido de los ácidos grasos estudiados demuestra que el uso del recubrimiento resguarda su concentración a lo largo de 21 días en comparación con el aguacate infectado con el microorganismo. Así mismo, las películas con 0.4%, 0.7% presentan un comportamiento similar al del aguacate infectado. En base a esto, se demostró que principalmente el uso de películas impregnadas con las concentraciones altas (1.0% y 1.3%) de aceite esencial inhiben el crecimiento del microorganismo y elongan la vida de anaquel del fruto conservando sus propiedades físico-químicas. El uso de películas como posibles empaques permite prolongar la vida útil del producto, evita la transpiración, es biodegradable y no es tóxica.

Una prueba más de que actualmente se puede optar por una agricultura sana. Una agricultura sin uso de agroquímicos que afectan a productores, consumidores y el medio ambiente principalmente el suelo porque es el que brinda el sustento alimenticio para cada persona. E incluso la naturaleza nos brinda material vegetal que puede erradicar este uso que poco a poco deteriora el estado del planeta.

9. LITERATURA CITADA.

1. Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass, third ed. Allured Publishing Co., Illinois
2. Afshari, N. & Hemmati, R. (2017). First report of the occurrence and pathogenicity of *Clonostachys rosea* on faba bean. Australasian plant pathology society 46(3): 231-234. <https://dx.doi.org/10.1007/s13313-017-0482-3>
3. Amado, D. A. V., Detoni, A. M., De Carvalho, S. L. C., Torquato, A. S., Martin, C.A., Tiuman, T.S., Aguilar, C. M. & Cottica S. M. (2019). Tocopherol and fatty acids content and proximal composition of four avocado cultivars (*Persea americana* mill). Acta Alimentaria 48:47-55. <https://dx.doi.org/10.1556/066.2019.48.1.6>
4. Amortegui, F. I., Campera, D. E. & Godoy, A. J. V. (2001). Cultivo de aguacate. Módulo para el desarrollo tecnológico de la Comunidad Rural. Corporación para la Promoción del Desarrollo Rural y Agroindustrial de Tolima - PROHACIENDO 49pp. <http://hdl.handle.net/11348/4911>
5. Anwar, W., Ali, S., Nawaz, K., Iftikhar, S., Javed, M. A., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Fathi, E., Allah, A., Akhter, A. (2018). Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). Biocontrol Science and Technology, 28(8), 750–760. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1487030>
6. AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC international, 18th edn. AOAC International, Gaithersburg
7. Arpaia, M. L., Collin, S., Sievert, J. & Obenland, D. (2018). ‘Hass’ avocado quality as influenced by temperature and ethylene prior to and during final ripening. Postharvest Biology and Technology 140(1): 76-84. <https://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.015>
8. Arras, G. & Usai, M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. Journal of Food Protection 64(7):1025-1029. <https://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-64.7.1025>
9. Aular, J. & Casares, M. (2011). Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. Revista Brasileira de Fruticultura E:187-198. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500022>
10. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. Food and Chemical Toxicology 46(2):446-475. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
11. Bao, J., Atkinson, F., Petocz, P., Willett, W. C. & Brand, M. J. C. (2011). Prediction of postprandial glycemia and insulinemia in lean, young, healthy adults: Glycemic load compared with carbohydrate content alone. The American Journal of Clinical Nutrition 93:984–996.

