

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE FRANCISCO I. MADERO



“Caracterización química de *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk y su actividad antifúngica en contra de *Botrytis cinerea* Pers. y *Colletotrichum* spp.”

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN DESARROLLO
AGROTECNOLÓGICO SUSTENTABLE**

PRESENTA:

EVELYN NATALY ZAMORA GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. NADIA LANDERO VALENZUELA

Municipio de Francisco I. Madero, Hgo. Septiembre 2021.



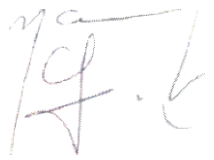
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE FRANCISCO I.
MADERO

“Caracterización química de *Decatropis bicolor*
(Zucc.) Radlk y su actividad antifúngica en contra
de *Botrytis cinerea* Pers. y *Colletotrichum* spp”

Para obtener el grado de Maestro En Ciencias En Desarrollo
Agrotecnológico Sustentable

COMITÉ EVALUADOR:

DRA. NADIA LANDERO VALENZUELA
DIRECTOR



FIRMA

DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ
CO-DIRECTOR



FIRMA

M.C SUSANA GRACIELA SANCHEZ HERRERA
ASESOR



FIRMA

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por haberme dado fortaleza y valor para asumir los retos que se presentaron.

Un agradecimiento muy especial a mi directora de tesis, la doctora Nadia, quien, con su paciencia, sabios consejos y dedicación pudimos lograr el objetivo. A la doctora Gaby le agradezco la oportunidad y todas las facilidades que me brindo para realizar una estancia en su laboratorio, en donde tuve la oportunidad de aprender cosas nuevas, conocer lugares y persona maravillosas. También le agradezco a la Maestra Susana por el apoyo y tiempo dedicado a este proyecto y a mi formación profesional. Infinitas gracias a las tres, su ayuda ha sido muy importante. No fue sencillo, sin embargo, siempre tuvieron las palabras correctas para mí.

A mi madre por brindarme su apoyo incondicional, por siempre alentarme a seguir adelante y a no rendirme. A usted le dedico mis logros y mi trabajo como muestra de mi eterna gratitud y admiración.

Hermana Sandy gracias por acompañarme siempre, aun en los momentos más complicados y ayudarme en cada cosa que se me ocurre.

Por ultimo y no menos importante a mi sobrino Zaid, por ser una motivación siempre.

RESUMEN

El aranto (*Decatropis bicolor*) es un arbusto que se encuentra distribuido en bosques mesófilos y tropicales perennifolios de México y Centroamérica, éste ha sido utilizado en la medicina tradicional mexicana. Esta planta contiene metabolitos secundarios con propiedades bactericidas y fungicidas, por lo que el uso de tecnologías a base de aranto puede prolongar el tiempo de vida de frutos frente a hongos fitopatógenos causantes de pérdidas postcosecha. Con el objetivo de contribuir a la caracterización química y la evaluación de su actividad antifúngica durante la interacción de *Botrytis-fresa* y *Colletotrichum-mango* en la presente investigación se estudió el efecto de concentraciones de *Decatropis bicolor* extraídos con diferentes solventes (metanol, etanol, éter de petróleo, agua y hexano) así mismo se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* sobre *Colletotrichum* spp. y *Botrytis cinerea*. Los resultados obtenidos muestran que el extracto etanólico y metanólico inhibieron en su totalidad el desarrollo del patógeno y su esporulación, mientras que el extracto acuoso tuvo un comportamiento similar al testigo. Para realizar pruebas *in situ* solo se tomaron los extractos que tuvieron mejores resultados *in vitro*, metanólico y etanólico. Para *Colletotrichum* hubo tendencia hacia valores más bajos en incidencia y severidad, comparados con el testigo que mostró los valores más altos. Sólidos solubles totales y pH mostraron un comportamiento similar al testigo. Con *Botrytis cinerea* solo el extracto metanólico mostró valores más bajos en la incidencia, pero en cuanto a la severidad, se comportó muy similar al testigo. Pero ambos extractos no afectaron la cantidad de sólidos totales solubles y pH., su comportamiento fue similar al testigo. Los resultados con electroforesis capilar (CE) mostraron que el extracto etanólico de aranto contiene principalmente los polifenoles Rutina (33.349 mg/100 g), Vainillina (5.55 mg/100 g), Acido Gálico (5.349 mg/100 g), Acido Ferúlico (30.7 mg/100 g) y Ácido Cumárico (0.63 mg/100 g).

Palabras clave: *Decatropis bicolor*, aranto, actividad antifúngica, *Botrytis*, *Colletotrichum* spp.

ABSTRACT

The aranto (*Decatropis bicolor*) is a shrub that is distributed in mesophilic and tropical ever green forests of Mexico and Central America, it has been used in traditional Mexican medicine. This plant contains secondary metabolites with bactericidal and fungicidal properties, so the use of aranto-based technologies can prolong the life time of fruits against phytopathogenic fungi that cause postharvest losses. In order to contribute to the chemical characterization and the evaluation of its antifungal activity during the interaction of *Botrytis*-strawberry and *Colletotrichum*-mango, in the present investigation, the effect of concentrations of *Decatropis bicolor* extracted with different solvents (methanol, ethanol, petroleum ether, water and hexane) likewise the antifungal activity was evaluated *in vitro* on *Colletotrichum* spp. and *Botrytis cinerea*. The results obtained show that the ethanolic and methanolic extract totally inhibited the development of the pathogen and its sporulation, while the aqueous extract had a similar behavior to the control. For *in situ* tests, only the extracts that had the best *in vitro*, methanolic and ethanolic results were taken. For *Colletotrichum* there was a trend towards lower values in incidence and severity, compared with the control that showed the highest values. Total soluble solids and pH showed a similar behavior to the control. With *Botrytis cinerea*, only the methanolic extract showed lower incidence values, but in terms of severity, it behaved very similar to the control. But both extracts did not affect the amount of total soluble solids and pH. Their behavior was similar to the control. The results with capillary electrophoresis (CE) showed that the ethanolic extract of aranto contains mainly the polyphenols Rutin (33,349 mg / 100 g), Vanillin (5.55 mg / 100 g), Gallic Acid (5,349 mg / 100 g), Ferulic Acid (30.7 mg / 100 g) and Cumaric Acid (0.63 mg / 100 g).

Key words: *Decatropis bicolor*, aranto, antifungal activity, *Botrytis*, *Colletotrichum* spp.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 General	5
2.2 Específicos	5
3. HIPÓTESIS	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1 <i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.....	6
4.1.1 Usos	6
4.1.2 Composición química	7
4.2 Producción de Mango (<i>Mangifera indica</i> L.).....	7
4.2.1 Postcosecha	7
4.2.2 Enfermedades	8
4.3 Producción de fresa (<i>Fragaria</i> L.).....	8
4.3.1 Postcosecha	9
4.3.2 Enfermedades	9
4.4 <i>Colletotrichum</i> spp.....	10
4.5 <i>Botrytis cinerea</i>	11
4.6 Extractos vegetales.....	12
4.7 Métodos de Extracción	13
4.7.1 Sólido-líquido	13
4.7.2 Ultrasonido.....	13
4.7.3 Electroforesis	14
4.8 Metabolitos secundarios con actividades antimicrobiales.....	15

4.8.1 Polifenoles.....	15
4.8.2 Rutina	15
4.8.3 Ácido Ferúlico	16
4.8.4 Vainillina	16
4.8.5 Ácido Gálico	17
4.8.6 Ácido P-Cumárico	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Ubicación de la investigación	19
5.2 Colecta del material vegetal.....	19
5.3 Microorganismos, aislamiento y reproducción.....	20
5.4 Preparación de extractos	20
5.5 Determinación de polifenoles mediante Electroforesis capilar	22
5.6 Bioensayo <i>in vitro</i>	23
5.7 Variables	24
5.7.1 Crecimiento micelial	24
5.7.2 Esporulación.....	24
5.8 Bioensayo <i>in situ</i>	25
5.9 Variables	26
5.9.1 Incidencia	26
5.9.2 Severidad.....	27
5.9.3 Sólidos solubles totales	27
5.9.4 pH	28
5.10 Análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1 Identificación de polifenoles	29
6.1.1 Estándares	31

