



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ingeniería Química

Tesis de grado para obtener el título de Licenciatura:

INGENIERO AMBIENTAL

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS EN ENDOSPERMO, ENDOCARPIO Y EPICARPIO DE MAMEY (*Pouteria sapota* Jacq.) SOBRE *Lasiodiplodia theobromae*.

FACULTAD

Director de Tesis: Dr. Juan José Luna Guevara

Asesora de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara

QUÍMICA

Autor: Edghar Enrique Alcalá García

Fecha de examen profesional: 23 de Mayo de 2024



Oficio No. FIQ/AC/277/2023
Asunto: Registro de Tema de Tesis.

C. EDGHAR ENRIQUE ALCALÁ GARCÍA
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

“Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos obtenidos en endospermo, endocarpio y epicarpio de mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) sobre *Lasiodiplodia theobromae*.”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Director de Tesis: Dr. Juan José Luna Guevara.
Co-Directora de Tesis: Dra. Ma. Lorena Luna Guevara.

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO.**

Atentamente,
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Zaragoza 13 de Diciembre de 2023

Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaria Académica

C.c.p. Director de Tesis: Dr. Juan José Luna Guevara.
C.c.p. Co-Directora de Tesis: Dra. Ma. Lorena Luna Guevara.
C.c.p. Archivo.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

Z



BUAP

Oficio No. FIQ/DI/246/2024
Asunto: Modalidad de Titulación por Examen Profesional por Tesis.

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de Administración Escolar de la BUAP
Presente:

At'n: Psic. Marcela Juárez Zenteno
Jefa del Departamento de Titulación

Por este medio, me permito hacer de su conocimiento que el alumno:

Nombre completo del alumno: **Edghar Enrique Alcalá Garcia**
Matrícula: **201515099**
Sustentante de la Carrera en: **Ingeniería Ambiental**
Fecha de Examen Profesional: **Jueves 23 de mayo 2024 11:00 horas. Presencial.**

JURADO:

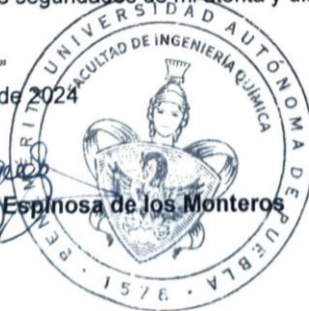
NOMBRE	CARGO
Dra. Norma Cruz Miranda	Presidente
Dra. Lilia Alejandra Conde Hernández	Secretario
Dra. María Lorena Luna Guevara	Vocal

NOTA: ESTE DOCUMENTO TIENE VIGENCIA POR 6 MESES A PARTIR DE LA FECHA DE SU EXPEDICIÓN.

Sin otro particular, le reitero las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

Atentamente
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 24 de Abril de 2024


M.I.C. Ma. Gpe. Tita Vázquez Espinosa de los Monteros
Directora



C.c.p. Archivo

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

CTAI01



**Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



CIUDAD UNIVERSITARIA

**Mtro. Omar Gerardo Aguirre Ibarra
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente**

**ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS**

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Ambiental.

Edghar Enrique Alcalá García

Quién presenta como tema de tesis:

Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos obtenidos en endospermo, endocarpio y epicarpio de mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) sobre *Lasiodiplodia theobromae*.

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a de de 2024

Director de Tesis

Dr. Juan José Luna Guevara

A mis Padres.

Porque con su Amor incondicional tomaron de la mano al niño y lo convirtieron en el Hombre que soy. Nunca me han dejado solo. Lleno de admiración y orgullo por ustedes mi gratitud infinita.

A mis Hermanas.

Por compartir la travesía desde los primeros días con tanto Amor.

A Sofi, Dianita, David, Valentina, Alhelí. Creo en ustedes.

A la mujer que transformó los sueños en anhelos recordándome que estoy hecho de polvo de estrellas.

A Ana Rivas, a la Abuela Gloria. Brinda a los demás lo que recibas y el mundo será mejor.

A mis amigas y amigos, familia que trasciende la sangre, que encontré por el destino y caminan conmigo, iluminan mis días a donde quiera que vaya.

Mi gratitud también a la Benemérita por cobijarme, a mis asesores, a cada persona digna de ejercer con vocación la noble labor de llamarse Maestra, Maestro.

Índice de contenido

1	Introducción	9
2	Planteamiento del problema.	10
3	Justificación	11
4	Objetivos.....	13
4.1	Objetivo General	13
4.2	Objetivos Específicos.....	13
5	Hipótesis.....	14
6	Marco teórico.....	14
6.1	Hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas	14
6.2	Panorama biopatogénico en México.	15
6.3	Género <i>Lasiodiplodia</i> principales enfermedades ocasionadas.	15
6.4	Modelos de crecimiento microbiano.....	16
6.5	Fases de la curva de crecimiento microbiano.	17
6.6	Agentes antifúngicos.....	18
6.7	Clasificación de fungicidas.....	19
6.8	Agentes fungicidas para el control de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	20
6.9	Fungicidas y su toxicidad	21
7	Plantas con potencial antifúngico.....	22
8	Mamey: descripción, panorama y uso como agente antifúngico.	23
9	Metodología.....	24
10	Materiales y métodos	25
10.1	Acondicionamiento.....	25
10.2	Extracción maceración.....	25
10.3	Concentración de extractos	26
10.4	Aplicación in vitro de extractos.....	26
10.5	Inoculación	26
10.6	Evaluación de actividad antifúngica	26
10.7	Análisis estadístico.....	27
11	Desarrollo experimental.....	27
11.1	Puesta a punto.....	27
11.2	Obtención y concentración de los extractos.....	28

12 Evaluación de la actividad antifúngica.....	29
12.1 Cultivos fúngicos	29
12.2 Inoculación de los sistemas modelo.....	30
14 Discusión de resultados	30
15 Conclusiones.....	42
16 Sugerencias	44
16 Bibliografía	46

Índice de tablas y figuras

Figura 1 Curva de crecimiento de un hongo	13
Figura 2 Diagrama de etapas de metodología	19
Tabla 1 Cronograma de actividades	28
Figura 3 Maceración de tejidos	22
Figura 4 Concentración de extractos	22
Figura 5 Concentración de extractos	23
Figura 6 crecimiento radial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en pruebas de placa PDA	24
Figura 7 velocidad de crecimiento 500 ppm epicarpio	26
Figura 8 velocidad de crecimiento a 1000 ppm epicarpio	27
Figura 9 velocidad de crecimiento control epicarpio	27
Figura 10. Cinéticas de crecimiento de <i>L. theobromae</i> en sistemas modelo con 0, 500 y 1000 mg/L de extractos de epicarpio de mamey.	28
Figura 11 velocidad de crecimiento 500 ppm endospermo	28
Figura 12 velocidad de crecimiento 1000 ppm endospermo	29
Figura 15 Cinéticas de crecimiento de <i>L. theobromae</i> en sistemas modelo con 0, 500 y 1000 mg/L de extractos de endospermo	29
Figura 13 velocidad de crecimiento 500 ppm epicarpio	30
Figura 14 velocidad de crecimiento 1000 ppm epicarpio	30
Figura 15 Cinéticas de crecimiento de <i>L. theobromae</i> en sistemas modelo con 0, 500 y 1000 mg/L de extractos de endocarpio	31
Tabla 1. Porcentajes de inhibición por tratamiento a diferentes concentraciones.	32

1 Introducción

México es un País con una enorme biodiversidad por sus condiciones geográficas y climáticas, tales condiciones han permitido la diversificación de la producción agroalimentaria abarcando desde hortalizas, semillas, flores y frutos; cada sistema productivo conlleva un sin número de variables que pueden afectar el desarrollo de la cadena. Este trabajo buscará contribuir abordando una de las problemáticas que afectan tanto la Fito Sanidad y la Inocuidad Alimentaria en la cadena de producción del mamey (*Pouteria sapota* Jacq.), especie nativa del sureste mexicano.

El mamey ha sido cultivado desde la antigüedad por los grupos mayas en México y hoy en día su cultivo se ha extendido hacia América tropical y las Indias Occidentales, Guatemala, Belice, Norte de Honduras incluso, la costa del Atlántico en Nicaragua. (Martínez et al., 2006). Perteneciente a la familia *Sapotaceae*, sus características son: forma ovoide, cáscara delgada de textura áspera y quebradiza, color café claro con tonalidades rosas, pulpa de color rojo-naranja, alto contenido de azúcares (CIAD, 2020).

Analíticamente la composición del mamey es de 75 % por ciento de agua, proporciona calcio, hierro y fibra; rico en proteína, sodio, potasio y carbohidratos, así como altos niveles de vitamina A y vitamina C, factor importante para mantener un balance de nutrientes en nuestra dieta. El color de la pulpa ha sido atribuído al contenido elevado en carotenoides, tales como: luteína, β y sapotexantina de características únicas; a estos compuestos se les adjudican propiedades benéficas para el mantenimiento de la piel, efectos en la prevención de la artritis y las enfermedades mentales relacionadas con el envejecimiento (Paulin K. et al., 2015).

Se ha reportado que este fruto posee una gran cantidad de compuestos fenólicos,

como ácido gálico y ácido p-cumárico, que han demostrado actividad antimicrobiana y antioxidante, así como la epicatequina, conocida por su acción estimulante para regenerar el tejido muscular (CIAD, 2020).

De acuerdo con datos de la Secretaría de agricultura y desarrollo rural de México (SADER, 2023) Yucatán es el principal productor de mamey a nivel nacional. Se cultiva en una superficie de 507 hectáreas que generan una producción de 11,084 toneladas que se comercializan principalmente en el Estado de México y Puebla además de colocarse en el mercado internacional hacia Europa y Asia, generando en total una derrama económica para la entidad, de 42.8 millones de pesos como referencia (Infosiap.siap.gob.mx).

2 Planteamiento del problema.

Siendo la producción agrícola de México una de las actividades primarias más relevantes para abastecer y garantizar la disponibilidad continua de alimentos durante todo el año, diversos factores pueden conferir un carácter frágil al que hoy en día tiene relevancia mundial como concepto: “Seguridad Agroalimentaria o Fito sanidad” (FAO, 2023). Un solo evento puede desencadenar una gran problemática y de forma tan severa debido al sin número de interacciones socio económicas, ambientales, de salud pública, inocuidad alimentaria, entre otras; es también en este sentido que el impacto en la economía de familias de productores rurales se vislumbra como un marcador clave del bajo crecimiento y desarrollo en un sector tan vulnerable de nuestra sociedad a pesar del enorme potencial con que históricamente cuenta.

El enfoque de este trabajo aborda la propuesta de tratamiento y/o control inhibitorio del hongo *Lasiodiplodia theobromae*, microorganismo fitopatógeno causante de numerosas enfermedades de plantas y vegetales susceptibles a contaminación (Picos et al., 2015) debido a su enorme capacidad de múltiples hospederos, principalmente en cultivos hortofrutícolas ya que a través de disturbios en el metabolismo celular, al secretar enzimas, toxinas, fitorreguladores y otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio

crecimiento daña por completo las plantaciones. Tradicionalmente se utilizan productos químicos sintéticos para reducir el impacto que el hongo ocasiona, productos que generan otro tipo de problemáticas al ambiente y la salud por su persistencia o toxicidad (Del Puerto et al., 2014); este trabajo busca contribuir en la reducción del uso de este tipo de plaguicidas por su emisión al ambiente, aportar una propuesta de bio control a partir de extractos etanólicos derivados del mamey en el control de *Lasiodiplodia theobromae* lo que permita una disminución del impacto ocasionado por pérdidas económicas para los productores agrícolas. Así como, lograr el resguardo de la inocuidad alimentaria de las especies afectadas con incidencia a lo largo de toda la cadena de suministro, que, traducida en números, históricamente ha tenido un impacto significativo. (Ochoa et al., 2007).