12. Barrera, N. L. L. & García, B. L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de Papaya (*Carica papaya*). Revista UDO Agrícola 8 (1):33-41.
13. Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., CorreaPacheco, Z., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. Revista Chapingo Serie Horticultura 23(2), 103-121. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
14. Bello, L. J. E., Balois, M. R., Sumaya, M. M.T., Juárez, L. P., Jiménez, R. E. I., Sánchez, H. L. M., López, G. G. G. & García, P. J. D. (2016). Biopolímeros de mucilago, pectinade nopalitos y quitosano, como recubrimiento en almacenamiento y vida de anaquel de frutos de aguacate Hass. Acto agrícola y pecuaria 2(2):43-50.
15. Berechet, M. D., Gaidau, C., Miletic, A., Pilic, B., Râpă, M., Stanca, M., Ditu, L. M., Constantinescu, R. & Lazea-Stoyanova, A. (2020). Bioactive properties of nanofibres based on concentrated collagen hydrolysate loaded with thyme and oregano Essential Oils. Materials (Basel, Switzerland) 13(7):1618. <https://dx.doi.org/10.3390/ma13071618>
16. Berúmen, V. G., Conrado, P. L. D., Ochoa, J. V. A., Chacón, L. M. A. & Gutiérrez, M. P. (2015). Efecto del quitosano en la inducción de resistencia contra *Colletotrichum sp.* en mango (*Mangifera indica L.*) cv. Tommy Atkins. Investigación y ciencia, 23(66):16-21.
17. Bhuyan, D. J., Alsherbiny, M. A., Perera, S., Low, M., Basu, A., Devi, O. A., Barooah, M. S., Li, C. G. & Papoutsis K. (2019). The Odyssey of bioactive compounds in avocado (*Persea americana*) and their health benefits. Antioxidants 8(10),53. <https://dx.doi.org/10.3390/antiox8100426>.
18. Bienapfl, J. C., Floyd, C. M., Percich, J. A., Malvick, D. K. (2012). First report of *Clonostachys rosea* causing root rot of Soybean in the United States. Plant Disease 96(11), 1700. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0550-PDN>
19. Bill, M., Sivakumar, D., Thompson, A. K. & Korsten, L. (2014). Avocado fruit quality management during the postharvest supply chain. Food Reviews International 30(3), 169–202. <https://dx.doi.org/10.1080/87559129.2014.907304>
20. Bosquez-Molina, E., Ronquillo-de Jesús, E., Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J. R. & Morales-López, J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. Postharvest Biology Technology. 57:132-137. <https://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.008>
21. Canales, D., Montoille, L., Rivas, M. L., Andrés, O. J., Yañez, S. M., Rabagliati, F. M., Ulloa, M. T., Alvarez, E. & Zapata, P.A. (2019). Fungicides films of low-density polyethylene (LDPE)/inclusion complexes (carvacrol and cinnamaldehyde) against *Botrytis cinerea*. Coatings 9:795. <https://doi.org/10.3390/coatings9120795>

22. Carvalho, C. P., Bernal, E. J., Velásquez, M. A., & Cartagena, V. J. R. (2015). Fatty acid content of avocados (*Persea americana Mill. cv. Hass*) in relation to orchard altitude and fruit maturity stage. *Agronomía Colombiana* 33:220-227. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n2.49902>
23. Catauro, M., Bollino, F., Tranquillo, E., Sapio, L., Illiano, M., Caiafa I. & Naviglio, S. (2017). Chemical analysis and anti-proliferative activity of Campania *Thymus vulgaris* essential oil, *Journal of Essential Oil Research* 29(6):1-10. <https://dx.doi.org/10.1080/10412905.2017.1351405>
24. Chadha, S., & Kale, S. P. (2015). Simple fluorescence-based high throughput cell viability assay for filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 61(3), 238–244. <https://doi.org/10.1111/lam.12460>
25. Chávez, M. M. E., Gutiérrez, M. P., Montaña, L. B. & González, E. R. R. (2019). Evaluación in vitro del quitosano y aceites esenciales para el control de dos especies patógenas de *Colletotrichum* aisladas de aguacate (*Persea americana Mill*). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 2, 1-8. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.189>.
26. Coy, B. C. A. & Eunice, A. G. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18(2):237-246.
27. Cruz-Hernández, M., Velázquez-Herrera, F. D., Giovanela, M., da Silva, C. J. & Fetter, G. (2020) Synthesis of novel hybrid melanin-hydrotalcite with potential lethal activity against microorganisms. *Materials Letters*. <https://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2020.128442>
28. Damián, R. F., Roche, L. A., Bianchi, M. A., Languasco, J. M. & Rocca, P. D. (2016). Análisis químico de las especias: tomillo y salvia. *Proyecciones*, 14(1):89-96.
29. Das, S., Kumar, S. V., Kumar, C. A., Kumar, D. A. & Kishore, D. N. (2021). Fabrication, physico-chemical characterization, and bioactivity evaluation of chitosan-linalool composite nano-matrix as innovative controlled release delivery system for food preservation. *International Journal of Biological Macromolecules* 188:751-763. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.045>.
30. Del Valle, V., Hernández, M. P., Guarda, A. & Galotot, M. J. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its applications to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry* 91:751-756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.002>
31. de Melo, M., Pereira, D. E., Moura, R. L., da Silva, E. B., de Melo, F., Dias, C., Silva, M., de Oliveira, M., Viera, V.B., Pintado, M., Dos Santos, S. G. & Soares, J. (2019). Maternal supplementation with avocado (*Persea americana Mill.*) pulp and oil alters reflex maturation, physical development, and offspring memory in rats. *Frontier Neuroscience* 13:9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00009>