6.1.2 Identificación de compuestos presentes en el extracto metanólico	35
6.2 Ensayos in vitro <i>Colletotrichum spp</i>	36
6.2.1 Crecimiento micelial	36
6.2.2 Esporulación	40
6.3 Ensayos in vitro con <i>Botrytis cinerea</i>	41
6.3.1 Crecimiento micelial	41
6.3.2 Esporulación	45
6.4 Efecto Antifúngico <i>in situ</i> sobre <i>Colletotrichum spp</i>	46
6.4.1 Incidencia	46
6.4.2 Severidad	47
6.4.3 Sólidos solubles totales	48
6.4.4 Acidez activa-pH	49
6.5 Efecto Antifúngico <i>in situ</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i>	50
6.5.1 Incidencia	50
6.5.2 Severidad	51
6.5.3 Sólidos solubles totales	52
6.5.4 Acidez activa-pH	53
6. CONCLUSIONES	55
7. LITERATURA CITADA	56

ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Descripción de métodos para obtención de extractos de aranto (<i>D. bicolor</i>)	21
Cuadro 2. Tratamientos con extractos de aranto evaluados in vitro para el control de <i>Colletotrichum</i> spp y <i>Botrytis cinérea</i>	23
Cuadro 3. Tratamientos con extractos de aranto evaluados in situ en contra de <i>Colletotrichum</i> spp y <i>Botrytis cinerea</i>	25
Cuadro 4. Compuestos identificados en extracto de aranto	31
Cuadro 5. Cuantificación de los polifenoles en el extracto metanólico.....	35
Cuadro 6. Medias de crecimiento micelial in vitro de <i>Colletotrichum</i> spp bajo diferentes tratamientos a base de <i>D. bicolor</i>	38
Cuadro 7. Medias de crecimiento micelial in vitro de <i>Botrytis cinerea</i> bajo diferentes tratamientos a base de <i>D. bicolor</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 <i>Decatropis bicolor</i>	6
Figura 2. Estructura de la Rutina	16
Figura 3. Estructura de Ac. Ferúlico	16
Figura 4. Estructura de Vainillina.....	17
Figura 5. Estructura del ácido Gálico	18
Figura 6. Estructura del Ácido p-cumárico	18
Figura 7. Ubicación geográfica de recolección.....	19
Figura 8. Frutas desinfectadas.....	26
Figura 9. Frutas inoculadas.....	26
Figura 10. Refractómetro.	28
Figura 11. Medidor de pH digital.	28
Figura 12. Electroferograma de extracto de <i>D. bicolor</i> utilizando etanol y metanol.....	30
Figura 14. Mezcla de los estándares puros.....	32
Figura 15. Electroferograma comparando el estándar de ácido gálico y el extracto metanólico.....	33
Figura 16. Electroferograma comparando el estándar de Rutina y el extracto metanólico.....	33
Figura 17. Electroferograma comparando el estándar de ácido ferúlico y el extracto metanólico.....	34
Figura 18. Electroferograma comparando el estándar de Ácido Cumárico y el extracto metanólico.....	34
Figura 19. Electroferograma comparando el estándar de Vainillina y el extracto metanólico.....	35
Figura 23. Crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> bajo diferentes tratamientos a base de extractos de <i>D. bicolor</i>	42
Figura 24. Crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> bajo diferentes tratamientos a base de extractos de <i>D. bicolor</i> in vitro.	43
Figura 25. Esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> bajo diferentes tratamientos in vitro a base de extractos de <i>D. bicolor</i> a los nueve días de evaluación.	45

Figura 31. Severidad de Botrytis en frutos de fresa tratados con extractos de D. bicolor in situ.	52
Figura 32. Sólidos solubles totales encontrados en fresa bajo tratamientos a base de extractos de D. bicolor.....	53
Figura 33. Valores de pH obtenidos de los frutos de fresa con los tratamientos a base del extracto de D. bicolor.....	54

1. INTRODUCCIÓN

Desde años atrás, el control de las enfermedades fúngicas ha dependido, en gran medida de los tratamientos con agroquímicos; sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medioambiente (Abdel-Monahim *et al.*, 2011). El llevar a cabo esta práctica ha contribuido a la resistencia de microorganismos y conforme avanza el tiempo ya no será funcional lo utilizado actualmente. Por tal motivo, son necesarias nuevas alternativas que no sean tóxicas y que ayuden al control de los microorganismos. Existen estudios que hablan de la actividad que tienen algunos metabolitos encontrados en plantas que pueden ayudar al control de plagas y enfermedades.

Se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa. El proceso para obtener metabolitos secundarios de los extractos vegetales es variable; se pueden obtener extractos acuosos o polvos o utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad (Hernández, 2007). Si se considera que la mayoría de los compuestos obtenidos de las plantas son biodegradables e inoocuos, y que en México se encuentra aproximadamente 10 % de las especies de las plantas superiores del mundo y más del 50 % de ellas son endémicas (CONABIO 2006), resulta conveniente explorar el potencial de empleo de sus extractos vegetales.

Existen reportes de la evaluación de diversos extractos vegetales con actividad sobre algunos microorganismos fitopatógenos. Este es el caso del aranto (*Decatropis bicolor*) especie que se encuentra distribuida en bosques mesófilos y tropicales perennifolios de México y Centroamérica.

En México se encuentra distribuido en los estados de Chiapas, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Estanislao *et al.*, 2016). Es un árbol silvestre que crece libremente en los campos, pero muchas personas dedicadas a tratar enfermedades aducen tener propiedades anticancerígenas (Bermúdez *et al.*, 2005) debido a que esta planta posee metabolitos secundarios con actividad antioxidante (Liu, 2004).

Actualmente se conoce que el cáncer es una anomalía genética en el ámbito celular, que implica la mutación de un pequeño número de genes que actúan normalmente

suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y la pérdida o inactivación de estos genes, da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores. Los factores ambientales y los virus juegan también un papel importante en las alteraciones genéticas que son necesarias para transformar células normales en cancerosas (Klug *et al.*, 1999).

Cirugía, quimioterapias y radiaciones es lo que se usa en la medicina para tratar apacientes con cáncer (Stehman *et al.*, 2003); en la medicina tradicional es común el uso de plantas para curar este padecimiento, práctica que ha sido empleada desde la antigüedad hasta hoy en día (Sumner, 2001).

Respecto a el mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los frutos de mayor importancia a nivel mundial, ya que ocupa el quinto lugar dentro de los principales productos frutícolas (Pérez, 2003). Son frutos tropicales conocidos por sus características de sabor y aroma agradables. Pertenece a la familia de las anacardiáceas y es originario de la India.

Este fruto es reconocido en la actualidad como uno de los frutos tropicales más finos del mundo, capaz de cultivarse con éxito en regiones subtropicales, por ello es de gran importancia en la economía del país donde se cultiva (Galán, 2000). Uno de los principales problemas fitosanitarios de esta especie es ocasionado por la enfermedad llamada antracnosis, causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y algunas especies pertenecientes a los géneros *Glomerella*, *Gloesporium*, *Gnomonia*, *Marssonina*, *Mycosphaerella*, *Neofabrae* y *Pseudopeziza*. Esta enfermedad ataca las flores, frutos, hojas, y ramas más jóvenes. La presencia de la antracnosis es favorecida por humedades relativas entre 85 y 97 % durante la época de floración (Aparicio, 1998; Gómez, 2001).

La infección de frutos puede causar caída prematura; sin embargo, las pérdidas más importantes se presentan en la fase de maduración de los frutos (Arauz, 2000), en los cuales se desarrollan lesiones irregulares de color café oscuro a negro. Las lesiones se pueden formar en cualquier parte del fruto; inicialmente son superficiales y sólo penetran hasta la pulpa cuando las lesiones se encuentran cubriendo gran parte de la superficie del fruto. Los frutos tiernos infectados mantienen la enfermedad en un estado de latencia. Los daños de antracnosis son más visibles cuando los frutos inician su madurez fisiológica. La enfermedad afecta la calidad y reduce sus posibilidades de comercialización (Allende *et al.*, 2001).

El cultivo de fresa (*Fragaria* spp.) también es de gran importancia económica durante su producción se ve afectado por numerosas enfermedades, entre ellas la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*). Aún en los últimos años en el que se han realizado grandes adelantos en el desarrollo de la tecnología, se siguen presentando grandes pérdidas en postcosecha en todo el mundo, siendo difícil su cuantificación; se calcula que pueden alcanzar, dependiendo del país, hasta un 50 % de la producción, jugando un papel muy importante los daños causados por microorganismos (Guédez, 2009).