3 Justificación

Existe en la actualidad una creciente necesidad de desarrollo hacia nuevos métodos de control aplicable como son los agentes antifúngicos de origen natural. La finalidad primordial de esta premisa es la búsqueda de alternativas que aporten en beneficio de la inocuidad de los alimentos misma que se ha visto en últimos años severamente afectada no solamente por el daño ocasionado a la agricultura por el impacto y persistencia de microorganismos (Brechelt, 2004), durante el cultivo, previo o después de la cosecha, en la cadena de suministro, almacenamiento o vida en anaquel sumada al depósito de agentes sintéticos utilizados para contrarrestar dichos microorganismos que pueden ocasionar efectos dañinos en la salud de los consumidores. (Eriksson et al., 2008)

Los fungicidas sintéticos tienen un enorme potencial para causar efectos adversos en los humanos. Históricamente se han presentado eventos de envenenamiento por fungicidas a partir del consumo de semillas de granos tratadas con algún agente proveniente de mercurio orgánico o hexaclorobenceno. Aunque suele considerarse poco probable que la mayoría de los fungicidas utilizados actualmente causen envenenamientos de alta severidad o frecuencia por una baja toxicidad inherente para los mamíferos, muchos de estos fungicidas se formulan

como suspensión de polvos o gránulos absorbentes en agua, por lo cual una absorción rápida y eficiente, aunque improbable no es imposible interfiriendo con ello para garantizar inocuidad alimentaria. (Bakir et al., 1980) Aparte de los envenenamientos sistémicos, los fungicidas, en su clase, son responsables probablemente de un número desproporcional de daños irritantes a la piel, las membranas mucosas y sensibilización cutánea (Royce et al., 1993).

A nivel global, los países en desarrollo suman en su conjunto un cuarto del total utilizado de plaguicidas; presentando el 50 % de las intoxicaciones, así como 99 % de muertes atribuibles por exposición a estos compuestos (Tinoco, 2005). Anualmente existen registros de un mínimo de 500 mil casos de intoxicación con dichos productos, de las cuales 70 % se contabilizan como situaciones de tipo ocupacional en ambientes agrícolas (Eddleston et al. 2002).

Hacia el año 1993 se inició el registro de casos de intoxicación aguda por plaguicidas (IAP) en México, contabilizando un total de 1576 eventos. Durante el periodo 1995-2012 la cifra se incrementó a 67 711 casos en todo el país, las tasas más altas de incidencia de IAP a lo largo del País se registraron en Nayarit, Colima, Morelos y Jalisco. Otros estados presentaron una tendencia hacia el incremento de IAP al final de dicho periodo como Guanajuato, Hidalgo, Querétaro, Sinaloa, Chiapas, Guerrero y Oaxaca. Este registro se lleva a cabo a través del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, mediante el cual se captan los casos de intoxicación de manera genérica sin considerar el agente específico causante. Dadas las dificultades para el diagnóstico oportuno de las intoxicaciones, es probable que haya un subregistro de dichos padecimientos (Gutiérrez, 2013).

Los hongos tienen la enorme capacidad de generar sustancias, lo anterior es resultado de procesos metabólicos secundarios, dichas sustancias generadas son conocidas como micotoxinas, capaces de llegar a ser perjudiciales, aun cuando su concentración tenga niveles muy bajos, esto afecta la inocuidad de los productos

alimentarios (Trigos et al., 2008). Datos registrados revelan que a nivel mundial las cosechas de alimentos presentan un nivel de contaminación por micotoxinas del orden de 25 % (Gómez, 2007), lo anterior representa un riesgo bastante considerable para la salud de la población. *Lasiodiplodia theobromae* está particularmente asociado con el problema de muerte descendente, así como la pudrición de frutos entre los que encontramos: mango, uva, papaya, rambután, zapote, mamey y cítricos (Picos-Muñoz et al., 2015). El planteamiento de una alternativa viable para contrarrestar la contaminación fúngica consiste en la evaluación de extractos de plantas o frutos con antecedentes de actividad antimicrobiana. En este caso particular el uso del fruto de Mamey (*Pouteria sapota* Jacq), ha sido evaluado por su capacidad de contrarrestar mediante la utilización de extractos provenientes de diferentes partes del fruto como una respuesta a la inhibición o desarrollo de enfermedades ocasionadas por el hongo *Lasiodiplodia theobromae*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antifúngica de extractos etanólicos obtenidos en endospermo, endocarpio y epicarpio de mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) sobre *Lasiodiplodia theobromae*

4.2 Objetivos Específicos

- Obtener extractos por vía etanólica de 3 diferentes tejidos de mamey: endospermo, endocarpio y epicarpio.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de mamey sobre *Lasiodiplodia theobromae* a concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm.
- Determinar las concentraciones con capacidad de mayor efecto inhibitorio sobre el microorganismo relacionando el porcentaje de inhibición, velocidad de crecimiento y tiempo lag.

- Evaluar estadísticamente con los datos obtenidos el mejor tratamiento inhibitorio.

5 Hipótesis

Alguno de los extractos etanólicos obtenidos de endospermo, endocarpio, y epicarpio de mamey (*Pouteria sapota Jacq*), tiene efectos antifúngicos sobre *Lasiodiplodia theobromae*.

6 Marco teórico

6.1 Hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas

En la naturaleza plantas y vegetales cuentan con una composición estructural general con rangos entre el 72 y el 95 % de agua (Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008), 8.6% de carbohidratos, 1.9% de proteínas, 0.3% de lípidos y 0.84% de cenizas. Teniendo como base la conformación anterior, el contenido de nutrientes de frutas y vegetales los convierte en organismos ampliamente susceptibles al crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, lo que tiene como consecuencia que puedan ser parasitados por algunos de estos microorganismos y que tanto cultivos como cosechas sean atacados por un gran número de patógenos causantes de pérdidas tanto en rendimientos productivos, como económicamente ya que desde las características físicas visuales como manchas en los productos frescos hasta la pudrición completa, el impacto suele ser muy perjudicial (Trigos et al., 2008). Aunado a ello, en algunos sistemas los patógenos de plantas son difíciles de manejar porque sus poblaciones varían en el tiempo, el espacio y el genotipo (Ivic, 2010), debido a que han desarrollado mecanismos muy eficientes para efectuar una infección, crecer, multiplicarse y propagarse en períodos muy cortos de tiempo (Bhunja, 2018). Otra razón por la cual los agentes fúngicos son tan patogénicos es debido a que la mayoría producen varias clases de esporas, que entran en contacto con tejidos de las plantas, germinan, y penetran en ellas durante el proceso de infección. Después de la infección, los hongos siguen creciendo como micelio en o sobre órganos de esta donde producen sus nuevas estructuras vegetativas o

generativas para su propagación (Cortés et al., 2021).

6.2 Panorama biopatogénico en México.

Basados en el contexto actual, en México todavía se encuentra en desarrollo la detección oportuna de sustancias tóxicas producidas por hongos fitopatógenos causantes de atacar frutas y hortalizas, lo cual representa un posible riesgo para la salud del consumidor (Lagunes et al., 2006). Más allá de la enorme labor de la academia al haber aumentado el número de investigaciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios a partir de hongos fitopatógenos (Trigos, 1999; Márquez et al., 2005), la gestión adecuada respecto a la normatividad local aplicable (NOM-111-SSA1-1994) es limitada respecto a una amplia revisión de ejecución, ocasiona que la problemática rebase el adecuado manejo, en contraste con países que controlan de manera integral la calidad, fitosanidad y seguridad alimentaria (Espinoza et al., 2007). Por ejemplo, la política de seguridad alimentaria de la Unión Europea (UE) que se rige principalmente por los artículos 168 (salud pública) y 169 (protección de los consumidores) del Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea (EUR Lex, 2023) por lo que se considera de suma importancia generar información relacionada con su capacidad de producir metabolitos secundarios.

6.3 Género *Lasiodiplodia* principales enfermedades ocasionadas.

Lasiodiplodia theobromae es un hongo del género *Lastodiplodia* que fue descrito por primera vez alrededor de 1890 por Saccardo al encontrar afectaciones en frutos de cacao (*Theohromae cacao*) geográficamente en Ecuador (Crous et al., 1999), también en Brasil afectando nueces de la India (Cardoso et al., 2002). Este hongo es cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, especialmente de los trópicos y subtrópicos.

Este patógeno ocasiona enfermedades que principalmente incluyen muerte descendente, cáncer, gomosis, lirón de la hoja, pudrición de raíz en plantas ma-

derables y cultivos (Pitl et al., 2009). *L. theobromae* es saprofito, pero se le considera un patógeno latente, encontrándose como endófito en tejidos sanos de plantas, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado (Rubini et al., 2000; Mohali et al., 2005). También se ha reportado incluso como un patógeno oportunista que afecta al ser humano causando infecciones subcutáneas, oculares y de órganos internos (Rrebell et al., 1976; Maslen et al., 1996; Summerbell et al., 2004)

Registros alrededor del mundo reportan que el hongo *Lasiodiplodia theobromae* afecta severamente cultivos frutales de mango, aguacate, papaya, zapote, plátano, litchi, uva, guanábana (Lutchmeah, 1988), cítricos, duraznos (Damm et al., 2007) entre otros, causando pérdidas económicas en las distintas etapas de la producción, ocasiona daños al cultivo de mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) sea de forma individual o bien puede presentarse en interacción con *Colletotrichum* sp., *Fomitoporia maxonii* y *Fusarium* sp. provocando clorosis, necrosis, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momificaciones, agallas, costras y marchitez (Kimat et al., 1995). Para el caso del mamey se ha estudiado a fondo el control de *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal de la muerte regresiva de injertos en busca de una mejor reproducción (Tovar, et al., 2013), una vez lograda esta se ha buscado revertir mediante diversas técnicas la muerte descendente de los árboles (Vásquez-López et al., 2009) que suele darse también por el proceso de cosecha al momento del corte, además de la incidencia en la pudrición del fruto postcosecha suele ser considerada la más grande afectación en la cadena de control de calidad (Bautista-Baños et al., 2002) , en cuyo proceso de conservación como frutos refrigerados genera mermas traducidas en pérdidas económicas para todo el sector, además de una alerta por la presencia del mismo en los cultivos (Gómez et al., 2009).

6.4 Modelos de crecimiento microbiano

En microbiología, la palabra “crecimiento” se define como un incremento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población

microbiana (Madigan et al., 1999). En el estudio del crecimiento de los microorganismos en general y las posibles afectaciones que puede ocasionar su comportamiento debido al incremento de ciertos sustratos y/o sustancias que favorecen su desarrollo, es necesario considerar curvas de crecimiento de los agentes patógenos, así como sus modificaciones por las condiciones de crecimiento (McMeekin et al., 2002).

Una curva de crecimiento por definición es aquella que describe el comportamiento de los microorganismos a partir de un modelo matemático que se subdivide en cuatro etapas distintas denominadas fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

6.5 Fases de la curva de crecimiento microbiano.

Como se puede observar en la Figura 1, inmediatamente a la inoculación se presenta la fase de latencia, correspondiente al período de ajuste que las células experimentan al ser transferidas de un medio al otro antes de iniciar su crecimiento. Posteriormente prosigue la fase exponencial o logarítmica durante la cual los microorganismos logran un crecimiento y de división hasta el nivel máximo posible todo en función de su potencial genético, el tipo de medio; así como las condiciones en que crece. En este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad medible de la población) y el tiempo. Los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente, en lugar de realizar discretos saltos.

La fase estacionaria es resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo que tienen como consecuencia la disminución de la velocidad del crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades.

La fase de muerte es consecuencia de diversos factores: uno importante es el agotamiento de las reservas celulares de energía. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede ser representada por una disminución lineal del número de las células viables a lo largo del tiempo (Madigan et al., 1997; Prescott et al., 1999).