32. Deshmukh, A. R., Aloui, H., Khomlaem, C., Negi, A., Yun, J., Kim, H. & Soo, B. (2021). Biodegradable films based on chitosan and defatted *Chlorella* biomass: Functional and physical characterization. *Food Chemistry* 337:127777. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127777>
33. Duarte, P. F., Chaves, M. A., Borges, C. D. & Mendonça, C. R. B. (2016). Avocado: Characteristics, health benefits and uses. *Ciencia Rural* 46:747–754. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141516>
34. Dugassa, A., Alemu, T. & Woldehawariat, Y. (2021). In-vitro compatibility assay of indigenous *Trichoderma* and *Pseudomonas* species and their antagonistic activities against black root rot disease (*Fusarium solani*) of faba bean (*Vicia faba L.*). *BMC Microbiology* 21(1):115. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02181-7>
35. Duque-Bautista H, Zurita-Vásquez, G. G, Pacheco-Hernández, Y. & Villa-Ruano, N. (2017). Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: An in vitro approach towards its biological control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(2):326-337. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1701-2>
36. Escobedo-Morales, A., Esparza, R., García-Ruiz, A., Aguilar, A., Rubio-Rosas, E., & Pérez, R. (2011). Structural and vibrational properties of hydrothermally grown ZnO₂ nanoparticles. *Journal of Crystal Growth* 316(1):37–41. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2010.12.057>
37. Espinoza-Ahumada, C. A., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cepeda-Siller, M. & Castillo-Reyes, F. (2019). Antagonistas microbianos a *Fusarium spp.*, como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* 6(16):45-55. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1843>
38. FAO. (2019) Pérdida y desperdicio de alimento: enfoque de las cuestiones. *El estado mundial de la agricultura y alimentación 2019*. 1-20.
39. Fernández, V. D., Bautista, B. S., Fernández, V. D., Ocampo, R. A., García, P. A., Falcón, R. A. 2015. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 24:52-57.
40. Feygenberg, O., Hershkovitz, V., Ben, A.R., Jacob, S., Pesis, E. & Nikitenko, T. (2005). Postharvest use of organic coating for maintaining bioorganic avocado and mango quality. *Acta Horticulturae* 682:507-512. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.682.62>
41. Genc, Z. K., Canan, A. C., Acar, S. S., Şekerci, M. & Genc, M. (2015). Preparation and thermal properties of heterogeneous composite phase change materials based on camphene–palmitic acid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 120(3). <https://dx.doi.org/10.1007/s10973-015-4478-3>
42. Guerrero-Lagunes, L. A., Ruiz-Posadas, L. M., Rodríguez-Mendoza, M. N., Soto-Hernández, M. & Castillo-Morales, A. (2011). Efecto del cultivo hidropónico de tomillo (*Thymus vulgaris*