La manifestación del moho gris varía dependiendo de la parte de la planta infectada y del estado fisiológico de ese tejido. Las hojas nuevas, recientemente expandidas, se infectan sin mostrar síntomas debido a que el hongo permanece inactivo (latente) en estos tejidos. Cuando las hojas infectadas maduran, al iniciar la senescencia, el hongo puede activarse y producir una cubierta aterciopelada gris en las partes muertas de la hoja. Una vez que estas frutas comienzan a expandirse, el patógeno se vuelve activo y causa una pudrición dura, de color café en el extremo de la fruta donde se ubica el cáliz y también una pudrición dura similar en las etapas de fruta blanca, rosad y roja. La fruta madura es especialmente susceptible a las infecciones de *Botrytis* (Fernández, *et al.*, 2014)

Para reducir estas pérdidas en fresa, es necesario entender los factores biológicos y de medioambiente relacionados con su deterioro y el uso de tecnologías postcosecha que retrasen la senescencia y mantengan la calidad del producto lo mejor posible.

Durante mucho tiempo se han utilizado fungicidas sintéticos para controlar patógenos postcosecha; pero, en diversos estudios se ha demostrado que estos compuestos han causado resistencia en microorganismos, incluyendo a los hongos que representan un potencial riesgo para la seguridad del medio ambiente y la salud humana.

El daño que puede producir un agroquímico depende de la naturaleza del producto, de la cantidad que ingresa al organismo (dosis), de la vía de ingreso (piel, ingestión, respiratoria y parental) y de las características personales del individuo afectado (sexo, edad, eso, estado de salud, etc.). Los riesgos principales ligados a la salud humana de la exposición crónica a bajas dosis se relacionan con la aparición de cáncer, defectos de nacimiento, afectaciones del sistema nervioso y del funcionamiento del sistema endocrino (Bofelli *et al.*, 1991).

Para el control de patógenos, se ha implementado el uso de agroquímicos como bromuro de metilo, metan sodio y metan potasio (Nuez, 1995), debido a su amplio espectro contra patógenos del suelo, sin embargo, estos productos generan problemas ambientales; dañan la capa de ozono, deterioran la flora microbiana y eliminan los microorganismos benéficos del suelo. Es por ello que los países desarrollados demandan el uso de productos que promuevan una agricultura sustentable, por lo que es necesario buscar nuevas estrategias para el control de enfermedades (Lira *et al.*, 2007).

Como una alternativa al control químico de las enfermedades de las plantas se ha implementado el uso del control biológico y como parte de esta estrategia se ha usado diferentes microorganismos antagonistas a los fitopatógenos que provocan enfermedades, dentro de ellas las de origen del suelo.

Los microorganismos antagonistas han demostrado resultados positivos además de gran interés en los últimos años (Leroux, 2003). Dentro de los agentes antagonistas que se reportan como efectivos, se encuentran varias especies del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Streptomyces* (Jaimes *et al.*, 2008). Sin embargo, en algunos casos su control no es total, y por ello se están alternando con otros métodos de control tales como los extractos de algunas plantas para el control de pudriciones postcosecha (Lira, 2017).

Mitscher *et al.*, (1972) y Mitscher (1975) fueron los primeros autores que iniciaron los programas de tamizaje de plantas para evaluar su actividad antibacteriana. La metodología principal consiste en exponer cultivos de bacterias a diferentes concentraciones de extractos vegetales y determinar la inhibición del crecimiento bacteriano. Considerando la importancia de los extractos vegetales como alternativa para el control de hongos fitopatógenos y que la mayor información reportada sobre aranto es sobre salud humana y no en las interacciones de la parte agronómica, en la presente investigación se tiene como finalidad evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Decatropis bicolor* (etanólico, metanólico, éter de petróleo, hexano y acuoso), así mismo la evaluación *in vitro* de los extractos sobre los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum spp* para posteriormente evaluar su actividad *in situ*.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Analizar la composición química de *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk en el Valle del Mezquital, Hidalgo y evaluar el efecto antifúngico de los extractos obtenidos con diferentes solventes, sobre el desarrollo *in vitro* e *in situ* de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum* spp aislados de fresa y mango respectivamente.

2.2 Específicos

- Determinar la composición química de aranto (*Decatropis bicolor*) silvestre bajo las condiciones edafoclimáticas del Valle del Mezquital, Hidalgo.
- Evaluar la actividad antifúngica del extracto de aranto (*Decatropis bicolor*) sobre los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum* spp *in vitro*.
- Evaluar la actividad antifúngica del extracto de aranto (*Decatropis bicolor*) sobre los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum* spp *in situ*.

3. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos de aranto (*Decatropis bicolor*) extraídos con solventes (etanol, metanol, éter de petróleo, hexano y agua), mostrará un efecto antifúngico sobre hongos fitopatógenos de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum* spp.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk

Decatropis bicolor es una planta conocida como aranto, Doradilla, Hoja dorada (Figura 1), pertenece al género Rutaceae, la cual comprende 161 géneros y 1813 especies alrededor del mundo (Estanislao *et al.*, 2016). Es un arbusto que mide entre 2 y 7 metros de altura (García *et al.*, 2000), posee pequeñas flores blancas agrupadas en largas panículas terminales, compuestas por 5 a 10 folíolos elípticos a lanceolados, verdes en la parte superior y café-amarillentos en la inferior, corola dialipétala, androceo de 10 estambres o más: ovario pentalocular y fruto capsular, de 3 a 5 carpelos, florece de febrero a abril (Villavicencio y Pérez, 2002).



Figura 1 *Decatropis bicolor*

4.1.1 Usos

D. bicolor, es utilizada para tratar las infecciones bacterianas, se emplea en general para cualquier dolencia como dolor de espalda, dolor de cabeza, resfriado, cálculos en vesícula, diarreas, afecciones renales y cáncer. En algunas comunidades del municipio de Cardonal, las hojas, son utilizadas para preparar infusiones como tratamiento del cáncer de seno (Estanislao *et al.*, 2016).

4.1.2 Composición química

Algunos estudios realizados con hoja dorada, han demostrado la presencia de esteroides, cumarinas (Cárdenas *et al.*, 2005), flavonoides y triterpenos (Cortes, 2005). El primer análisis reportado con *Decatropis bicolor*, confirma la presencia de cumarinas, un compuesto que con frecuencia es aislado de la familia Rutaceae (Domínguez *et al.*, 1971).

En extractos orgánicos de diclorometano y metanol se identificaron las cumarinas felopterina, isopimpinelinam, heraclenin, seselina, psoralen impertor y heraclenol, así como al triterpeno lupeol. La evaluación *in vitro* de dichos compuestos permitió establecer que la seselina y heraclenol son los principales responsables del efecto antiinflamatorio de dicha planta (García *et al.*, 2000).

4.2 Producción de Mango (*Mangifera indica* L)

El mango se reconoce como uno de los frutos tropicales más finos del mundo; su cultivo data desde hace más de 6 000 años, y por ello se considera uno de los cultivos frutícolas más antiguos (Mukerge y Litz, 2009). La preferencia en su consumo se debe a sus atributos sensoriales como olor, sabor y sus propiedades (Mercado, 2012).

El mango es uno de los frutos tropicales mejor conocidos por sus excelentes características de sabor y aroma agradables. Pertenece a la familia de las anacardiáceas y es originario de la India. Este cultivo es reconocido en la actualidad como uno de los frutos tropicales más finos del mundo, es capaz de cultivarse con éxito en regiones subtropicales, por ello es de gran importancia en la economía del país donde se cultiva (Galán, 2000).

4.2.1 Postcosecha

El mango Manila es considerado como un producto subutilizado debido a que, no se tiene una comercialización adecuada, así como por diversas causas que disminuyen la calidad pre y postcosecha, entre las que se encuentran: los daños ocasionados por insectos y microorganismos, los malos sistemas de manejo postcosecha para la selección del producto y los deficientes sistemas para la operación de procesos que prolonguen la vida del fruto.

La importancia económica del cultivo de mango Manila en México está marcada en gran parte por la estacionalidad a la que está restringida la cosecha del fruto, que abarca el periodo de abril a julio, lapso de tiempo que limita la comercialización, ya que los productores de la región central del estado de Veracruz no cuentan con fruto para competir los ocho meses restantes del año (Añez *et al.*, 2004).