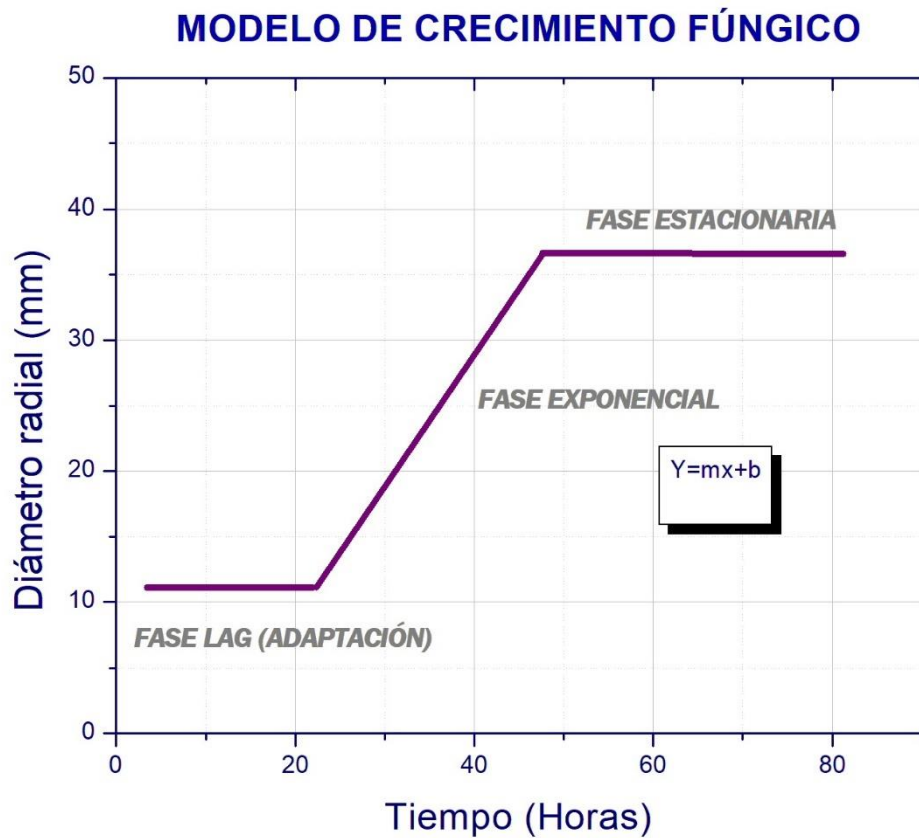


Figura 1 Curva de crecimiento fúngico. Crecimiento radial vs tiempo en fase de adaptación, crecimiento exponencial y estacionaria.

6.6 Agentes antifúngicos

Un fungicida es un producto con la capacidad de eliminar hongos. El término procede del vocablo latino *fungus* “hongo” haciendo referencia a su uso desde la definición. Para comprender qué es un fungicida, por lo tanto, se debe contar con el concepto claro de que un hongo es un ser vivo con características de organismo

heterótrofo, incapaz de generar materia orgánica partiendo de sustancias inorgánicas, dado lo anterior, al igual que los animales, necesita alimentarse de otros seres vivos.

El control químico de enfermedades de las plantas comenzó a desarrollarse en la segunda mitad del siglo XIX cuando se hicieron recomendaciones sobre el uso de preparaciones de fungicidas basados en ingredientes activos con azufre, cal y sulfato de cobre; aunque la cantidad de sustancias fungicidas conocidas era limitada. Otras opciones para el control de enfermedades fúngicas en la década de 1980 fueron a través de la introducción de varios triazoles cuyo mecanismo de acción consiste en Inhibir la bio síntesis del Ergosterol, sustancia con un papel muy importante en la estabilización, así como el funcionamiento de la membrana celular de los hongos que también influye en los procesos de división celular, estimulación del crecimiento y reproducción (Trigos et al., 2008).

Los hongos tienen un proceso de reproducción mediante esporas. Muchos hongos resultan perjudiciales incluso para los seres humanos, los animales y/o las plantas, por tal razón para combatirlos, existen los fungicidas. Estas sustancias tienen un cierto grado de toxicidad, pueden aplicarse comúnmente a través de impregnación, pulverizado, rociado u otras técnicas (McGrath, 2004).

Las medidas de control químico son particularmente comunes en la gestión de control de plagas por hongos, habitualmente en la actualidad la mayoría de éstas se basan en el uso de fungicidas, sin embargo, existe una fuerte controversia dentro de la comunidad científica respecto a la continuidad en el empleo de fungicidas para controlar enfermedades fúngicas o su prohibición para proteger la salud humana y del medio ambiente (Ivic, 2010).

6.7 Clasificación de fungicidas.

Los fungicidas pueden ser divididos en 2 grupos con base al modo de acción en las células fúngicas (Rouabhi, 2010):

a. Inhibidores en sitio específico: son inhibidores que se dirigen a sitios individuales dentro de la célula fúngica.

b. Inhibidores en sitios múltiples: son inhibidores que actúan sobre varios sitios en la célula fúngica.

Otra forma de clasificar a los fungicidas es agrupándolos por su composición en dos grandes grupos: a) inorgánicos, donde se encuentran compuestos de azufre, cobre o mercurio y b) orgánicos, entre los que se incluyen ditiocarbamatos, tiazoles, trazinas, aromáticos sustituidos, dicarboximidias, entre otros (Morell, 1998)

Los primeros fungicidas en exhibir acción protectora, sistémica y erradicante fueron aquellos a base de estrobilurinas cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la respiración mitocondrial y la formación de ATP por lo que rápidamente se convirtieron en uno de los fungicidas agrícolas más importantes, ya que una de las ventajas de los fungicidas sistémicos es su alta especificidad, hoy en día representan una proporción superior al 20% del mercado mundial. (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010). En general se aplican fungicidas después de la cosecha para controlar la descomposición, asimismo requieren ser aplicados una vez que los productos se lavan y se ponen a secar antes de ser empacados (FAO, 1993).

6.8 Agentes fungicidas para el control de *Lasiodiplodia theobromae*

Existen numerosos estudios realizados para controlar a *L. theobromae* una vez detectado en el cultivo. A continuación, se brindan algunos ejemplos de estudios realizados, así como su alcance con este tipo de agentes.

Hacia 1995 un grupo de científicos liderado por HY Li, evaluó fungicidas *contra L. theobromae* y *Botryosphaeria dothidea* causantes de gomosis en duraznos y albaricoque, encontrando que el fungicida metil-tiofanato inhibió el crecimiento micelial, la germinación de conidios y controló el desarrollo de la enfermedad en árboles de albaricoque; también reportaron que los fungicidas asperjados, metil-tiofanato 70WP y carbendazima 50WP se pueden usar como tratamiento auxiliar

para prevenir la infección del patógeno.

En cítricos, Varela et al. (2013) reportan la aplicación de benomyl y compuestos a base de oxiclورو de cobre contra *L. theobromae* en las distintas etapas del cultivo. Canales (1998) sugiere, para el control del cáncer de tronco y ramas de mango, realizar una cirugía en los cánceres hasta eliminar el tejido dañado y aplicar Benlate(r), Tecto 60(r) o Derosal 50(r) en las heridas. También en mango, en la muerte descendente se recomienda podar las heridas y realizar aspersiones de fungicidas a base de cobre cada 15-20 días, también se puede aplicar los productos Captán, Maneb, Zineb y Benomyl, desde el inicio de la floración hasta un mes antes de la cosecha (Tucuch et al., 2005).

6.9 Fungicidas y su toxicidad

Hoy en día la mayoría de los controles para microorganismos patógenos suele realizarse principalmente de forma química como se puede verificar en el apartado anterior, incluso más allá de las posibles consecuencias por bio acumulación y riesgos a la salud de tales componentes. Sin embargo, el uso de compuestos sintéticos llega a considerarse limitado debido a varios efectos indeseables, estos van desde la toxicidad aguda hasta la carcinogenicidad, e incluso la teratogenicidad, además del requerimiento normativo de un período de degradación prolongado con el consiguiente desarrollo de problemas de contaminación ambiental (Galvez et al., 2014). La toxicidad de los pesticidas incluyendo fungicidas suele ser evaluada en función de su dosis letal o toxicidad relativa aguda (DL50 o CL50). DL50 es la dosis a la cual la mitad de los animales de ensayo mueren y se mide en miligramos de sustancia estudiada por kilogramo de animales (mg / kg). Cuanto mayor sea la DL50, menos tóxico del material. Algunos fungicidas por ejemplo los triazoles se absorben rápidamente y distribuidos en todos los tejidos de quien los consume y estos compuestos presentan diversos efectos deletéreos sobre los sistemas biológicos de mamíferos, especialmente en el sistema nervioso (Faro, 2010).

7 Plantas con potencial antifúngico

Las preferencias de consumo han migrado hacia la obtención de alimentos libres de aditivos químicos toda vez que cuenten con características específicas como frescura e inocuidad (Da, et al., 2013) por ello; la ciencia estudia opciones de conservación para lograr alimentos que no contengan aditivos innecesarios, metabolitos o compuestos bioactivos producidos por las plantas son alternativas prometedoras, con una amplia capacidad de producir variedad de compuestos que a menudo poseen propiedades antimicrobianas. Se ha encontrado que compuestos presentes en hidrolatos, extractos y aceites esenciales vegetales poseen una amplia actividad antibacteriana demostrada, además de propiedades antifúngicas, insecticidas y antioxidantes. (Tajkarimi et al., 2010). De igual forma se ha observado un incremento de consumidores con una nueva *conciencia* acerca de los problemas causados por hongos en la última década, lo que ha derivado en un consumidor con fuerte interés y convicciones hacia productos con menos aditivos y más "naturales", (Soković et al., 2013). Las preferencias observadas a nivel de mercado no solo son tendencia, sino que se encuentran basadas en estudios que avalan la efectividad de ciertas sustancias de origen natural como los aceites esenciales contra contaminantes biológicos en los alimentos. Hierbas, frutos además de especias han sido reconocidas por poseer un amplio espectro de componentes activos que exhiben actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, y/o actividades antivirales (Hyldgaard et al., 2012).

Estos compuestos pueden ser letales para los microorganismos o inhibir ciertos metabolitos, es en ese sentido que, remitiéndonos al uso ancestral, incluso de siglos, los aceites esenciales han sido empleados por la medicina tradicional natural. Los extractos líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces) son parte de la premisa propuesta para lograr fines benéficos en el campo del tratamiento e inocuidad alimentaria. Los principales grupos de componentes que hacen a los aceites esenciales antimicrobianos eficaces incluyen saponinas,

flavonoides, carvacrol, timol, citral, eugenol, linalol, terpenos y sus precursores (Burt, 2004). Es así como aceites esenciales y componentes de distintas plantas, presentan un potencial como agentes antimicrobianos naturales

8 Mamey: descripción, panorama y uso como agente antifúngico.

Perteneciente a la familia *Sapotaceae* y al género *Pouteria* el mamey es nombrado científicamente como *Pouteria sapota*. Tiene características sensoriales que lo hacen ser considerado con un alto valor de consumo. (Sarukhán, 1998). En México la región de mayor distribución de cultivos son las zonas tropicales de selva alta perennifolia de forma natural o bien, domésticamente es cultivado con otros frutales en huertas de poca extensión. (Schwentenius et al., 2014).

El fruto de mamey es una baya indehiscente cuya forma varía considerablemente aun entre plantas de la misma población; pueden ser fusiformes alargados y asimétricos, elipsoidales o casi esféricos, de 10 a 25 cm de largo por 8 a 12 cm de ancho, su peso varía desde los 227 gr a 2.3 kg (Diaz et al., 2000). El epicarpio es grueso y quebradizo, este puede estar cubierto, total o parcialmente por capas corchosas derivadas de lenticelas. La capa de esclereidas debajo del epicarpio es densa y a ella se debe la cáscara quebradiza cuando los frutos están maduros (Almeyda et al., 1976). El grosor del epicarpio es de 0.5 mm. El mesocarpio varía considerablemente en textura y color, de rojo anaranjado a grisáceo (Almeyda et al. 1976) con temporada de maduración de diciembre a Marzo (Domínguez et al. 2010).

En su interior tiene por lo general una semilla (endocarpio), en ocasiones dos de forma alargada y superficie lustrosa, color negro o café, así como una longitud aproximadamente la mitad del largo de la fruta. La pulpa es firme, aromática y muy dulce, de color naranja a rojizo cuando está muy madura. La forma de la semilla es alargada y dentro almacenan una “almendra” de textura suave y de sabor amargo.

En la actualidad en México y otros países tiene uso gastronómico, sin embargo, el fruto verde en pequeñas cantidades se utiliza como analgésico, como un producto

astringente y para el control de la diarrea (Arzudia, 2006). La semilla también es aprovechable, ya que de ella se extraen aceites que son utilizados en la industria de cosméticos (Takeda et al., 1997). A escala local en México, se usa como abrillantador para el cabello. En Trinidad y Tobago un extracto de las semillas es usado para el control de ectoparásitos en perros (Cheryl et al. 2000), además contiene entre 50 y 60% de aceite semisólido de color blanco, que es comestible. Este aceite es utilizado en la industria cosmética con la que se elaboran cremas, jabones, además de que su semilla se utiliza también para combatir la sinusitis, bajar la fiebre y, vía oral, para controlar enfermedades renales; combinada con alcohol combate enfermedades artríticas o reumáticas (Guezada, 1996, citado por Chinchilla, 2008; Arzudia, 2006). El aceite extraído de la semilla aplicado localmente se utiliza para enfermedades pectorales y para el control de dolores de ojos y oídos (Arzudia, 2006).