- L.) en la calidad y rendimiento del aceite esencial. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(2):141-149.
43. Gutiérrez, T. J. & Alvarez, V. A. (2017). Eco-friendly films prepared from plantain flour/PLC blends under reactive extrusion conditions using zirconium octanoate as a catalyst. Carbohydrate Polymers 178:260-269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.026>
 44. Guzmán-Gutiérrez S. L., Gómez-Cansino, R., García-Zebadúa, J. C., Jiménez-Pérez, N. C. & Reyes-Chilpa, R. (2012). Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. Journal of Ethnopharmacology 143(2):673–679. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.026>
 45. Hernández, L. M., Guillén, S. J., Bautista, B. S. & Guillén, S. D. (2018). Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos postcosecha de la papaya. Cultivos Tropicales 39(1):52-60.
 46. Hernández-Medina, C. A., Henao-Henao, E. D., Velasco-Belalcázar, M. L. & Gómez-López, E. D. (2015). Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Fusarium* asociadas aguacate (*Persea americana* Mill), en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana 39(2): 51-56.
 47. Huber, D. J., Kaarkurt, Y. & Jeon, J. (2001). Delay of avocado (*Persea americana*) fruit ripening by 1-methylcyclopropene and wax treatments. Postharvest Biology and Technology 28:171-175. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00176-X)
 48. IPGRI. (1995). Descriptores para aguacate (*Persea spp.*), Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. 54 p.
 49. Jabir, M. S., Taha, A. A., Sahib, U. I., Taqi, Z. J., Al-Shammari, A. M. & Salman, A. S. (2019). Novel of nano delivery system for linalool loaded on gold nanoparticles conjugated with CALNN peptide for application in drug uptake and induction of cell death on breast cancer cell line. Materials science and engineering: C 94:949-964.
 50. Jha, P., (2020). Functional properties of starch-chitosan blend bionanocomposite films for food packaging: the influence of amylose-amylopectin ratios. Journal Food Science Technology 58:3368–3378. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04908-2>
 51. Jha, S. N., Jaiswal, P., Narsaiah, K., Gupta, M., Bhardwaj, R. & Singh A. K. (2012). Non-destructive prediction of sweetness of intact mango using near infrared spectroscopy. Scientia Horticulturae 138:171-175. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0033-1>
 52. Jiménez-Pérez, N. C., Lorea-Hernández, F. G., Jankowski, C. K. & Reyes-Chilpa, R. (2011). Essential oils in Mexican Bays (*Litsea spp.*, *Lauraceae*): Taxonomic assortment and ethnobotanical implications. Economic Botany, 65(2):178-189.
 53. Jobbágy, M. (2003). Síntesis, caracterización y propiedades de hidróxidos dobles laminares. Buenos Aires: DQIAyQF, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

54. Kadam, A. A., Singh, S. & Gaikwad, K. K. (2021). Chitosan based antioxidant films incorporated with pine needles (*Cedrus deodara*) extract for active food packaging applications. *Food Control* 124:107877. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107877>
55. Kadoglidou, K., Lagopodi, A., Karamanoli, K., Vokou, D., Bardas, G. A., Menexes, G. & Constantinidou, H. I. A. (2011). Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahliae*. *European Journal Plant Pathology* 130(3):297-309. <https://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9754-x>
56. Kardan-Yamchi, J., Mahboubi, M., Kazemian, H., Hamzelou, G., & Feizabadi, M. M. (2020). The chemical composition and anti-mycobacterial activities of *Trachyspermum copticum* and *Pelargonium graveolens* essential oils. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 15(1):68–74. <https://doi.org/10.2174/1574891X14666191028113321>
57. Landahl, S., Meyer, M. D. & Terry, L. A. (2009). Spatial and temporal analysis of textural and biochemical changes of imported avocado cv. Hass during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:7039–7047. <https://doi.org/10.1021/jf803669x>.
58. Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A. & Aguado, R. G. J. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum spp.* *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(5): 1189-1198.
59. Lazcano-Torres, C. I., Romero-López, M. R., Fuentes-Jiménez, L. & García-Zebadúa, J. C. (2019). Perfil aromático del aceite esencial de *Litsea glaucescens* y revisión de la capacidad antimicrobiana para conservación de alimentos. *REIA* 5:5-10.
60. Leon, T. B. & Mattos, C. L. L. (2021). Control de hongos fitopatógenos asociados a semillas de palto *Persea americana Mill.* (*Lauraceae*) in vitro. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* 5(3):2690-2701. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i3.483
61. Li, J., Gu, F., Wu, R., Yang, J., and Ke-Qin, Z. (2017). Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi. *Scientific Reports* 7:45456. <https://dx.doi.org/10.1038/srep45456>
62. Li, J., Yang, J. Huang, X. & Ke-Qin, Z. (2006). Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry* 41(4):925-929. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.006>
63. López, V. (2019). Reporta Puebla producción histórica de aguacate. Milenio.
64. Ma, H., Duan, X., Xv, W., Ma, G., Ma, W. & Qi, H. (2022). Root Rot of *Angelica sinensis* Caused by *Clonostachys rosea* and *Fusarium acuminatum* in China. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-21-2665-PDN>
65. Medina-Romero, Y. M., Hernandez-Hernandez, A. B., Rodriguez-Monroy, M. A. & Canales-Martínez, M. M. (2021). Essential oils of *Bursera morelensis* and *Lippia graveolens* for the