4.2.2 Enfermedades

Uno de los principales problemas fitosanitarios en el fruto de mango es ocasionado por la enfermedad llamada antracnosis, causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y algunas especies pertenecientes a los géneros *Glomerella*, *Gloesporium*, *Gnomonia*, *Marssonina*, *Mycosphaerella*, *Neofabrae* y *Pseudopeziza*. Esta enfermedad ataca las flores, frutos, hojas, y ramas más jóvenes. La presencia de la antracnosis se ve favorecida por humedades relativas de 85 a 97 % durante la época de floración (Aparicio, 1998; Gómez, 2001).

4.3 Producción de fresa (*Fragaria L.*)

El cultivo de la fresa en México ha formado parte de la tradición agrícola por más de 40 años en ciudades como Zamora, Michoacán, Irapuato y Guanajuato, pero sus niveles de producción y exportación han perdido terreno paulatinamente.

El cultivo de fresa ocupa solamente el 1% de la superficie dedicada a la agricultura, no obstante, ocupa un lugar importante en la producción de hortalizas, figurando entre los principales por la producción obtenida y por los volúmenes exportados. El cultivo es importante desde el punto de vista económico por las siguientes razones:

- ❖ Genera un gran número de empleos en la época de cosecha, y por las diversas actividades que se dan en las empacadoras.
- ❖ Se canalizan grandes inversiones para su producción, sobre todo si se considera que el cultivo de fresa es una de las actividades más costosas, pero también de las que más reeditúan.
- ❖ Es una fruta que tiene más de cuatro décadas abasteciendo al mercado estadounidense, este concepto de exportación genera divisas. Estos consumidores la demandan cada vez más como complemento de alimentos que se industrializan de manera fresca y congelada en aquella nación (SAGARPA, 2006).

4.3.1 Postcosecha

El género *Fragaria*, pertenece a la familia de las Rosáceas, se compone de ocho especies y es de distribución cosmopolita. Las fresas son plantas herbáceas perennes con estolones (brotes laterales) superficiales, que enraízan en los nudos, donde nacen unas rosetas de hoja trisectas (hojas que se componen de tres segmentos cada una) con largos peciolo (rabitos) y bordes dentados.

Es una planta fotoperiódica, es decir, que su crecimiento depende de las condiciones de temperatura y luz. Las altas temperaturas y los días largos (más de doce horas de luz) provocan crecimiento vegetativo excesivo; las bajas temperaturas y días cortos inducen floración.

La recolección es manual, debido a que la fruta es altamente perecedera, debe cosecharse cada tres días y manejarse con mucho cuidado. Se debe empezar a manejar la fresa desde antes de su formación y su desarrollo, para que llegue en buenas condiciones a la cosecha. A partir del momento de la cosecha, se inicia otro proceso de gran importancia, como es el de seleccionar la fruta, empacarla, transportarla y almacenarla adecuadamente. Una fruta fresca cosechada en plena maduración y mantenida a temperatura ambiente, se deteriora en un 80% en solo 8 horas.

La selección de la fruta se hace de acuerdo con el mercado al que se dirige, lo mismo que el empaque. Estas labores se inician en el momento de la cosecha, cuando se separan las frutas de acuerdo con la calidad y empacan en el mismo lugar (Caudillo, 2016).

4.3.2 Enfermedades

Dentro de las enfermedades que presenta la fresa, la más seria es la pudrición producida por *B. cinerea* (hongo gris). El desarrollo de esta enfermedad durante el manejo postcosecha, en la mayoría de las veces es el resultado de una infección precosecha, mientras que las infecciones postcosecha ocurren ocasionalmente cuando las frutas sanas se presionan contra la lesión de una fruta enferma (Sommer *et al.*, 1973).

Otras enfermedades postcosecha de fresa incluyen la pudrición por *Rhizopus* (causada por *Rhizopus* spp.) y la descomposición de la piel causada por *Phytophthora cactorum* (Takeda, 1991).

Los síntomas de la descomposición por *Botrytis cinerea* se manifiestan por lesiones secas y firmes de color café, cubiertas por esporas de color gris-café. Este hongo se puede diseminar durante el almacenamiento aún a bajas temperaturas.

La descomposición por *Rhizopus* puede causar pérdida de jugo y desarrollo de un moho blanco con esporas negras. El tejido afectado por *Phytophthora cactorum* llega a decolorarse, a suavizarse y puede perder jugo. Bajo condiciones de humedad se puede desarrollar un moho blanco (Rivera y Tong, 1998).

4.4 *Colletotrichum* spp

El género *Colletotrichum* se considera como el octavo grupo más importante de hongos patógenos de plantas en el mundo (Dean *et al.*, 2012). *C. gloeosporioides* es uno de los agentes fitopatógenos más comunes en frutos postcosecha y se distribuye ampliamente. Este hongo es el agente causal de la enfermedad denominada antracnosis, la cual afecta a frutos tropicales de importancia económica como aguacate, plátano, mango y papaya (Admasu *et al.*, 2014)

El hongo *C. gloeosporioides* pertenece a la superdivisión Deuteromycotera, clase-forma Coelomycete, orden Melanconiales y familia Melanconiaceae. Se caracteriza porque presenta las conidias hialinas, unicelulares, ovoides u oblongas, ubicadas en una estructura llamada acérvulo. Estos cuerpos son en forma de disco, cerosos, subepidermales y típicamente oscuros. Además de los conidióforos y conidios, presentan setas en el borde del acérvulo y entre los conidióforos (Páez, 2003).

La temperatura óptima de crecimiento y esporulación de *C. gloeosporioides* es de 26 °C-32 °C. Son extremadamente sensibles a la humedad relativa, requiriendo condiciones entre el 99 % y 100 % (Abang, *et al.*, 2003). Su ciclo de vida comprende un a fase sexual y asexual. En términos generales la sexual proporciona la variabilidad genética, y el estadio asexual es el responsable de la dispersión del hongo (Ki, *et al.*, 1998).

Los síntomas producidos por *Colletotrichum* en las plantas, son lesiones precisas de 2-20 mm de diámetro de estadios tempranos de la infección, en hojas jóvenes en la superficie adaxial y abaxial; algunas lesiones son café oscuras y otras negras; la infección se puede extender en toda la lámina y algunas veces se limita a las venas. Las lesiones grandes pueden necrosar el tejido (Abang *et al.*, 2003). En la interacción paracito hospedero durante la iniciación del estadio temprano, se incluye la germinación de las esporas, la formación del apresorio, penetración y colonización (Chung, 1999). En *Colletotrichum* la penetración al tejido del hospedero implica la

formación de una estructura de infección especializada llamada apresorio (Guarro *et al.*, 1998). El apresorio corresponde a una estructura plana, como un bulbo, que se forma cuando la hifa establece el contacto con la superficie e incrementa su diámetro, aumentando la zona de unión entre los dos organismos, lo cual permite que el patógeno se una con mayor firmeza a la planta (Cano, *et al.*, 2004). El apresorio penetra al tejido del hospedero y a la pared celular de la epidermis de manera directa. Algunas especies de *Colletotrichum* hacen penetración indirecta en los tejidos a través de las estomas (Guarro *et al.*, 1998).

4.5 *Botrytis cinerea*

Es un agente causal de la podredumbre gris que puede atacar un cultivo en cualquier estado de desarrollo y puede infectar cualquier parte de la planta (Plascencia, *et al.*, 2012). Después de la cosecha, los frutos suelen presentar daños más severos debido a que *B. cinerea* es más destructiva en esta etapa, por lo que frutos aparentemente sanos presentan síntomas de pudrición en las cadenas de distribución y comercialización (Dean *et al.*, 2012).

B. cinerea es uno de los hongos patógenos más comunes, ya que tiene la capacidad de infectar más de 200 distintas plantas huéspedes. Además de ser un patógeno agresivo, *B. cinerea* es un organismo versátil, capaz de crecer y reproducirse en tejidos dañados, senescentes y muertos de las frutas, vegetales y otras plantas.

B. cinerea se reproduce principalmente por medio de esporas asexuales, o conidios. Las masas de conidios grises se extienden fácilmente por el aire, por salpicaduras de agua, y por actividad física/ mecánica. Bajo magnificación se aprecia el distintivo “botryse” (nombre derivado del griego para “racimo de uvas”, la palabra raíz del nombre “*Botrytis*”), que se refiere a los racimos de esporas. Como muchos otros hongos tienen una segunda fase sexual nombrada *Botrytinia fuckeliana* que consiste en una estructura pequeña en forma de champiñón (apotecio) que contiene un tipo de spora (ascospora). *B. cinerea* puede producir una estructura invernal, es esclerocio, que es una estructura dura, negra, de forma oblonga a esférica, de hasta ½ pulgada de largo (Steven y Bolda, 2016).