9 Metodología

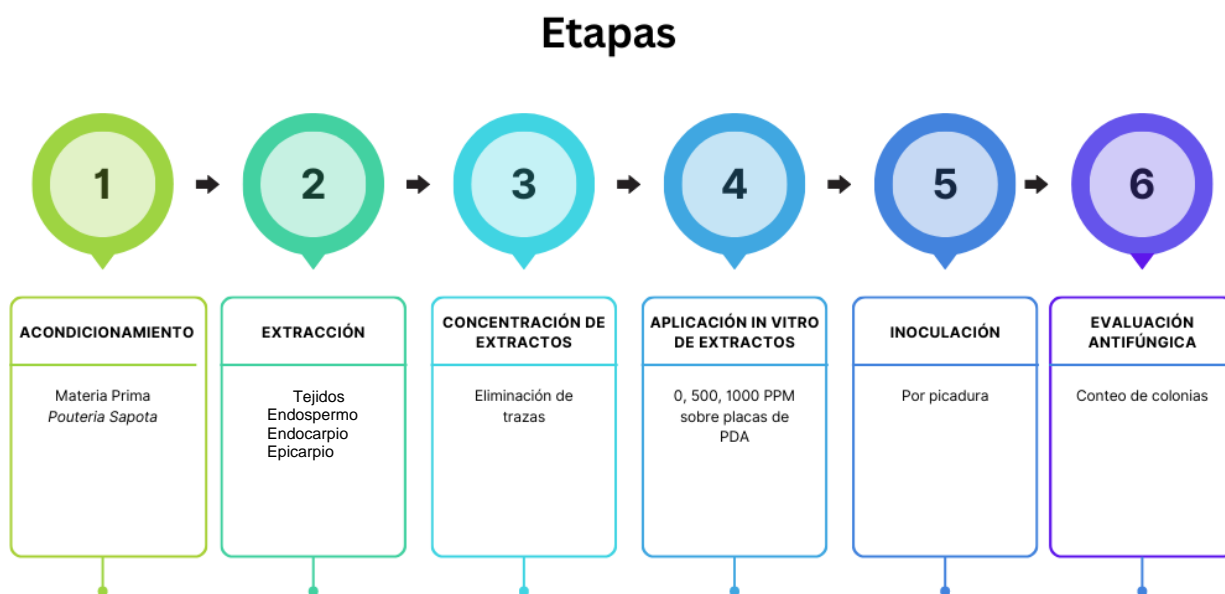


Figura 2 Diagrama de etapas de metodología para el estudio de inhibición planteado por Camilo-Patiñon et al, 2013.

10 Materiales y métodos

Como se muestra en la figura 2 se desarrollarán las etapas de la metodología con los siguientes apartados.

10.1 Acondicionamiento

- ✓ Adquisición de materia prima (frutos de mamey) en el mercado local de la Ciudad de Puebla.
- ✓ Verificación del grado de madurez del fruto
- ✓ Pesaje de frutos
- ✓ Lavado y desinfección de frutos con solución de hipoclorito de sodio al 1% (dilución en agua).
- ✓ Despulpado de fruto.
- ✓ Diferenciación de rendimiento, indicando peso en cada tejido del fruto en (gr) endospermo, endocarpio y epicarpio.
- ✓ Lavado y desinfección de endocarpio y epicarpio.
- ✓ Secado en estufa bacteriológica marca RIOSSA a una Temperatura = 50° C por un lapso de 5 días hasta cumplir la condición de peso constante.
- ✓ Pulverización de endocarpio y epicarpio hasta la obtención de partículas finas con un molino marca Krups modelo GX410011V.
- ✓ Tamizado con malla 500 μ m.
- ✓ Almacenamiento del polvo en bolsas de cierre hermético a temperatura ambiente 20 \pm 2 °C, en un sitio oscuro, fresco y seco, hasta su posterior utilización

10.2 Extracción maceración

- ✓ Ensamble incubadora de agitación orbital Marca Ayspel aparatos, modelo INO,4-50.
- ✓ Adicionar el solvente (200 mL de etanol), de acuerdo con la metodología propuesta y controlando la temperatura 25°C y con agitación a 60 rpm.

- ✓ Adicionar el material vegetal acondicionado en el paso anterior 75 g
- ✓ Recircular extracción por un tiempo total de 72 horas.

10.3 Concentración de extractos

- ✓ Ensamble rotavapor marca Heidolph, Alemania.
- ✓ Adicionar de extractos.
- ✓ Condiciones de control: temperatura = 45°C, velocidad de rotación = 150 rpm con presión de vacío.
- ✓ Eliminación trazas de etanol.
- ✓ Almacenar extractos a condiciones de temperatura de -20°C.

10.4 Aplicación in vitro de extractos

- ✓ Obtención de cepa purificada de *Lasiodiplodia theobromae* donada por el Colegio de Posgraduados Campus Puebla.
- ✓ Análisis de viabilidad de la cepa.

Reproducción en cuñas de PDA y resiembra cada 30 días.

10.5 Inoculación

- ✓ Acondicionamiento de placas PDA.
- ✓ Inocular esporas lavadas de cepa por picadura con alícuotas de 10µL. Concentración de esporas: 10⁶ esporas/ml contados en cámara de Neubauer.
- ✓ Incubar a temperatura a 28°C hasta cobertura total de la placa.

10.6 Evaluación de actividad antifúngica

- ✓ El crecimiento promedio radial acumulado se determinará en cuatro ejes, la medición se realizará hasta que el micelio cubra toda la placa (French y Hebert, 1981).
- ✓ Se determinará el índice de inhibición del crecimiento del micelio:

$$GIC = \frac{CMC - CMM}{CMC} \times 100$$

CMC = crecimiento del micelio en el control

CMM = crecimiento del micelio en los sistemas modelo

GIC = grado de inhibición del crecimiento

- ✓ Finalmente se obtendrán las cinéticas de crecimiento, fase Lag y velocidad de crecimiento radial máxima para cada tratamiento.

10.7 Análisis estadístico

- ✓ De acuerdo con el diseño experimental propuesto se analizará el efecto de los tratamientos (variables independientes) sobre las variables de respuesta, mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, seguido por pruebas de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre las variables de respuesta.

11 Desarrollo experimental

11.1 Puesta a punto

Una vez analizada la bibliografía y planteado la metodología (Camilo-Patiñon et al, 2013) se procedió a la selección indicada de materias primas. Comenzando con la adquisición de frutos en la Ciudad de Puebla, verificando el grado de madurez de los frutos de forma visual, así como las características de sanidad o forma regular

del epicarpio toda vez que pueda ser lavado y desinfectado con solución de hipoclorito de sodio al 1%.

Una vez realizado el paso anterior el siguiente paso fue buscar garantizar la sequedad del material vegetal, para ellos se sometió a secado en una estufa bacteriológica a 50°C durante 5 días (figura 3). Posteriormente las cáscaras fueron pulverizadas en partículas finas con un molino manual para grano, seguido de un tamizado con malla de 500µm. El material vegetal procedente del Mamey tratado se almacenó a temperatura ambiente en bolsas con cierre hermético a temperatura ambiente en un lugar obscuro, seco y fresco, hasta su uso.

11.2 Obtención y concentración de los extractos

En este paso el procedimiento seguido fue la toma de 75g de polvo de materia vegetal seleccionada del endospermo, endocarpio y epicarpio de Mamey adicionándolos a 200ml de etanol con temperatura de 25°C y agitación (60rpm) como se muestra en la figura 4, realizando concentraciones cada 24 horas por tres días. Los macerados fueron concentrados con un rotavapor (Marca Heidolph, Modelo Hei-VAP value digital), bajo las siguientes condiciones, temperatura de 45°C y velocidad de 150 rpm, este proceso se puede apreciar en la figura 5. Posteriormente los concentrados se filtraron con papel Wathman 4 y se almacenaron a -20 °C.



Figura 3 Tejidos de Mamey

Figura 4 Maceración

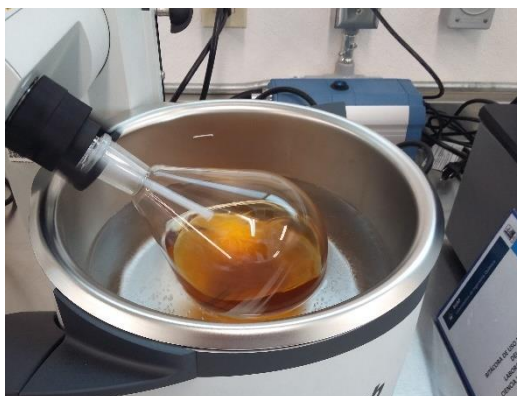


Figura 5 Concentración de extractos

12 Evaluación de la actividad antifúngica

12.1 Cultivos fúngicos

La cepa empleada en el presente trabajo fue *Lasiodiplodia theobromae*, misma que fue aislada de frutos de mamey e identificada mediante análisis macroscópicos y de secuenciación genética provenientes de una donación realizada por el Colegio de Posgraduados Campus Puebla. Se indica por el referente de la cepa que los cultivos fúngicos fueron mantenidos en el medio agar papa dextrosa (PDA) y se sembraron cada mes para garantizar su viabilidad.

12.2 Inoculación de los sistemas modelo

Nuestros sistemas modelo fueron desarrollados en placas de PDA adicionadas con 0, 500, 1000 mg/L del extracto de mamey. Estos sistemas fueron inoculados por el método de picadura con alícuota de 10 μ L de un lavado de esporas, ajustada a una concentración de 10^6 esporas/mL. Posteriormente los sistemas fueron incubados a $25\pm 3^\circ\text{C}$ durante 28 días.

Pasado el tiempo marcado en la metodología nuestro siguiente paso consistió en la medición del crecimiento radial en milímetros (mm) para cada uno de los sistemas modelo con un vernier figura 6 con lo que se procedió relacionar con el tiempo de incubación. Con lo anterior se obtuvieron las cinéticas de crecimiento. el cubrimiento de total de la caja. La actividad antifúngica se reportó en las siguientes tablas y se analizó mediante las curvas de crecimiento presentadas a continuación.

14 Discusión de resultados

En la figura 6 se observa el desarrollo del hongo *L. theobromae* premisa de este estudio sobre los sistemas modelo en las concentraciones consideradas para analizar: 500 y 1000 ppm en relación con el control a partir de los diferentes tejidos de mamey *P. sapota jaq.* Resulta evidente el grado de inhibición de crecimiento en las placas PDA con extractos aplicados en cada prueba, lo anterior puede deberse en cierta medida a la presencia de sustancias propias no solo del mamey, sino de algunas frutas con características similares capaces de producir metabolitos secundarios a lo largo del crecimiento y desarrollo del fruto (Segura et

al., 2018) como lo son los betacarotenos y los ácidos fenólicos o bien fenoles totales.

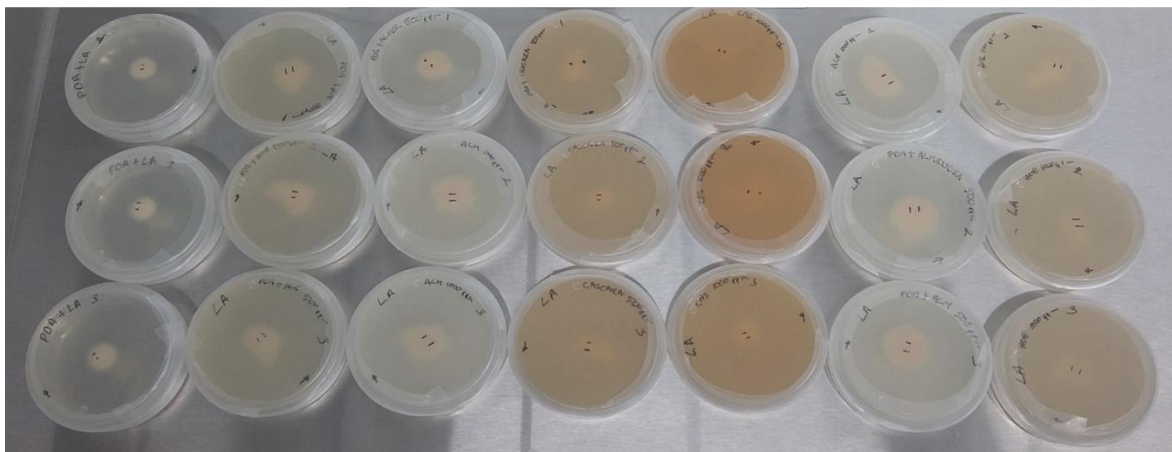


Figura 6 crecimiento radial de *Lasiodiplodia theobromae* en pruebas de placa PDA

Estudios similares en cultivos de plantas de tomate demuestran amplia efectividad de los grupos alfa y beta carotenoides para inhibir el crecimiento de diversos hongos en su desarrollo y manejo (Antonio, J.M. 2018). De igual forma estudios llevados a cabo en España documentan la acción efectiva de compuestos fenólicos en la protección de la vid frente a enfermedades de origen fúngico producidos por *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, y *Botrytis cinerea* (Masa, A. 2015) cuya fisonomía y desarrollo es similar a *Lasiodiplodia theobromae*, en este caso en particular, los resultados de la investigación, coinciden con el interés de nuestra propuesta en el control biológico de agentes fitopatógenos como una respuesta estratégica que explora fuentes de resistencia natural frente a los patógenos.