- development of a new biopesticides in postharvest control. *Scientific Reports* 11(1): 20135. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99773-0>
66. Medvecká, V., Mošovská, S., Mikulajová, A., Valík, L. & Zahoranová, A. (2020). Cold atmospheric pressure plasma decontamination of allspice berries and effect on qualitative characteristics. *European Food Research and Technology* 246:2215–2223. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03566-0>
 67. Mejía-Bautista, M. A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M. & Reyes-Ramírez, A. (2016). In vitro activity of *Bacillus spp.* on mycelial growth inhibition of *Fusarium equiseti* and *Fusarium solani* isolated from habanero peppers (*Capsicum chinense Jacq.*). *Agrociencia* 50(3):1123-1135.
 68. Mishra, A. & Dubey, N. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of store food commodities. *Applied and environmental microbiology* 60(4):1101-1105.
 69. Molnár, O., Bartók, T. & Szécsi, A. (2015). Occurrence of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium musae* on banana fruits marketed in Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62(2):109–119. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.2>
 70. Moumni, M., Allagui, M. B., Mezrioui, K., Ben Amara, H., & Romanazzi, G. (2021). Evaluation of seven essential oils as seed treatments against Seedborne fungal pathogens of *Cucurbita maxima*. *Molecules* (Basel, Switzerland) 26(8):2354. <https://doi.org/10.3390/molecules26082354>
 71. Morales-Rabanales, Q. N., Coyotl-Pérez, W. A., Rubio-Rosas, E., Cortes-Ramírez, G.S., Sánchez, R.J.F. & Villa-Ruano, N. (2022). Antifungal properties of hybrid films containing the essential oil of *Schinus molle*: protective effect against postharvest rot of tomato. *Food Control* 134:108766. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108766>
 72. Muñoz-Acevedo, A., Kouznetsov, V. V., & Stashenko, E. E. (2009). Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander* 41(3): 287-294.
 73. Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H. & Khosravi, A. R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* 20(3): 174-178. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.05.005>
 74. Osorio, F. M. R., Matiz, M. G. E., León, M. G., López, O. D. & Pajaro, N. P. (2017). Evaluación de la acción antiséptica de un jabón líquido utilizando algunos aceites esenciales como agente activo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 46(2):176-187. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67954>
 75. Ozdemir, F. & Topuz, A. (2004). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry* 86:79-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.012>

76. Pajaro, N. O., Méndez, G. L., Osorio, F. M. R., Torrenegra, A. M. E & Roperó, V. J. M., 2017. La microencapsulación del aceite esencial de *Cinnamomum verum* J. mediante secado por aspersión y su potencial actividad antioxidante. *Revista Cubana de Farmacia* 51(2):15.
77. Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N. & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology* 7:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
78. Pedreschi, R., Uarrotá, V., Fuentealba, C., Alvaro, J. E., Olmedo, P., Defilippi, B. G. & Campos, V. R. (2019). Primary Metabolism in Avocado Fruit. *Frontiers in Plant Science*,10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00795>.
79. Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A.J., Yao, X., Ruan, J. J. & Xu, B.L. (2021). Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. *Frontiers in Microbiology* 12:1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670135>
80. Pereira, D.S. E., Medeiros, N. P. H., Coêlho, B. F., Nunes, S. H., Simoes, A. A. L., Lia, F. M. V., Lima, S. S. M. & Farias, L. I. (2019). Chitosan/Essential oils formulations for potential use as wound dressing: Physical and antimicrobial properties. *Materials* 12(14):2223. <http://dx.doi.org/10.3390/ma12142223>
81. Perera, R. H., Hyde, K. D., Maharachchikumbura, S. S. N., Jones, E. B. G., McKenzie, E. H. C., Stadler, M., Lee, H. B., Samarakoon, M. C., Ekanayaka, A. H., Camporesi, E., Liu, J. K. & Liu, Z. Y. (2020). Fungi on wild seeds and fruits. *Mycosphere* 11(1): 2108–2480. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/14>
82. Pérez, A. S., Ávila, Q. G. & Coto, A. O. (2015). Avocado (*Persea americana Mill*). *Cultivos tropicales* 36(2),111-123. <https://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.19879.55200>
83. Philippe, S., Souaïbou, F., Jean, P. N., Boniface, Y., Paulin, A., Issaka, Y., Chantal, M. & Dominique, S. (2012). Chemical composition and antifungal activity of essential oil of fresh leaves of *Cinnamomum zeylanicum* from Benin against six mycotoxigenic fungi isolated from a traditional cheese wagashi .*Elixir Appl. Biology* 49: 9787-9791.
84. Po-Jung Chien, Fuu, S. & Feng-Hsu Y. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering* 78(1):225-229. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022>
85. Puscaselu, R. G., Gutt, G., Amariei, S. (2020). The use of edible films based on sodium alginate in meat product packaging: an eco-friendly alternative to conventional plastic materials. *Coatings* 10(166):1–16. <https://doi.org/10.3390/coatings10020166>
86. Qui H, Duan X, Xv W, Zhou Y, Ma H, Ma W. & Ma G. (2022). First Report of *Clonostachys rosea* Causing Root Rot on *Astragalus membranaceus* in China. *Plant Disease*. <https://10.1094/PDIS-07-21-1511-PDN>
87. Ramos-García, M. L., Bautista-Baños. S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I. & Estrada-Carrilo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en

- recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:44- 57.
88. Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A. C. & Guzmán-Ortíz, J. M. (2019). Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1):16-34. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1808-1>
 89. Roberti, R., Veronesi, A.R., Cesari, A., Cascote, A., Di Berardino, I., Bertini, L. & Caruso, C. (2008). Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.003>
 90. Rodríguez, A. N. & Sánchez, P. P. (2005). Especies de frutales cultivadas en Cuba en la Agricultura Urbana. 3ra Edición, La Habana.
 91. Rodríguez-Castro, A., Torres-Herrera, S., Domínguez-Calleros, A., Romero-García, A. & Silva-Flores, M. (2020). Extractos vegetales para el control de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, una alternativa sostenible para la agricultura. *Abanico Agroforestal* 2:1-13. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.7>
 92. Rodríguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., Godeas, A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 10(5): 1177-1186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x>
 93. Rodríguez, R. J., Pájaro, P. A. & Meza, F. E. (2016). Síntesis y caracterización estructural de hidrotalcitas de Cu-Zn-Al. *Revista Colombiana Química* 45(3):33-38. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n3.61381>
 94. Rojas-Graü, M., Tapia, M., Rodríguez, F., Carmona, A. & Martin-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids* 21(1):118-127 <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.03.001>
 95. Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A. & Allende-Molar, R. (2017). Current status of *Colletotrichum spp.* in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3):549-570. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>
 96. Romanazzi, G., Feliziani, E., Baños, S. B. & Sivakumar, D. (2017). Shelf life extensión of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(3):579-601. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>
 97. Roselló, J., Sempere, F., Sanz-Berzosa, I., Chiralt, A., & Santamarina, M. P. (2015). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 18(2):359–367. <https://dx.doi.org/10.1080/0972060x.2015.1010601>

98. Rosero, J. C., Cruz, S., Osorio, C., Hurtado, N. (2019). Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (*Persea americana Mill.*) cultivated in Colombia. *Molecules* 24(17):3209. <https://doi.org/10.3390/molecules24173209>
99. Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A. & Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7): 1325-1332.
100. Sachar, K., Kujur, A. & Prakash, B. (2016). Assessment of preservative potential of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil against food borne molds, aflatoxin B1 synthesis, its functional properties and mode of action. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 37:184–191. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.018>
101. SADER. (2020). Boletín mensual de avance de la producción de aguacate.
102. SAGARPA. (2017). Aguacate mexicano. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. 16 pp.
103. Shahid, M., Zaidi, A., Khan, M. S., Rizvi, A., Saif, S. & Ahmed, B. (2017). Recent advances in management strategies of vegetable diseases. *Microbial Strategies for Vegetable Production* 197-226 pp. https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-54401-4_9
104. Silva, W. A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. A. & Gómez, G. M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocoll* 31:458–466. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2012.11.028>
105. Sukhija, S., Singh, S. & Riar, C. S. (2016). Analyzing the effect of whey protein concentrate and psyllium husk on various characteristics of biodegradable film from lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome starch. *Food Hydrocolloids* 60:128–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.023>
106. Santillán, M. E., Meza, M. G., Navarro, R. I., Gómez, H. P. & Rodríguez, E. S. (2008). Fabricación de productos cosméticos y de consumo humano a base de bagazo de aguacate (*Persea americana*). *Avances en la investigación científica en el CUCBA. XIX Jornada Nacional de la Investigación Científica.*
107. Sarkhosh, A., Vargas, A. I., Schaffer, B., Palmateer, A. J., Lopez, P., Soleymani, A. & Farzaneh, M. (2017). Postharvest management of anthracnose in avocado (*Persea americana Mill.*) fruit with plantextracted oils. *Food Packaging and Shelf Life*. 12:16–22. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.02.001>
108. Sellamuthu, P. S., Sivakumar, D. & Soundy, P., (2013). Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapour phase against avocado and peach postharvest pathogens. *Journal of Food Safety* 33(1):86-93. <https://dx.doi.org/10.1111/JFS.12026>
109. SIAP. (2020). Estadística de Producción agrícola por estado.
110. SIAP. (2021) Producción de aguacate en septiembre 2021.