B. cinerea es un hongo necrotrofo capaz de infectar a más de 200 especies en una gran variedad de órganos, incluyendo hojas, frutos y flores (Fernández-Acero *et al.*, 2011). El hongo causa la enfermedad del moho gris, que causa numerosas pérdidas en los cultivos en condiciones diversas, ya sea en campo abierto, en invernadero o en almacenamiento refrigerado a 0-10 °C (Williamson *et al.*, 2007).

B. cinerea presenta el ciclo de vida típico de un hongo necrógrafo en el que se pueden distinguir varias fases en función de estados. Los conidios de *B. cinerea* pueden ser transportados a largas distancias a través del aire (Jarvis, 1977). El ciclo comienza cuando el conidio entra en contacto con la superficie de un hospedador susceptible. Se cree que la adhesión al huésped es medida por interacciones de naturaleza física entre la cutícula del hospedador y el patógeno. Se distingue en dos etapas. En la primera el conidio se hidrata, dando como resultado la aparición de fuerzas débiles de adhesión debidas a la interacción hidrofóbicas de la cutícula del huésped y la superficie del conidio. En la segunda etapa se producen las uniones fuertes, unas horas después de la germinación del conidio (Doss *et al.*, 1993). Numerosos factores influyen en la germinación del conidio. El agua libre en la superficie del huésped o una alta humedad ambiental (> 93 %) son esenciales para la germinación y penetración de la epidermis del hospedero (Williamson *et al.*, 1995).

4.6 Extractos vegetales

Los extractos de origen vegetal se caracterizan por la presencia de determinados metabolitos secundarios, los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas, y que pueden ser agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antialimentarios, antivirales, antimicrobianos, repelentes, inhibidores de germinación de semillas, que permiten su utilización para proteger a los cultivos e incrementar la calidad y su producción alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Philogene, *et al.*, 2004).

Los extractos vegetales dentro de su estructura contienen compuestos conocidos comúnmente como alcaloides, las cuales actúan como agentes, insecticidas, repelentes, afectando principalmente el sistema nervioso de los insectos (Ajiquichí, 2013).

Las plantas han desempeñado un papel fundamental en la vida del hombre, quien las ha utilizado para suplir necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda y vestido, incluso en actos rituales. El uso de las plantas es una práctica que existe desde los inicios de la especie humana. La etnobotánica es la ciencia que investiga la relación entre las plantas y la cultura humana en diferentes ambientes, la cual surge como un instrumento para rescatar tradiciones milenarias sobre los diversos usos que el hombre le ha dado a estas y como alternativa de dar valor agregado a los recursos vegetales (Celis, 2008).

4.7 Métodos de Extracción

La extracción es el primer paso para el aislamiento de compuestos bioactivos a partir de material vegetativo. El objetivo de ello es obtener la máxima concentración de compuestos y la mayor actividad de los extractos (Spigno, 2007). Algunos métodos se describen a continuación:

4.7.1 Sólido-líquido

Se extraen uno o varios compuestos solubles de un sólido mediante el contacto de este con un solvente líquido selectivo. Esta es una técnica muy utilizada en la separación de compuestos a partir de residuos sólidos, los cuales requieren ser extraídos con disolventes convencionales y posteriormente eliminar el disolvente para obtener un extracto concentrado. Los disolventes más utilizados son: hexano, agua, etanol y metanol (Conde, 2009).

La extracción convencional se realiza cuando el solvente está a una temperatura cercana a su punto de ebullición. Es muy usada para extraer sustancias inorgánicas, solubles, de minerales sólidos. En la industria farmacéutica, este tipo de extracción es muy usada para obtener compuestos con actividad las enraíces y hojas de las plantas (Patiño, 2000).

4.7.2 Ultrasonido

Es una técnica ampliamente extendida, que se ha usado recientemente para la extracción de compuestos antioxidantes en manzanas, uvas, moras, semillas de chía, chícharo, mango (Aybastier, 2013). Se basa en el fenómeno de la cavitación dado por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido. El tiempo de vida de la burbuja se produce en microsegundos, su impulsión violenta genera, de manera localizada y transitoria, elevadas temperaturas (500 °C) en el interior de la burbuja, presiones (100 MPa) y la formación de especies muy reactivas tales como los radicales hidroxilos (OH) hidroxiperóxido (OOH) y el peróxido de hidrogeno (H₂O₂).

La extracción asistida por ultrasonido utiliza ondas de una frecuencia determinada que facilita la extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Vinatoru, 2001; Rodríguez, 2014).

4.7.3 Electroforesis

El termino Electroforesis es empleado para describir la migración de compuestos cargados bajo la influencia de un campo eléctrico y representa una de las técnicas clásicas de separación más utilizada en el área de la química, la cual se realiza generalmente en geles hidrofílicos como medio de soporte y continúa siendo de gran utilidad, sin embargo, este tipo de separación es lenta, laboriosa difícil de automatizar y en ciertos casos no proporciona resultados cuantitativos precisos. Lo anterior fue revolucionado con el uso de capilares de sílice fundida de solo unas cuantas micras de diámetro interno (Castillo *et al.*, 2005).

4.7.3.1 Electroforesis capilar (CE)

La CE es conocida así debido al empleo de capilares de diámetro interno pequeño, es una técnica de separación en la que las sustancias a analizar se separan en función de sus diferencias de movilidad (Rodríguez, 2010) cuando están bajo un campo eléctrico. Es una de las técnicas de separación más usadas en la actualidad, que se utiliza además para la identificación y cuantificación de compuestos (Cervantes, 2012), siendo su mayor área de impacto el análisis de biomoléculas, apoyando y ampliando su campo de aplicación como son: la industria farmacéutica, medicina, criminalística, industria alimentaria, así como en investigaciones bioquímicas (Castillo, *et al.*, 2005).

4.7.3.2 Electroforesis Capilar de Zona

Es uno de los métodos de la Electroforesis Capilar más ampliamente usados debido a la simplicidad de su operación y a su gran versatilidad, el capilar “generalmente de sílice fundida y recubiertos con una capa de poliimida” se caracteriza por su: flexibilidad, alta conductividad y transparencia espectral en el UV-Vis.” (Castagnino, 2000), éste es llenado solo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades, por lo que llegan al detector a diferentes tiempos. La separación de mezclas con analitos aniónicos y catiónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (EOF). Donde los analitos neutros no migran por sí solos, pero coeluyen en presencia del EOF (Castillo, *et al.*, 2005).

4.8 Metabolitos secundarios con actividades antimicrobiales

4.8.1 Polifenoles

Los polifenoles o compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente en forma de subproductos generados por el metabolismo, apareciendo como metabolitos secundarios en todas las plantas.

Químicamente, los fenoles son compuestos que poseen en su estructura al menos un anillo aromático sustituido con uno o más grupos hidroxilo, que en la naturaleza derivan de las rutas biosintéticas del ácido shikímico (fenilpropanos y sus derivados) y la del acetato-malonato (fenoles simples y quinonas) y la combinación de ambas rutas de lugar a formación de flavonoides (Martínez, 2015)

4.8.2 Rutina

Su nombre proviene de *Ruta graveolens* (ruda), una planta que también contiene rutina (Figura 2). A veces se le conoce como vitamina P, pero no es estrictamente una vitamina. Se utilizan para el tratamiento de diversas condiciones relacionadas con el sangrado capilar y el aumento de la fragilidad capilar y la permeabilidad.

1,5 Rutin es el ramnoglucósido de la quercetina flavonoide, se encuentra en muchas plantas y se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con el sistema vascular.

Es quercetina-3-rutinósido o 3,3',4', 5,7-pentahydroxy flavones-3-rutinoside, y tiene una fórmula química $C_{27}H_{30}O_{16}$. Las principales fuentes comerciales de rutina incluyen *Saphora japonica*, *Eucalyptus* spp., *Fagopyrum esculatum* y *Ruta graveolens* (Hamad, et al., 2012).