Por otro lado, frutos y vegetales producen una gran variedad de metabolitos secundarios en su proceso de crecimiento primordialmente flavonoides y compuestos fenólicos, estos han demostrado propiedades de interés en la defensa frente a enfermedades de origen fúngica de forma natural; en este sentido encontramos a las fitoalexinas, moléculas que tienen una vida corta (72-96 horas) lo que les confiere una propiedad biodegradable no acumulable en el medio ambiente (Masa, A. 2015).

Las fitoalexinas se definen como “compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que son sintetizados y acumulados en los vegetales después de la exposición a microorganismos o agentes abióticos” (Paxton, J.1980), entre los compuestos que actúan como fitoalexinas los más importantes son aquellos de naturaleza fenólica, componentes del metabolismo secundario que pueden estar localizados como formas libres en las vacuolas o formar parte de las paredes celulares y que abundan en los frutos.

Estructuralmente estos compuestos poseen un anillo aromático de al menos un grupo hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales; partiendo de la estructura más sencilla: el fenol, con un único anillo aromático y un grupo OH como único relevo en su molécula, y a partir de esta estructura se construye toda una serie de compuestos de mayor complejidad que son considerados “fenoles totales” (Xu et al., 2008).

Es importante esta descripción como respuesta a la inhibición observada a lo largo de los tiempos de crecimiento del hongo en la presente investigación, puesto que conforme a lo documentado el mamey contiene estas sustancias con mayor o menor concentración en su estructura partiendo del endospermo alta presencia de compuestos fenólicos, su coloración y maduración son una respuesta a la presencia de flavonoides, principalmente carotenoides identificables por su color característico, ambos compuestos forman parte de la resistencia natural del fruto ya que estos compuestos que pueden irrumpir en las paredes de las células fúngicas inhibiendo la síntesis de ergosterol como lo hacen los compuestos químicos sintéticos triazoles mediante otro mecanismo (Alfonso et al., 2015).

Los gráficos de las figuras 7, 8 y 9 permiten apreciar gráficamente que, para los extractos obtenidos a partir del epicarpio, existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la disminución de la velocidad de crecimiento del hongo a razón de 0.016 y 0.017 mm/h en comparación con el control (0.020mm/h) respectivamente.

Un punto importante que discutir en este análisis es la similitud existente en el retraso de la velocidad de crecimiento del hongo, por lo que incrementar las concentraciones de los extractos puede resultar factible en la observación de una mayor inhibición, estudios similares demuestran que puede deberse a la presencia de flavonoides presentes en el epicarpio, compuestos característicos aunque no exclusivos de la familia *sapotacea*, como catequina y epicatequina, miricetina, dihidromiricetina todos flavonoides polifenólicos o ácido gálico, un ácido fenólico antioxidante (Baky, 2016), cuya actividad inhibidora es similar a la acción del antifúngico sintético comercial nistatina (Ertürk, 2006).

La nistatina es un compuesto antifúngico sistémico de origen sintético con conformaciones de estructura polienica, cadenas insaturadas de 3 a 6 grupos carbonilo con dobles enlaces y un aromático en sus radicales, este tipo de compuestos comerciales de uso indiscriminado ocasionan efectos adversos en la salud ya que provocan anemia, leucopenia, trombocitopenia, náuseas, vómito, diarrea, anorexia, cefalea, parestesias, alteraciones en la función renal, hipotensión entre otros debido al método aplicación, ya que se absorben por unión a los esteroides como ergosterol y colesterol depositándose en las membranas celulares de los tejidos adiposos (Rodríguez et al., 2013), un mecanismo similar al ocasionado en las células de los hongos fitopatógenos.

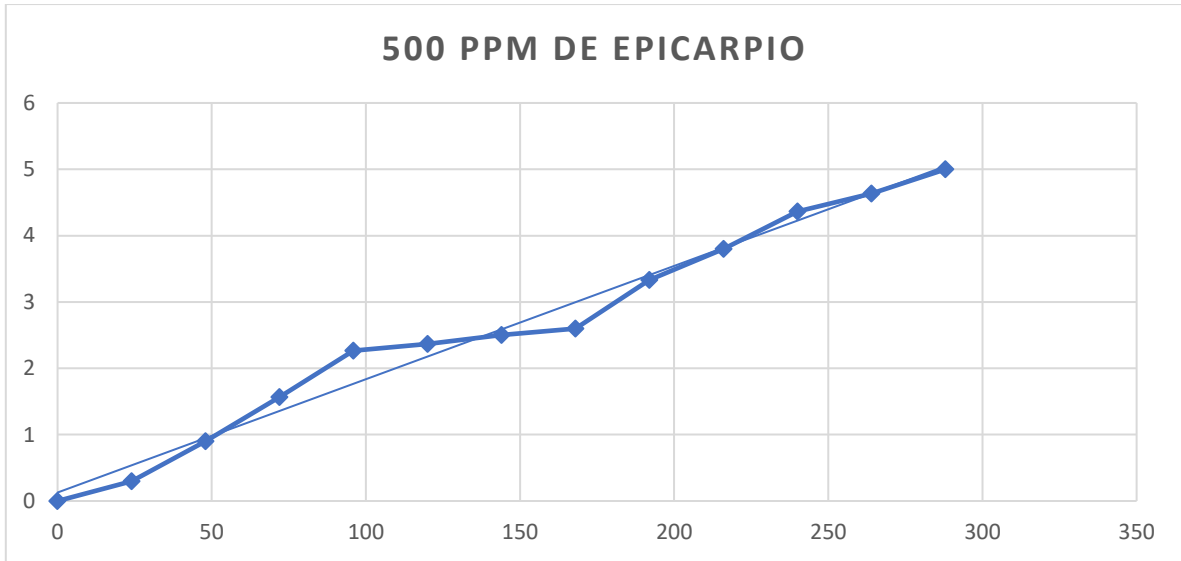


Figura 7 velocidad de crecimiento 500 ppm epicarpio

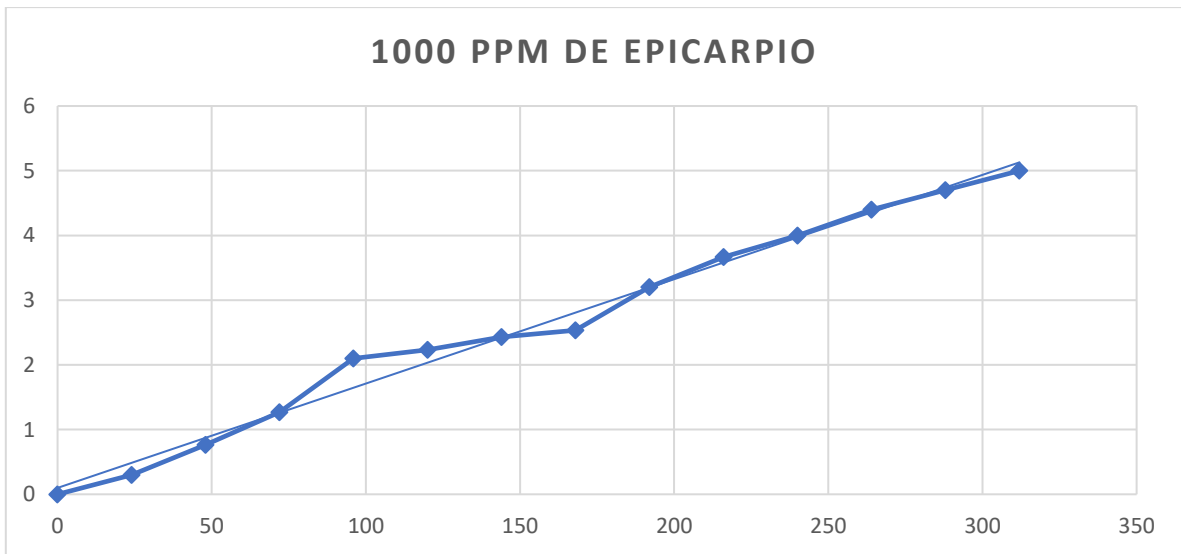


Figura 8 velocidad de crecimiento a 1000 ppm epicarpio

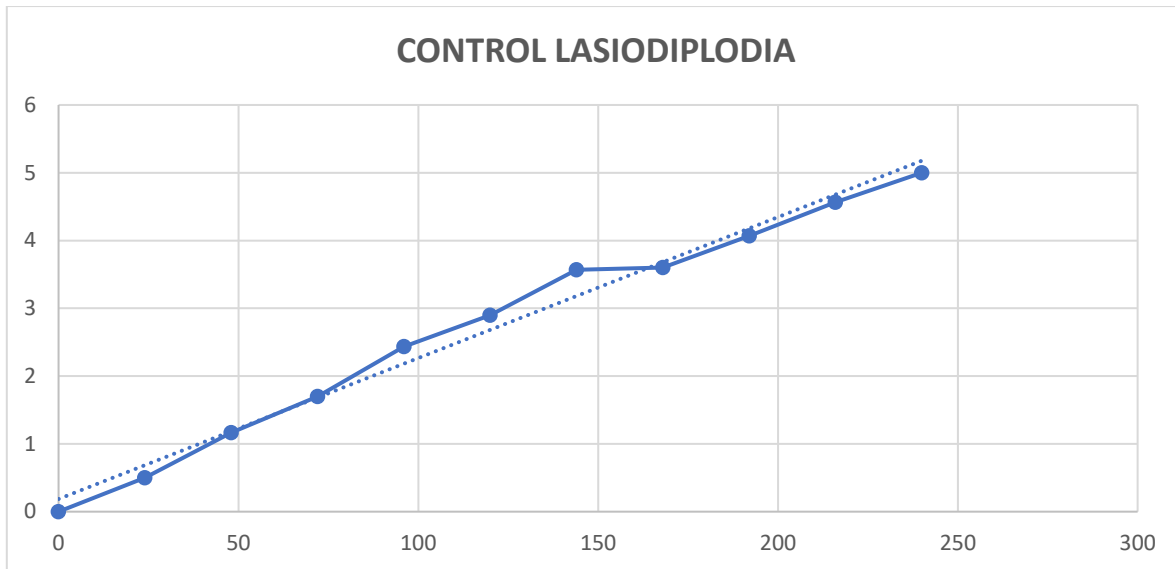


Figura 9 velocidad de crecimiento control epicarpio

Por otro lado, se puede apreciar el incremento en el tiempo requerido por el hongo para alcanzar la fase estacionaria (crecimiento radial de 5 mm) a mayor concentración, en este sentido a 500ppm el tiempo fue de 288 horas, a 1000 ppm requirió 312 horas que hace una diferencia ($p \leq 0.05$), respecto del control con un tiempo de 240 horas.

Dado el enorme riesgo que esto ha representado en el campo de la fitosanidad la similitud respecto a la respuesta antifúngica puede deberse a que los extractos etanólicos aplicados con presencia de flavonoides de anillos aromáticos (bencénicos) que actúan inhibiendo la actividad metabólica de los hongos como hacen los antifúngicos sintéticos (Pemán et al., 199), esto es más visible al comparar las tendencias respecto a la velocidad de crecimiento como se muestra en la figura 10.