111. Soliman, K. M. & Badeaa, R.I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chemical Toxicology* 40(11): 1669-1675. [https://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00120-5](https://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00120-5)
112. Sun, Z. B., Li, S. D., Xu, J. L., Lu, X. & Sun, M. H. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology* 129(3):486-495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>
113. Szutt, A., Dolhańczuk, Ś. A., Sporek, M. (2019). Evaluation of chemical composition of essential oils derived from different *Pelargonium* species leaves. *Ecological Chemistry and Engineering* 26(4):807-816. <https://dx.doi.org/10.1515/eces-2019-0057>
114. Tamayo, P. J. (2004). Enfermedades poscosecha del aguacate y la curuba. *ASCOLFI Informa* 30(5): 29-35.
115. Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E. & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIF Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 17(1):77-91. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70321-3](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70321-3)
116. Tao, L., Zhonglong, L., Ming, X., Zezheng, Y., Zhiyuan, L., Xiaojun, Z. & Jinwu, W. (2017). In vitro and in vivo studies of a gelatin/carboxymethyl chitosan/LAPONTE® composite scaffold for bone tissue engineering. *RSC Advances* 7:54100. <https://doi.org/10.1039/C7RA06913H>
117. Theron, D. J. and Holz, G. (1991). Dry rot of potatoes caused by *Gliocladium roseum*. *Plant Pathology* 40:302-305. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.1991.TB02380.X>
118. Torres, R., Montes, E. J., Pérez, O. A. & Andrade, R. D. (2013). Relación del color y del estado de madurez con las propiedades fisicoquímicas de frutas tropicales. *Información Tecnológica* 24:51-56.
119. Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. J., Ulloa, O. A., Ramírez-Ramírez, O. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M. & Bautista Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum spp.* causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (19):3953-3964. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>.
120. Valderrama, B. N., Algecira, E. N. A. & Albaracín, H. W. (2016). Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero. *Revista Materia* 21(1):141-156. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620160001.0013>
121. Valero, G. T., Rodríguez, A. P., Ruiz, M. E., Ávila, T. J. M. & Varela, M. G. (2018). La alimentación española características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 245-246.
122. Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A. J. & Sanchis, V. (2004). Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F.*

- graminearumon* maize-based agar media. Food Microbiology 21(6):649-656. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.009>
123. Vernin, G., Vernin, C., Metzger, J., Pujol, L. & Parkanyi, C. (1994) GC/MS analysis of Cinnamomun and Cassia essential oils: A comparative study. Elsevier Science B.V.: 411-425.
124. Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J. Z., Cardinali, G., Houbraeken, J., Boekhout, T., Crous, P.W., Robert, V. and Verkley, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. Studies in Mycology 92:135-154. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
125. Villa, R. J. A., Molina, C. F. J., Ayala, Z. J. F., Olivas, G. I. & González, A. G. A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. Food Research International 44:1231-1237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>
126. Vivero, S. A., Valenzuela, B. R., Valenzuela, B. A. & Morales, G. (2019). Palta: compuestos bioactivos y sus potenciales beneficios en salud. Revista Chilena de Nutrición 46:491-498. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000400491>
127. Wanjiku, E. K., Waceke, J. W., Wanjala, B. W. & Mbaka, J. N. (2020). Identification and Pathogenicity of Fungal Pathogens Associated with Stem End Rots of Avocado Fruits in Kenya. International Journal of Microbiology 2020(4063697):8. <https://doi.org/10.1155/2020/4063697>
128. Wang, L., Bordi, P. L., Fleming, J. A., Hill, A. M. & Kris, E. P. M. (2015). Effect of a moderate fat diet with and without avocados on lipoprotein particle number, size and subclasses in overweight and obese adults: A randomized, controlled trial. Journal of the American Heart Association 7:e001355. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001355>.
129. Xoca, O. L. A., Aguilera, A. S., López G. U. M., Gutiérrez, M. P. & Chacón, L. A. (2018). Effect of chitosan on the in vitro control of *Colletotrichum sp.*, and its influence on post-harvest quality in Hass avocado fruits. Revista Bio Ciencias 5, e355: 1-20.
130. Younes, I. & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources: Structure, properties and applications. Marine Drugs 13(3):1133-1174. <https://dx.doi.org/10.3390/md13031133>
131. Zaker, M. (2014). Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Agriculture and Biosciences 3(4):190-195.