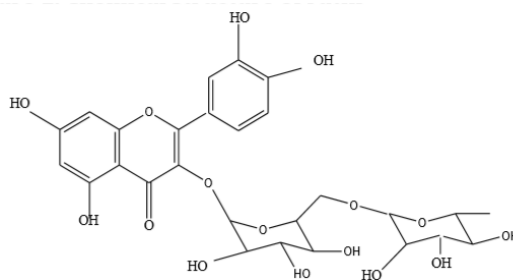


Figura 2. Estructura de la Rutina

4.8.3 Ácido Ferúlico

El ácido ferúlico (Figura 3) es un ácido fenólico ampliamente extendido en el reino vegetal y uno de los más abundantes en las plantas, se encuentra escasamente en su forma libre, sin embargo, habitualmente se encuentra ligado mediante enlaces éster a polisacáridos, pectinas, proteínas y xyloglucanos. Su liberación depende principalmente de la ruptura de este enlace éster con otros elementos constitutivos de la pared celular (López, *et al.*, 2011).

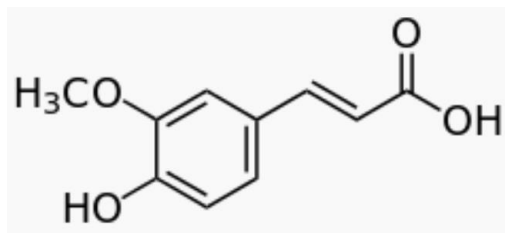


Figura 3. Estructura de Ac. Ferúlico

4.8.4 Vainillina

La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es uno de los compuestos más empleados a nivel mundial como aromatizante y saborizante. A pesar de que anualmente se producen más de 12 000 toneladas de este producto, solo el 1 % se obtiene de su fuente natural. En la actualidad, la producción por esta vía no satisface la demanda mundial por lo que se explotan mayormente las vías biotecnológicas como la síntesis microbiana a partir de estilbenos, lignina, eugenol y ácido ferúlico.

La estructura y la polaridad del grupo carbonilo (Figura 4), determinan las propiedades químicas de este tipo de compuestos. Este grupo proporciona un sitio para la interacción de agentes nucleofílicos por el carbono y de agentes electrofílicos por el oxígeno.

Las principales reacciones químicas en las que participa la vainillina son: la oxidación, la reacción de Cannizaro (auto-oxidación), la adición de alcohol en medio ácido, la reducción a alcohol, la condensación benzoínica, la hidrólisis y la adición de derivados de amonio (Trapero, 2013).

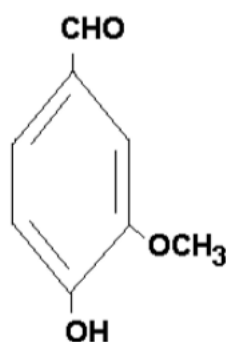


Figura 4. Estructura de Vainillina

4.8.5 Ácido Gálico

El ácido gálico (AG), también conocido como ácido 3, 4 ,5-trihidroxibenzoico (Figura 5), es un ácido fenólico presente en diversas especies vegetales como, *Larrea tridentata* (gobernadora) y *Turnera diffusa* (damiana); en algunos frutos como, uva, granada, nueces, plátano, fresa, limón, arándano, cáscara de manzana y mango; en hortalizas tales como acelgas y espinacas y en algunas bebidas como, café, vino tinto y té verde.

Este ácido se obtiene directamente del alimento o por hidrólisis del ácido tánico mediante una reacción con la enzima tanasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces tipo éster presentes en los galotaninos. Así mismo, se le atribuyen varios efectos biológicos, que van desde la actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena (Govea, 2013).

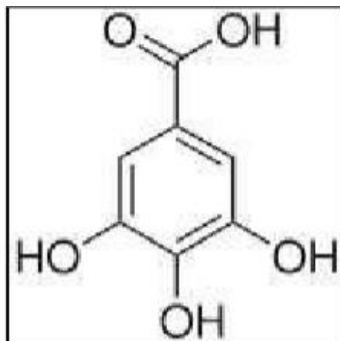


Figura 5. Estructura del ácido Gálico

4.8.6 Ácido P-Cumárico

Es un ácido hidroxinámico, un compuesto orgánico que es un hidroxilo derivado del ácido cinámico (Figura 6). Se presenta como un sólido cristalino ligeramente soluble en agua, pero con mayor solubilidad en etanol y éter dietílico. El ácido p-cumárico se puede encontrar en una amplia variedad de plantas comestibles como el cacahuate, tomate, zanahoria y ajo. También se encuentra presente en el vino, el vinagre de vino y es un constituyente del polen de la miel (Quinde, *et al.*, 2006).

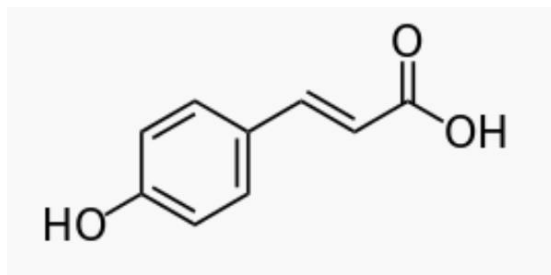


Figura 6. Estructura del Ácido p-cumárico

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología del área de Agrotecnología de la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Se encuentra ubicado en domicilio conocido s/n Tepatepec en el Municipio de Francisco I. Madero, Hidalgo, México. Longitud (dec): - 99.08882 y latitud (dec): 20.22365.

Los análisis fitoquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos en el departamento de química de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en Av. 1^o de mayo s/n, Santa María las Torres, Campo uno en Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Longitud (dec): -99.20753 y latitud (dec): 19.64132.

5.2 Colecta del material vegetal

D. bicolor fue recolectada en la comunidad de “El Mendoza” en el municipio de Francisco I. Madero en el estado de Hidalgo dentro del Valle del Mezquital. Ésta se encuentra a 4 kilómetros en dirección sur de la localidad de Tepatepec (Figura 7). La localidad se encuentra a una altitud de 2080 msnm, a una longitud (dec): -99.091111 y una latitud (dec): 20.281944.

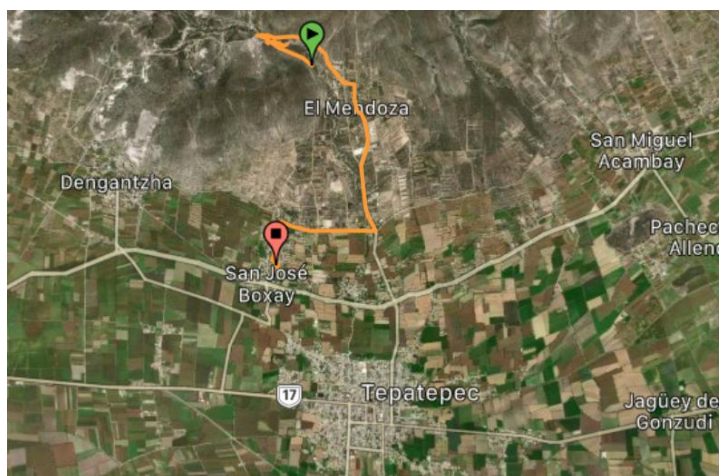


Figura 7. Ubicación geográfica de recolección

El clima que predomina es semiseco templado con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 14.8 °C, la máxima ocurre en mayo con 17.3 °C y la mínima en noviembre con 9.4 °C, la precipitación total anual es de 543.4 mm, la precipitación mínima ocurre en enero con 8.8 mm. Para el municipio de Tepatepec se describen los siguientes tipos de vegetación; bosque de encino que ocupa el 6.92 % de la superficie municipal en el cual alberga *Quercus laurina* (encino manzanillo) y *Quercus crassifolia* (hoja ancha), también cuenta con matorral *crasicaule* que ocupa el 30.13 % de la superficie municipal, así mismo se encuentran presentes *Flourensia resinosa*, *Juniperus* sp., *Yucca filifera* (palma) *Prosopis laevigata* (mezquite) y *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo) (INEGI, 1998).

Las hojas de *D. bicolor* se colectaron el 10 de noviembre de 2018, éstas se tomaron directamente de la parte media del arbusto. Las plantas presentaban una altura 120 a 150 cm de altura, se seleccionaron las ramas con la mayor abundancia en hojas.

En el laboratorio, éstas fueron separadas manualmente de los tallos y fueron secadas en un horno de aire forzado (SHELLAB®) a 40 °C durante 24 horas (Fito, *et al.*, 2016). Posteriormente las hojas fueron trituradas en un molino pulverizador, hasta obtener un polvo fino con un tamaño de partícula de 0.5 mm. El tejido molido se mantuvo en bolsas de polietileno, etiquetándolas y conservadas bajo condiciones de oscuridad en el laboratorio.