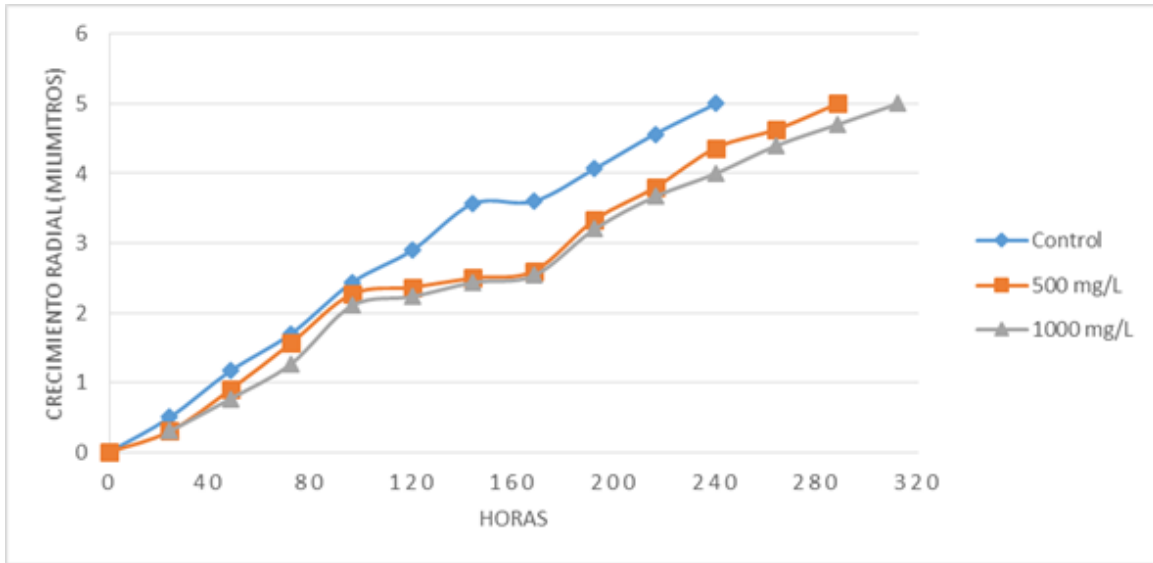


Figura 10. Cinéticas de crecimiento de *L. theobromae* en sistemas modelo con 0, 500 y 1000 mg/L de extractos de epicarpio de mamey.

En los gráficos de las figuras 11, 12 y 13, 14 respectivamente se aprecia que, para los extractos obtenidos de materia vegetal proveniente de los tejidos endospermo y endocarpio, existe también evidencia de la disminución significativa ($p \leq 0.05$), de la velocidad de crecimiento del hongo con 0.015 mm/h para el primero y 0.014 mm/h a nivel de endocarpio, en comparación con el control 0.020 mm/h. Un punto importante que discutir en este análisis es la similitud existente en la velocidad de crecimiento por lo que incrementar las concentraciones de los extractos puede resultar factible en la observación de una mayor inhibición.

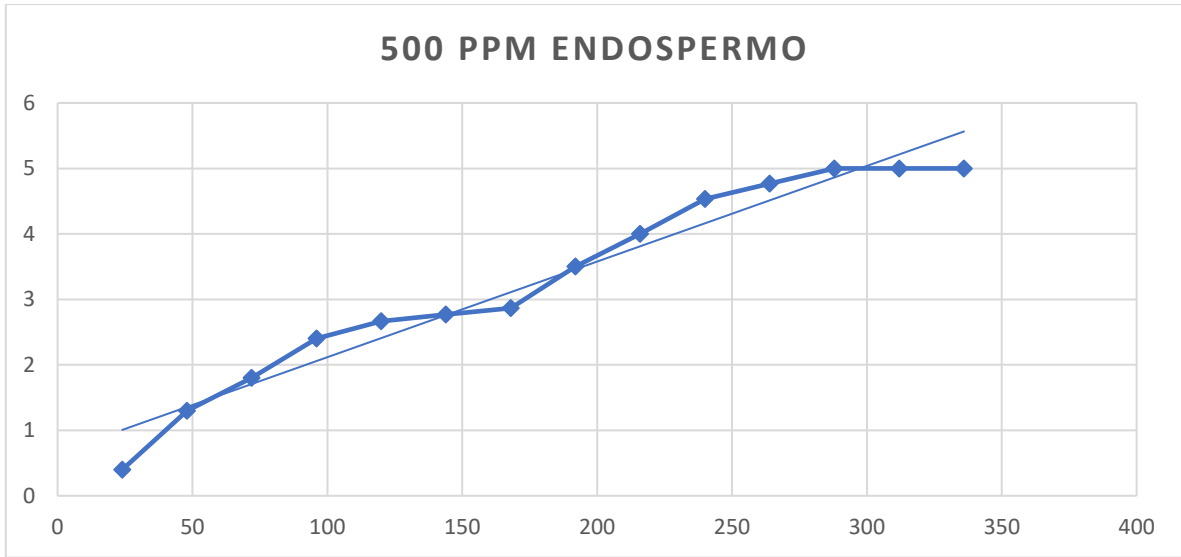


Figura 11 velocidad de crecimiento 500 ppm endospermo

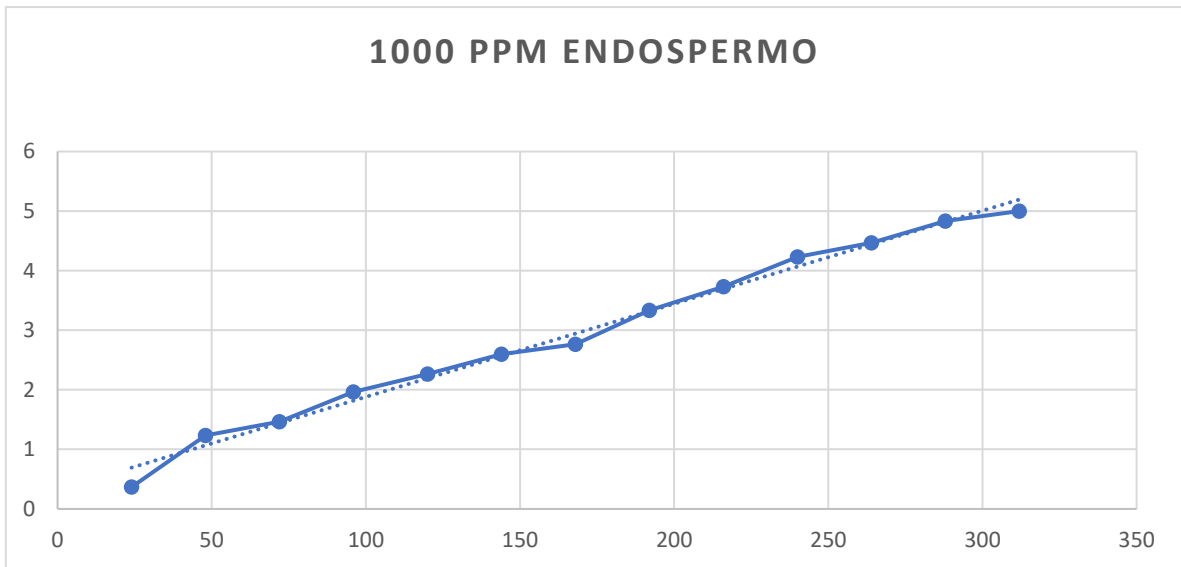


Figura 12 velocidad de crecimiento 1000 ppm endospermo

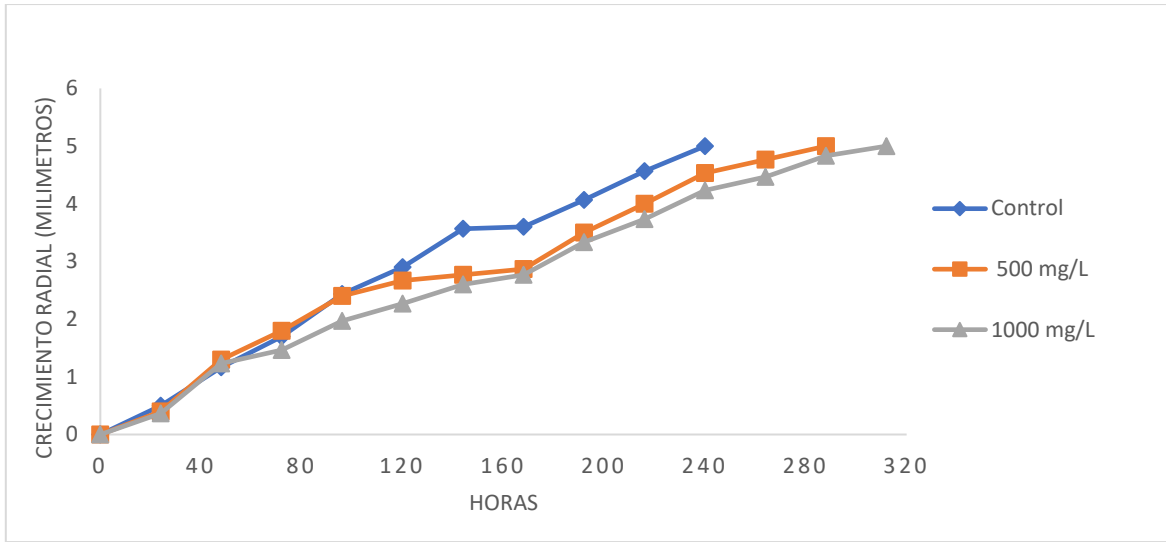


Figura 13 Cinéticas de crecimiento de *L. theobromae* en sistemas modelo con 0, 500 y 1000 mg/L de extractos de endospermo de mamey.