10. ANEXOS

Fichas del herbario de la UNAM de cada una de las especies vegetales de las cuales se extrajo en aceite esencial.



HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (FCME), UNAM PLANTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO

Folio: 177901

Especie: *Pelargonium graveolens* L'Hér. ex Aiton

Familia: Geraniaceae

Nombre común: citronela

Localidad: Yaonahuac, Puebla

Altitud: 1800 m.

Tipo de vegetación: Bosque mesófilo de montaña

Forma biológica: Herbácea

Tamaño: 0.5 m.

Color flor: Rosa

Fruto: No se colectó

Colector: Nemesio Villa Ruano

Número de colecta: s.n.

Usos: Medicinal

Fecha colecta: 08/mayo/2020

Determinó: R. Cruz Durán, 2021.



HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (FCME), UNAM PLANTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO

Folio: 177884

Especie: *Ageratina rivalis* (Greenm.) King & Rob.

Familia: Asteraceae

Nombre común: Eupatorium 1

Localidad: Yaonáhuac, Puebla

Altitud: 1800 m.

Tipo de vegetación: Bosque mesófilo de montaña

Forma biológica: Arbusto

Tamaño: 2 m.

Color flor: blanca

Fruto: No se colectó

Colector: Nemesio Villa Ruano

Número de colecta: s.n.

Usos: Medicinal

Fecha colecta: 02/febrero/2020

Determinó: R. Cruz Durán, 2021



**HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (FCME), UNAM
PLANTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO**

Folio: **177882**

Especie: *Eupatorium petiolare* Moc. ex DC.

Familia: Asteraceae

Nombre común: Eupatorium 2

Localidad: Yaonáhuac, Puebla

Altitud: 1800 m.

Tipo de vegetación: Bosque mesófilo de montaña

Forma biológica: Arbusto Tamaño: 2 m.

Color flor: blanca

Fruto: No se colectó

Colector: Nemesio Villa Ruano

Número de colecta: s.n.

Usos: Medicinal

Fecha colecta: 02/febrero/2020

Determinó: R. Cruz Durán, 2021



**HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (FCME), UNAM
PLANTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO**

Folio: **177883**

Especie: *Thymus vulgaris* L.

Familia: Lamiaceae.

Nombre común: tomillo

Localidad: Tepeaca, Puebla.

Altitud: 2840 m.

Tipo de vegetación:

Forma biológica: Arbusto pequeño. Tamaño: 0.2 m.

Color flor: Lila

Fruto: No se colectó.

Colector: Wendy Abril Coyotl Pérez

Número de colecta: s.n.

Usos: Medicinal

Fecha colecta: 01/febrero/2021

Determinó: R. Cruz Durán, 2021



**HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (FCME), UNAM
PLANTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO**

Folio: **177881**

Especie: *Litsea glaucescens* Kunth

Familia: Lauraceae

Nombre común: laurel

Localidad: Tepeaca, Puebla.

Altitud: 2840 m.

Tipo de vegetación:

Forma biológica: Arbusto Tamaño: 0.3 m.

Color flor: Fruto: No se colectó

Colector: Wendy Abril Coyotl Pérez

Número de colecta: s.n.

Usos: Medicinal

Fecha colecta: 15/febrero/2021

Determinó: R. Cruz Durán, 2021



**HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (FCME), UNAM
PLANTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO**

Folio: **177900**

Especie: *Barkleyanthus salicifolius* (Kunth) H. Rob. & Brettell

Familia: Asteraceae

Nombre común: azomiate

Localidad: San Andrés Cholula, Puebla.

Altitud: 2100 m.

Tipo de vegetación:

Forma biológica: Arbusto

Tamaño: 4 m.

Color flor: Amarilla

Fruto: No se colectó

Colector: Wendy Abril Coyotl Pérez

Número de colecta: s.n.

Usos: Medicinal

Fecha colecta: 21/marzo/2021.

Determinó: R. Cruz Durán, 2021

*