5.3 Microorganismos, aislamiento y reproducción

Para llevar a cabo la prueba microbiológica, se tomaron fragmentos de hongos de 5 x 5 mm, con 20 % de tejido infectado y 80 % de tejido sano, y se sembraron en 50 cajas de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y se mantuvieron en la incubaron a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 8 días.

Posterior a ello, una porción de micelio se transfirió a otra caja de Petri con PDA para obtener cepas axénicas. Cuando se confirmó morfológicamente la identidad de *Colletotrichum* spp (Sutton 1992) y *Botrytis cinerea* (Latorre, 2013) se obtuvieron las 2 cepas plurispóricas.

5.4 Preparación de extractos

Para obtener los extractos se aplicaron los siguientes dos métodos (Cuadro 1):

Cuadro 1. Descripción de métodos para obtención de extractos de aranto (*D. bicolor*)

Método	Descripción
Extracción Soxhlet con solvente Éter de Petróleo y Hexano	Se realizan las siguientes etapas: 1) Colocación del solvente en un balón. 2) Se pone a ebullición el solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo. 3) El solvente condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en polvo en su interior. 4) El nivel del solvente asciende hasta cubrir el cartucho en el punto en que se produce el reflujo y el solvente retorna al material extraído en el balón. 5) Se realiza este proceso la cantidad de veces necesaria hasta que la muestra quede agotada. Lo extraído se concentra en el balón del solvente (100 mL).
	1) Se coloca el material vegetativo en polvo en un frasco de vidrio, con agitación frecuente, durante 72 horas al menos. 2) Posteriormente se filtra, y se elimina la materia sólida. 3) El líquido obtenido se concentra en un rotavapor (HAHNSHIN®) a una temperatura de 60 °C. 4) Se obtienen 200 mL de muestra, los cuales se almacenan en frascos

oscuros y colocados en un lugar en oscuridad.

Extracción por Maceración para Agua, Metanol y Etanol.

5.5 Determinación de polifenoles mediante Electroforesis capilar

Para la identificación de los polifenoles presentes en los extractos, se utilizó un equipo de Electroforesis capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter Capillary Electrophoresis System (Fullerton, CA, USA) con un capilar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno, 54.6 cm de longitud total y 44.1cm de longitud efectiva.

La detención se realizó empleando un detector con arreglo de diodos (DAD) monitoreado a una longitud de onda de 200 nm y un voltaje aplicado de 28 kV. Inicialmente se hizo un lavado durante 2 min con NaOH 0.1M durante 10 min, después con agua desionizada durante 3 min y por último con buffer boratos 50 mM a un pH de 9.4 durante 10 min.

La separación se llevó a cabo con buffer de boratos 50 mM y agua desionizada que se empleó como disolvente, bajo las siguientes condiciones de enjuague: Buffer boratos 50 mM por 5min a 20 psi, inyección: muestra=extracto etílico por 5 segundos a 0.5 psi, separación: buffer boratos 50 mM por 30 minutos a 28 kV y finalmente un lavado como en el acondicionamiento. La identificación se llevó a cabo por la adición de estándares (al extracto antes medido y un aumento en su señal) y por la comparación de los espectros de absorción del pico sospechoso con su estándar.

Para realizar la determinación cuantitativa de los compuestos se prepararon y midieron las curvas de calibración correspondientes y se evaluaron los parámetros de coeficiente de determinación (r^2), límites de detección y cuantificación.

5.6 Bioensayo *in vitro*

Cien mililitros de medio de cultivo PDA líquido se mezclaron, antes de su solidificación, con cada una de las concentraciones de los extractos vegetales (Cuadro 2) y se vaciaron en cajas de Petri.

Posteriormente, se colocó en el centro de cada caja, un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de cada una de las cepas de *Colletotrichum spp* y *Botrytis cinerea*. Para cada uno de los tratamientos se realizaron 4 repeticiones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos con extractos de aranto evaluados *in vitro* para el control de *Colletotrichum spp* y *Botrytis cinérea*.

Tratamientos*	Concentración de extracto.	# Repeticiones
TB0(Testigo)	0%	4
TBA	3%, 6%, 9%	4
TBE	3%, 6%, 9%	4
TBH	3%, 6%, 9%	4
TBM	3%, 6%, 9%	4
TBEP	3%, 6%, 9%	4
TC0 (Testigo)	3%, 6%, 9%	4
TCA	3%, 6%, 9%	4

TCE	3%, 6%, 9%	4
TCH	3%, 6%, 9%	4
TCM	3%, 6%, 9%	4
TCEP	3%, 6%, 9%	4

*(TB0): Testigo *Botrytis*. (TBA): *Botrytis*/Agua. (TBE): *Botrytis*/Etanol. (TBH): *Botrytis*/Hexano. (TBM): *Botrytis*/Metanol. (TBEP): *Botrytis*/Éter de Petróleo, (TC0): Testigo *Colletotrichum*. (TCA): *Colletotrichum*/Agua. (TCE), *Colletotrichum*/Etanol. (TCH): *Colletotrichum*/Hexano. (TCM): *Colletotrichum*/Metanol. (TCEP): *Colletotrichum*/Éter de Petróleo.

5.7 Variables

5.7.1 Crecimiento micelial

La tasa de crecimiento micelial se midió con un Vernier cada 24 horas hasta que el testigo absoluto con sus repeticiones cubrió por completo las cajas de Petri. La medición fue expresada en mm, y se calculó el porcentaje de inhibición para cada tratamiento.

5.7.2 Esporulación

La concentración de conidios se determinó a los nueve días cuando se alcanzó la máxima esporulación. Cada caja de Petri fue enjuagada con agua destilada estéril y la superficie fue raspada con una varilla de vidrio.

Posteriormente Alícuotas de 0.5 mL de cada caja fueron transferidas a una cámara de Neubauer para realizar el conteo de los conidios.

5.8 Bioensayo *in situ*

Con la finalidad de completar y validar la información *in vitro* obtenida previamente, se procedió a realizar la evaluación *in situ*, para ello se utilizaron fresas y mangos, que fueron obtenidos en el mercado de la localidad. Éstos fueron seleccionados con base a la uniformidad del color y forma, y que estuvieran libres de alguna enfermedad.

Cada fruto fue desinfectado utilizando hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, posterior a ello, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiente sobre papel secante.

De manera paralela se obtuvieron discos de 0.5 mm de medio de cultivo con hongos de *Colletotrichum spp* y *Botrytis cinerea* previamente desarrollados.

Las concentraciones de extractos de aranto fueron asperjadas sobre 19 mangos y 20 fresas (Cuadro 3), 24 horas antes de la inoculación con los hongos patógenos. Se incluyó un testigo absoluto (agua destilada estéril).

La inoculación de los frutos se llevó a cabo realizando heridas de 2 mm de profundidad utilizando agujas de jeringa estériles; sobre la herida se colocaron los discos de medio de cultivo con los hongos fitopatógenos.

Los frutos fueron colocados en cámara húmeda a temperatura de 22 ± 2 °C (Figura 9). La severidad e incidencia fueron medidas cada 24 h.

Cuadro 3. Tratamientos con extractos de aranto evaluados *in situ* en contra de *Colletotrichum spp* y *Botrytis cinerea*.

Tratamientos*	Concentración de extracto	# Repeticiones
TB0 (Testigo)	0%	4

TBE	6% y 9%	4
TBM	6% y 9%	4
TC0(Testigo)	0%	3
TCE	6% y 9%	4
TCM	6% y 9%	4

*(TB0): Testigo *Botrytis*. (TBE): *Botrytis*/Etanol. (TBM): *Botrytis*/Metanol. (TC0): Testigo *Colletotrichum*. (TCE), *Colletotrichum*/Etanol. (TCM): *Colletotrichum*/Metanol.



Figura 8. Frutas desinfectadas.



Figura 9. Frutas inoculadas.

5.9 Variables

5.9.1 Incidencia

De acuerdo con Teng y Jonson (1998) citados por Manzanilla-López *et al.*, (2002), la incidencia de una enfermedad describe la proporción de individuos infectados dentro de una población de hospederos. Después de dos semanas, se evaluó la incidencia del patógeno, mediante el índice de daño por microorganismos (IDM) expresado en porcentaje con la siguiente ecuación:

$$IDM = \frac{n}{N} \times 100$$

Dónde:

IDM= Índice de daño por microorganismo (%)

n= Número de frutos dañados

N= Número de frutos por tratamiento.