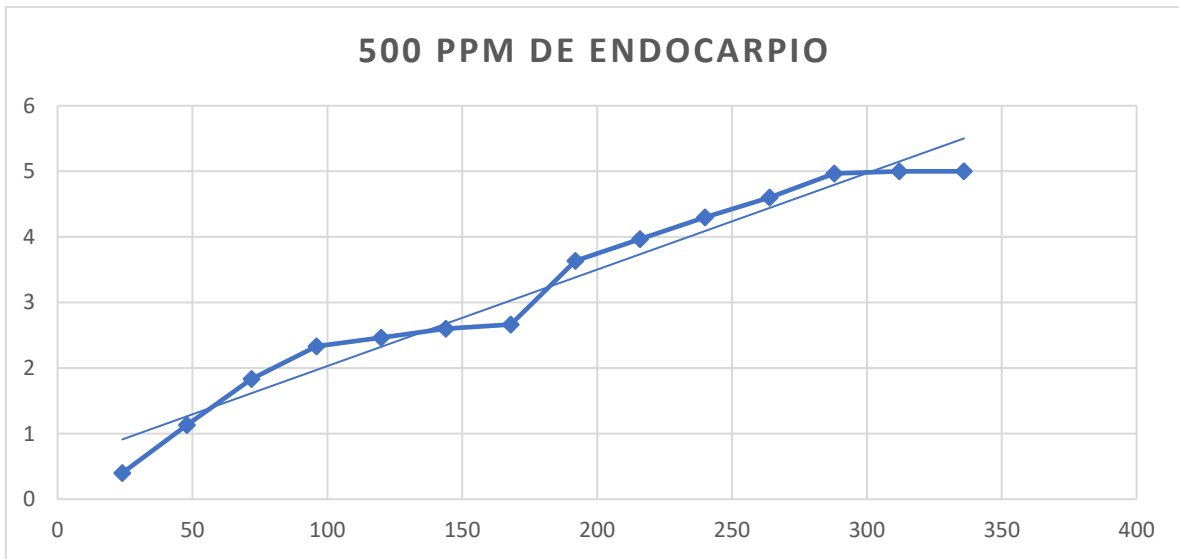


Figura 14 velocidad de crecimiento 500 ppm endocarpio

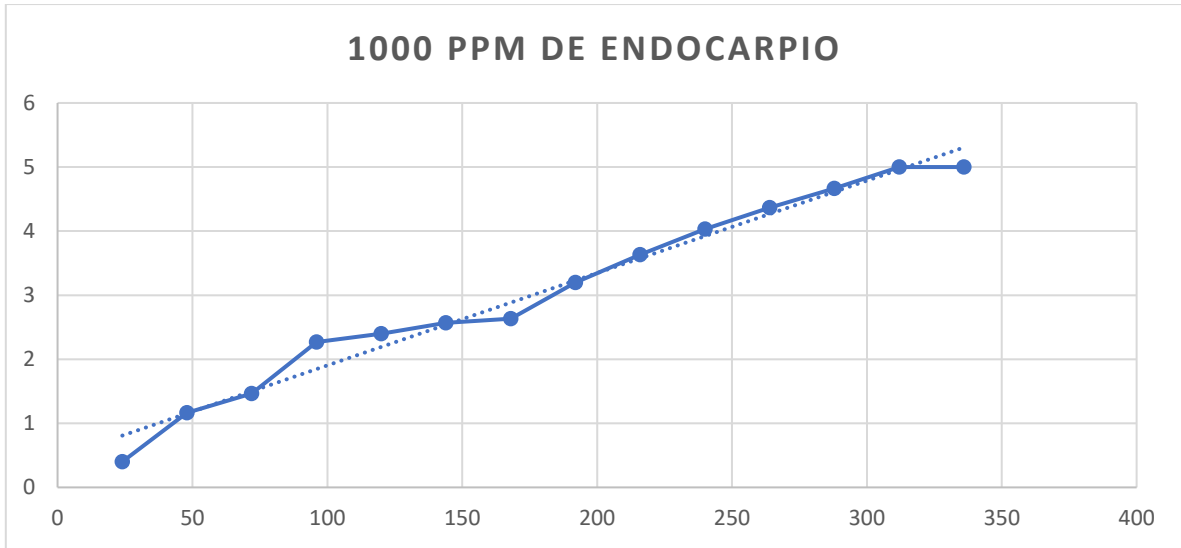


Figura 15 velocidad de crecimiento 1000 ppm endocarpio

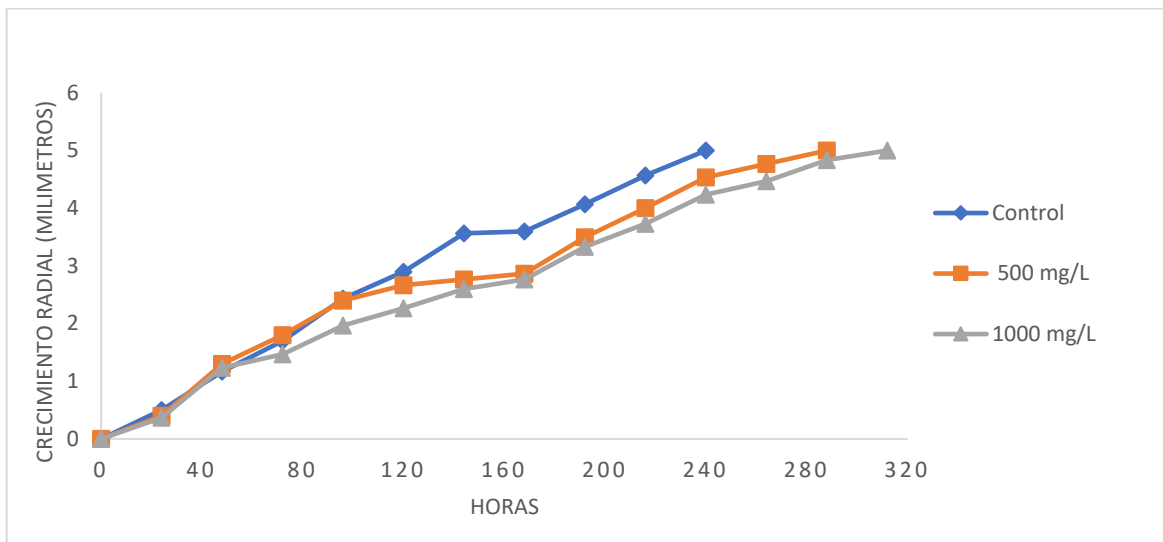


Figura 16 Cinéticas de crecimiento de *L. theobromae* en sistemas modelo con 0, 500 y 1000 mg/L de extractos de endocarpio de mamey.

La inhibición del crecimiento micelial como efecto antifúngico de los tratamientos en el endocarpio (figura 15) pueden estar en función de los componentes presentes en las estructuras del tejido como se mencionó anteriormente; otros estudios abordan la capacidad de *P. sapota* para reducir el crecimiento en los hongos debido nuevamente a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides o saponinas (Moo-Huchin et al., 2013) cuyas características tensoactivas son similares al mecanismo

de reacción de los triazoles químicos cuya función específica se centra en el rompimiento de las membranas celulares conformadas por ergosterol y polisacáridos (debido a su parte polar hidrófila) evitando acumulen la humedad requerida para el desarrollo de sus fases de crecimiento.

La figura 16 muestra un comparativo en función de las velocidades de crecimiento que denota la no existencia de una fase inicial de adaptación para este experimento representada por un valor de cero, el crecimiento del hongo es inmediato con tendencia a la fase exponencial hasta las 80 horas con un crecimiento de 1 mm en las placas, a partir de este punto la línea de prueba a una concentración de 1000 ppm de extracto de endocarpio se separa a las 150 horas se comienza a igualar a la concentración de 500 ppm dejando el crecimiento en 2.2 mm ambas concentraciones comparativamente a los 3.8 mm del control, esto significa que el control ha desarrollado un 76% de crecimiento respecto a los 5 mm de placa y los extractos 44%, la diferencia de inhibición a este tiempo es de 32%, esto evidencia el proceso de inhibición, la tendencia de las pendientes continúan para el control cubriendo la placa completamente en 240 horas, la concentración de 500 ppm en 290 horas y 1000 ppm en 320 horas, se puede presuponer como indican las referencias que la actividad antifúngica es en efecto mayor respecto a los otros tejidos, probablemente debida a la composición y compuestos provenientes del endocarpio, mismos que a su vez resultan ser opciones viables adecuadas debido a su baja o nula toxicidad en beneficio del tema de inocuidad alimentaria, así como ambientalmente por la poca persistencia en el ecosistema en comparación con fungicidas químicos sintéticos (Picos-Muñoz et al., 2015).

Por último, se reportan los promedios n=3, de los porcentajes de inhibición para cada concentración en las 3 pruebas para las concentraciones de 500 y 1000 ppm de los diferentes extractos de mamey como se muestra en la figura 17.

Concentración adicionada por prueba	500 ppm	1000 ppm
--------------------------------------------	----------------	-----------------

Porcentaje de inhibición por extracto en:	%	%
Endospermo	8.48^a	15.92^d
Endocarpio	18.74^b	23.54^f
Epicarpio	7.08^c	11.49^g

Tabla 1. Porcentajes de inhibición promedio por tratamiento a diferentes concentraciones. Letras diferentes en columna, indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$), $n=3$. Valores promedio en porcentajes de inhibición máximos alcanzados en 12 de los 28 días experimentales.

De acuerdo con los datos presentados en la tabla anterior, se observa una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) cuando se evaluó el porcentaje de inhibición, el efecto se demuestra desde concentraciones muy bajas brindando resultados satisfactorios a la hipótesis planteada; siendo el mayor grado el alcanzado a una concentración de 1000 ppm con el extracto obtenido en el endocarpio o hueso de la semilla, este valor corresponde con un porcentaje de 23.54% con un comparativo superior a las otras pruebas también en concentración de 500 ppm de 18.74%.

En general tanto endospermo como endocarpio reportan el promedio de mayor inhibición incluso a concentraciones de 500 ppm, dejando con la tasa de menor grado significativo los valores de extractos obtenidos en el epicarpio o cáscara de mamey.

15 Conclusiones

A partir de los resultados de la investigación, se plantean las siguientes conclusiones y sugerencias:

- Al planteamiento de la problemática generada en términos de fitosanidad, así como de inocuidad, incluso calidad a diferentes escalas por la presencia del hongo *Lasiodiplodia theobromae* en diferentes etapas de la cadena productiva; sea cultivo, cosecha, traslado y/o consumo como elemento de preocupación, el reto abordado en este estudio es concluyente respecto a la hipótesis demostrando que a diferentes concentraciones los diferentes extractos obtenidos de los tejidos del Mamey cuentan con condiciones propicias para inhibir el crecimiento del hongo.
- La opción de emplear extractos etanólicos es debida a su facilidad de manejabilidad incluso económicamente y a que se ha podido demostrar que cuentan con la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo como se pudo observar en las 3 series de mediciones, tanto respecto al crecimiento radial sobre las placas PDA así como respecto al tiempo que en términos de control fitosanitario resulta valiosísimo como herramienta de previsión.
- A pesar de los valores analizados positivamente como respuesta, el mejor tratamiento de inhibición fue el aplicado con extracto del endocarpio de mamey, en este se redujo la capacidad del hongo de crecer a partir de las 48 horas, probar variaciones de concentración de extractos empleando este tejido podría elevar la eficacia de uso hasta el nivel deseado, incluso en casos de algunos otros hongos encontrados dentro de cadenas productivas que generan problemas similares como *Aspergillus niger* o *Colletotrichum acutatum* organismos causales de daños severos de fresa, arándano, cítricos, manzana, aguacate, café, guayaba, papaya, durazno y pino.

- La actividad antifúngica de los extractos etanólicos obtenidos del mamey, puede deberse principalmente a su contenido de una amplia variedad de flavonoides pertenecientes al grupo de los fenoles. Conforme a lo revisado en la bibliografía, la capacidad inhibitoria que, además de ser de uso natural como defensa de patógenos en los frutos, así como en los vegetales ha sido estudiada y empleada en diversas pruebas con resultados positivos como este.
- El endocarpio se mostró como la estructura del mamey con mayor efecto antifúngico en este estudio, si bien el método de extracción elegido ha resultado positivo, se propone en caso de futuros estudios verificar su empleabilidad, sugerimos comenzar a utilizar concentraciones de 500 ppm como control inhibitorio inicial. ya que el doble de concentración solo incrementará su efectividad un 5% y requerirá mayores insumos, probablemente combinaciones mixtas de extractos purificados, con caracterizaciones definidas, incluso logradas por otros métodos de extracción o diferentes solventes puedan brindar mejores efectos en casos donde patógenos han tenido mayor incidencia, incluso en cultivos diversos donde *Lasiodiplodia theobromae* también es indeseable, los tiempos de respuesta al desarrollo son una condicionante en definitiva, a este respecto una mayor concentración puede valorarse en relación directa a la variable tiempo.
- Los resultados obtenidos plantean una respuesta positiva con amplio margen de escala, a una mayor variación de concentraciones estos resultados pueden extrapolarse determinantemente para la empleabilidad en diferentes combinaciones como alternativa el control de diversos hongos y diversos cultivos.

- Estudios como este cuentan con un valor Científico, Teórico, Metodológico y Referencial por lo que su impacto va más allá de la respuesta positiva a la solución de un problema particular, su alcance y perspectiva en base a los resultados trascienden hacia la seguridad agroalimentaria con alto impacto social y de salud pública.

16 Sugerencias

- Los sistemas modelo evaluados en este estudio sugieren la viabilidad de uso, sin embargo, un mayor enfoque en clasificación y especificidad para aislar e identificar los compuestos activos en el fruto puede dotar de un mayor efecto potencial sobre los cambios morfológicos, moleculares o bioquímicos que interfieran con el desarrollo temprano de *Lasiodiplodia theobromae*, permitiendo aumentar su rango de acción, variando las concentraciones de uso, permitiendo incluso optimizar costos y tiempos de respuesta.
- El estudio de aplicación, así como una mayor investigación o empleo de mejores técnicas de purificación en estos tejidos como la biosíntesis y caracterización bioquímica pueden resultar una propuesta interesante de manejo para elevar su eficiencia de uso y aprovechamiento de todo el fruto.
- Es importante continuar realizando caracterizaciones específicas de los grupos funcionales que disminuyen el desarrollo de microorganismos patógenos o deteriorativos presentes en extractos vegetales para su potencial uso en la agroindustria.
- Se sugiere probar concentraciones de uso en pruebas con otros patógenos como los de estudios paralelos similares de modo que se pueda formular desde la caracterización una síntesis más efectiva que le permita funcionar a nivel comercial en términos de eficacia y costo – beneficio.

- Finalmente, algunos estudios indican que los residuos generados por los extractos etanólicos tienen una corta duración en el medio ambiente, y no generan bio acumulación en términos de aplicación o consumo, aumentando las posibilidades de uso sin alterar la fitosanidad alimentaria por lo que la sugerencia de empleabilidad puede resultar en una opción viable con características positivas en el ámbito alimentario, económico, social y medio ambiental.

16 Bibliografía

1. Martínez-Morales, A., Alia-Tejacal, I., & Colinas-León, M. T. (2006). refrigeración de frutos de zapote mamey [*Pouteria sapota* (jacq.) He Moore & Stearn] cosechados en diferentes fechas en tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(Especial_2), 51-51.
2. LA FAO, U. C. E. (1990). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
3. Hernández¹, H. F., Gracia¹, J. F., Fuentes, S. E. V., Rodríguez, A. P., Domínguez¹, A. A., & Monteon-Ojeda, A. (2021). Report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. in citrus trees in Tamaulipas. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas volume*, 12(3).
4. Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 54-74.
5. Ochoa-Ascencio, S., Vázquez, M., & Farías, R. (2007). Identificación genético molecular de hongos asociados a la pudrición peduncular del fruto de aguacate en Michoacán, México. In *Memorias X Congreso Internacional/XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Abs.*
6. CIAD, A. (2020). El mamey, deliciosa, fresca y nutritiva fruta tropical.
7. Paulín, K. V., Alvarado Sánchez, B., & Munguía, A. R. (2015). Historia del mamey *Pouteria sapota*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 1-9.
8. Del Puerto, T. S., & Suárez, E. D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Palacio. *Rev. Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52, 372–387.
9. Bakir, F., Rustam, H., Tikriti, S., Al-Damluji, S. F., & Shihristani, H. (1980). Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. *Postgraduate Medical Journal*, 56(651), 1-10.
10. Eddleston M., Karalliedde L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G.,

- Isbister G., Konradsen F., Murray D., Piola J.C., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S.B. y Smit L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world: A minimum pesticides list. *Lancet* 360, 1163-1167.
11. Royce, S., Wald, P., Sheppard, D., & Balmes, J. (1993). Occupational asthma in a pesticides manufacturing worker. *Chest*, 103(1), 295-296.
12. Tinoco, R., Tinoco, R., Parsonnet, J., & Halperin, D. (1993). Paraquat poisoning in southern Mexico: a report of 25 cases. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 48(2), 78-80.
13. Gutiérrez, S. J. J. (2013). Panorama histórico de morbilidad y mortalidad por intoxicación por plaguicidas en México 1995-2012. *Boletín Epidemiológico*, 33(30), 1-35.
14. Brechelt, A. (2004). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL). Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). RD.*
15. Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., & Åkerman, M. (2008). Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International journal of cancer*, 123(7), 1657-1663.
16. Ramírez Domínguez, K. (2006). *Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria* (Doctoral dissertation, Universidad Veracruzana. Instituto de Ciencias Básicas. Región Xalapa.).
17. Rodríguez-Rivera, V. M. y Simón-Magro, E. (2008) Bases de la Alimentación Humana. *Foro Europe de Editores, España*. Netbiblo. p. 215.
18. Ivic, D. (2010). Curative and eradivative effects of fungicides. *Fungicides*, 3-22.
19. Bhunia, A. K. (2018). *Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis*. Springer.
20. Cortés-Higareda, M., Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Landa-Salgado, P., & Hernández-López, M. (2021). Bacterias patógenas de los alimentos agrícolas frescos y mínimamente procesados. Estado actual en el control del género salmonella. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 22(1).

21. Lagunes, A. L., & Trigos, A. (2006). Hongos en los alimentos ¿Estamos realmente informados? *Ciencia y el Hombre*, 19(2), 41-42.
22. Trigos, Á., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista mexicana de micología*, 28(SPE), 125-129.
23. Nom, N. O. M. (1994). 113-SSA1-1994, Bienes y servicios. *Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*.
24. Europea, U. Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios. *Diario Oficial de la Unión Europea L*, 95(1), 7.
25. Manual, B. A. (1984). Food and Drugs Administration FDA. *Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, DC*.
26. Heidel, W. H., de Ingenieros, O., & Heidel, E. (2010). Normas del manejo integrado de plagas y enfermedades y del empleo de productos fitosanitarios en los países de la comunidad europea. In *Congreso Científico del INCA, XVII, San José de las Lajas, 22-26 nov. 2010*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
27. Flores Hernández, H., Flores Gracia, J., Varela Fuentes, S. E., Pérez Rodríguez, A., Azuara Domínguez, A., & Monteón-Ojeda, A. (2021). Reporte de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. en árboles cítricos de Tamaulipas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(3), 499-511.
28. Crous, P. W., & Palm, M. E. (1999). Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*-*Sydowia*, 52, 167-175.
29. Cardoso, J. E., Vidal, J. C., Santos, A. D., Freire, F. C. O., & Viana, F. M. P. (2002). First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *Plant Disease*, 86(5), 558-558.
30. Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.

31. Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W., Maki, C. S., Araújo, W. L., Dos Santos, D. R., & Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International journal of biological sciences*, 1(1), 24.
32. Mohali, S., Burgess, T. I., & Wingfield, M. J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*, 35(6), 385-396.
33. Rebell, G., & Forster, R. K. (1976). *Lasiodiplodia theobromae* as a cause of keratomycoses. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 14(2), 155–170.
34. Maslen, M. M., Collis, T., & Stuart, R. (1996). *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a subcutaneous abscess in a Cambodian immigrant to Australia. *Journal of medical and veterinary mycology*, 34(4), 279-283.
35. Summerbell, R. C., Kraiden, S., Levine, R., & Fuksa, M. (2004). Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. *Medical Mycology*, 42(6), 543-547.
36. Lutchmeah, R. S. (1988). *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of *Annona muricata* in Mauritius. *Plant Pathology*, 37.
37. Damm, U., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2007). *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99(5), 664-680.
38. Bautista-Baños, S., Díaz-Pérez, J. C., & Barrera-Necha, L. L. (2002). Postharvest fungal rots of sapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore & Stearn. *Postharvest Biology and Technology*, 24(2), 197-200.
39. Gómez-Jaimes, R., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, J. A., Martínez-Damián, M. T., & Vargas-Hernández, M. (2009). Evaluación de la calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore and Stearn. *Agrociencia*, 43(1), 37-48.
40. Tovar Pedraza, J. M., Mora Aguilera, J. A., Nava Díaz, C., Téliz Ortiz, D.,

- Villegas Monter, Á., & Leyva Mir, S. G. (2013). Control of Lasiodiplodia theobromae, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore and Stearn] grafts in México. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(3), 233-238.
41. Vasquez-Lopez, A., Mora-Aguilera, J. A., Cardenas-Soriano, E., & Teliz-Ortiz, D. (2009). Etiology and histopathology of dieback disease on mamey trees (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore and Stearn) in Guerrero, Mexico. *Agrociencia*, 43(7), 717-728.
42. Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1999). Brock Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada, Inc. pp. 149 – 177.
43. McMeekin, T. A. and Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78:133 – 153.
44. Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (1999). Microbiología 4ª Edición., McGraw-Hill. Interamericana. 114 – 136.
45. McGrath, M. T. (2004). *What are Fungicides. The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094. PHI-I-2004-0825-01.
46. Seguí, E. M. (2008). La fitopatología del siglo XXI. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (196), 37.
47. Morocho Quisay, A. J. (2023). *Sistema de fumigación para la aplicación de productos fitosanitarios sobre cultivos de tomate de carne utilizando conceptos de agricultura 4.0* (Bachelor's thesis, Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo).
48. Ivic, D. (2010). Curative and eradivative effects of fungicides. *Fungicides*, 3-22.
49. Rouabhi, R. (2010) Introduction and Toxicology of Fungicides. *Fungicides* (pp. 203-220).
50. Morell, I. (1998). Plaguicidas: Aspectos Ambientales, Analíticos y Tóxicos. *Organofosforados. España. Jaumet Univeritat. Pág, 287*.
51. Faro, L. R. F. (2010). Neurotoxic effects of triazole fungicides on nigrostriatal

- dopaminergic neurotransmission. *Fungicide*, 405-420.
52. da Cruz Cabral, L., Pinto, V. F., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology*, 166(1), 1-14.
53. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218.
54. Soković, M. D., Glamočlija, J. M., & Ćirić, A. D. (2013). Natural products from plants and fungi as fungicides. *Fungicides-showcases of integrated plant disease management from around the world*, 185-232.
55. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 20029.
56. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
57. Sarukhán, J. (1968). Manual para la identificación de campo de los principales arboles tropicales de México.
58. Schwentesius Rindermann, R., & Sangerman-Jarquín, D. M. (2014). Desempeño competitivo de la fruticultura mexicana, 1980-2011. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7), 1287-1300.
59. Diaz-Perez, J. C., Bautista, S., & Villanueva, R. (2000). Quality changes in sapote mamey fruit during ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology*, 18(1), 67-73.
60. Almeyda, N., & Martin, F. W. (1980). Cultivation of neglected tropical fruits with promise.
61. Domínguez, B., Martínez-Morales, A., & Alia-Tejacal, I. (2010). Caracterización de la maduración en ecotipos de zapote mamey (*Pouteria sapota*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11(2), 122-129.
62. Azurdia, C. (2006). *Tres especies de Zapote en América Tropical: (Pouteria campechiana, P. Sapota y P. viridis)* (Vol. 6). Crops for the Future.

63. Takeda, T., Gonda, R., & Hatano, K. (1997). Constitution of lucumin and its related glycosides from *Calocarpum sapota* Merrill. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 45(4), 697-699.
64. Cheryl, L., Harper, T., Georges, K., and Bridgewater, E. 2000. Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago. *Preventive Veterinary Medicine* 45: 201–220.
65. Delgado, Anay, Núñez, Olimpia, Aguilera-Valle, Lester, Palacio, Danays, Salas-Romero, Josmel, Bebert, Gisell, González, Misleidi, y Fernández, Noemí. (2016). Acción ovicida in vitro del extracto hidro-alcohólico crudo de la semilla de *Pouteria sapota* (mamey colorado) contra huevos de *Haemonchus contortus*. Primer reporte. *Revista de Producción Animal*, 28(2-3), 51-54
66. Beltran Lopez, A. G. (2017). Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales del extracto metanólico de la cáscara de mammea americana (L.)" mamey".
67. Pedroso, A. T. R., Arrebato, M. A. R., Baños, S. B., Triana, A. C., & González, D. R. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1), 91-96.
68. Ertürk, Ö., (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia* 61, pp. 275–278.
69. Rodríguez Palomares, C. (2013). *Fichero farmacológico*. McGraw Hill Mexico.
70. Pemán, J., Serrano, M. G., & Carrillo-Muñoz, A. J. (1999). Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Revista Española de Quimioterapia*, 12(3), 2.
71. Baky, M. H., Kamal, A. M., Elgindi, M. R., & Haggag, E. G. (2016). A review on phenolic compounds from family *Sapotaceae*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5(2), pp. 280-287.
72. Moo-Huchin, V., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L. F., & Sauri-Duch, E. (2013). Chemical composition of crude oil from the seeds of pumpkin (*Cucurbita spp.*) and mamey sapota (*Pouteria sapota Jacq.*) grown

- in Yucatan, Mexico. *CyTA-Journal of Food*, 11(4), 324-327.
73. Segura, S., Fresnedo, J., Mathuriau, C., López, J., Andrés, J., & Muratalla, A. (2018). The edible fruit species in Mexico. *Genetic resources and crop evolution*, 65(6), 1767-1793.
74. Zárate Martínez, W. (2018). Aplicación de ácidos fenólicos como inductores de tolerancia al estrés causado por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en plantas de tomate.
75. Masa, A., Vilanova, M., & Pomar, F. (2007). Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1164(1-2), 291-297.
76. Masa, A., & Zamuz, S. Papel de los compuestos fenólicos en la caracterización de las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) CULTIVADAS EN GALICIA. *Technology*, 230, 51.
77. Paxton, J. (1981). A new working definition of the term" phytoalexin".
78. Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y., & Chen, J. (2008). Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis Hort. ex Tanaka*) and Huyou (*Citrus paradisi Macf. Changshanhuoyou*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 382-389.
79. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
80. Alia T., I., Soto H., R. M., Colinas L., M. T. y Martínez D., M. T. (2005). Análisis preeliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore et Stearn). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11 (2): 225-231.
81. Alia T., I., Soto H., R. M., Colinas L., M. T. y Martínez D., M. T. (2005). Análisis preeliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore et Stearn). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11 (2): 225-231.
82. Kim, Y. S., Min, J. Y., Kang, B. K., Bach, N. V., Choi, W. B., Park, E. W., & Kim, H. T. (2007). Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of the

isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. *The Plant Pathology Journal*, 23(3), 187-192.

83. Rodríguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sánchez, E., Zamora-Bustillos, R., ... & Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de microbiología*, 47(1), 72-77.