Los datos se reportaron en porcentaje de IDM y grado del daño conforme a la escala representada en porcentaje. Se analizaron mediante una ANOVA para obtener diferencias entre los tratamientos.

5.9.2 Severidad

La severidad de la enfermedad describe la proporción de tejido del hospedero que muestra síntomas. Consiste en detectar algún efecto deletéreo en el hospedero que causa pérdidas en el valor económico (Manzanilla-López, *et al.*, 2002). Se evaluaron las lesiones presentes por la invasión de microorganismos y se tomaron las medidas directamente de la lesión mostrada sobre la superficie de cada fruto.

5.9.3 Sólidos solubles totales

Los azúcares son los componentes mayoritarios en el jugo de la fruta, el análisis soluble puede utilizarse como un estimador del contenido de azúcar en la muestra. La técnica más común está basada en la refractometría. Para la determinación de sólidos solubles (° Brix) del jugo de mango y fresa se ha utilizado un refractómetro digital (HANNA®) (Figura 10).



Figura 10. Refractómetro.

5.9.4 pH

Se realizaron las evaluaciones de pH en el jugo de los frutos, para ello se maceró un disco de tejido de mango y fresa con 20 mL de agua destilada, empleando un medidor de pH digital calibrado (Figura 11).



Figura 11. Medidor de pH digital.

5.10 Análisis estadístico

Los tratamientos se organizaron en un diseño completamente al azar. Los datos se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (Bartlett), aquellos que no cumplieron con estos supuestos (esporulación) fueron transformados mediante la fórmula $x = y^{1/2}$; donde x = dato transformado, y = concentración de esporas.

Para facilitar la interpretación de los resultados estos se mostraron como valores sin transformar. Se hicieron análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). La curva del progreso de la enfermedad se calculó por medio del método de los polígonos, y las áreas resultantes fueron sometidas a análisis de varianza y a pruebas de separación de medias mediante el programa Statistical Analysis System, versión 9 para Windows (**SAS Institute Inc.**, Cary, NC, USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de polifenoles

Los polifenoles son productos secundarios del metabolismo de las plantas y generalmente participan en mecanismos de defensa frente a la radiación ultravioleta o agresión de agentes patógenos. Se ha identificado más de 8000 estructuras químicas en varias especies vegetales (Pandey y Rizvi, 2009). Proviene de diferentes fuentes vegetales y tienen propiedades biológicas importantes, como efecto antiinflamatorio, antihiático, antiviral, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, anticancerígeno, efecto cardioprotector y cardiovascular (Han *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2015).

Se analizaron dos extractos para la identificación de polifenoles, metanólico y etanólico. Para determinar en qué medio se obtienen mejores señales que permitirán analizar los compuestos presentes en el aranto. En la Figura 12 se presenta el electroferograma de los extractos, en el cual se muestra que para el extracto metanólico se presentan más señales y de mayor altura en comparación con el etanol, donde las señales a tiempos mayores a 6 min son más pequeñas. En el extracto metanólico, se observan señales a los 3.7 minutos, 5.5 minutos y a los 7.9 minutos, lo cual hace que se prefiera como solvente de extracción. Parekh *et al.*, (2005), encontraron que los resultados obtenidos con extractos de plantas realizados con metanol son más consistentes que los obtenidos con extractos acuosos, debido a la polaridad de los compuestos que son extraídos por cada uno de los solventes empleados para realizar los extractos. Nickavar *et al.*, (2002) afirman que los compuestos principales responsables de la actividad antimicrobiana de las plantas, son extraídos en mayor cantidad y en mayor número de compuestos diferentes con metanol como solvente de extracción.

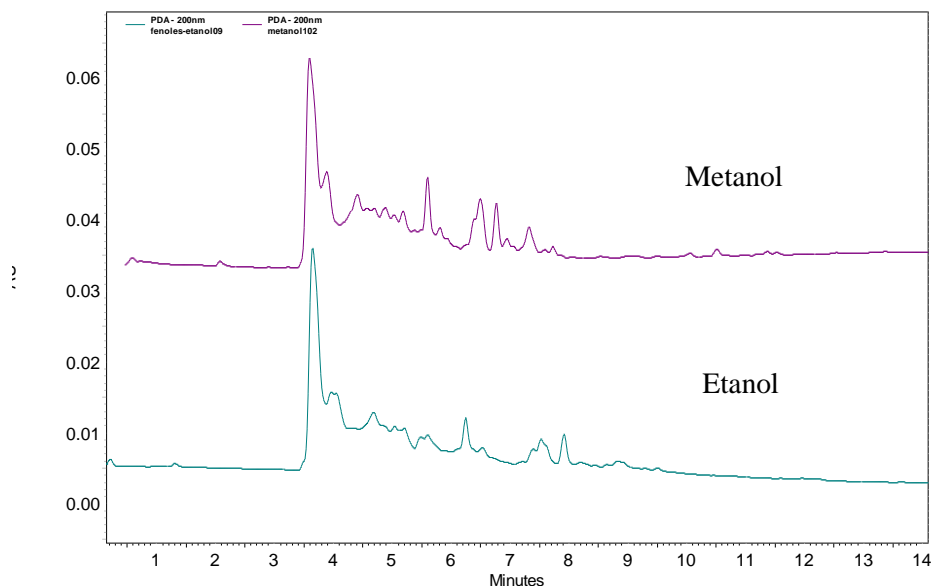


Figura 112. Electroferograma de extracto de *D. bicolor* utilizando etanol y metanol.

Para identificar mejor los polifenoles presentes en la planta de aranto, fue necesario determinar un procedimiento adecuado para su obtención, se utilizaron dos métodos; uno por maceración y por ultrasonido.

- 1) Extracción por maceración de 125 g de la planta seca y molida con 400 mL de solvente metanólico durante 72 horas en la oscuridad.
- 2) Sonicación de 1g de la planta seca y molida con 10 mL de metanol al 100 % durante 90 minutos utilizando recirculación de agua fría.

En la Figura 13 se comparan los electroferogramas del extracto metanólico obtenido de los dos tipos de extracción, en donde se observan que existen perfiles diferentes en cuanto al número de picos, tiempo de migración y altura. Por esto se realizó la identificación con el método asistido por sonicación, ya que visualmente se observan mayor número de compuestos.

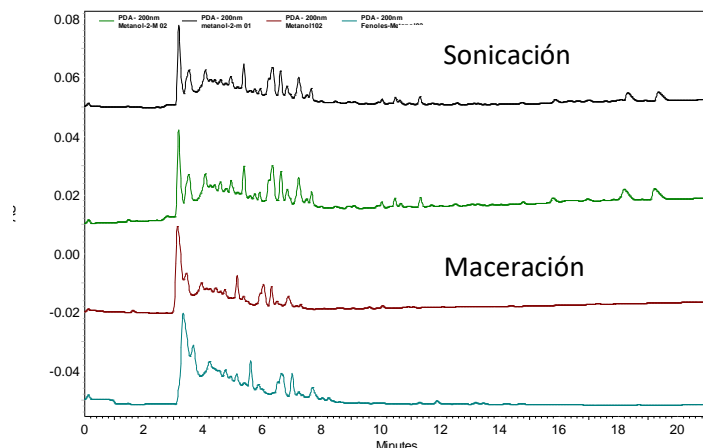


Figura 13. Electroferograma de extracción por maceración (72 hrs) y sonicación (90 min) con 2 repeticiones cada uno.

6.1.1 Estándares

El uso de un estándar interno, mejora la reproducibilidad del volumen introducido de la muestra, debido al cambio de viscosidad entre los extractos, además de disminuir errores en la toma de alícuotas y volúmenes de aforo. Por tal motivo, fue necesario seleccionar un estándar interno de estructura similar a los analitos, de una pureza alta, que no esté presente de forma natural en la planta y que no presente traslapes con las señales propias del extracto con lo cual relacionar la respuesta del estándar con la respuesta del analito de interés.

En el Cuadro 4 se muestra la identificación de los compuestos presentes en el extracto de aranto que se realizó por adición del estándar, logrando identificar 5 compuestos polifenólicos en el compuesto metanólico

Cuadro 4. Compuestos identificados en extracto de aranto

STD	NOMBRE

1	Rutina
2	Vainillina
3	Ac. Ferúlico
4	Ac. Cumárico
5	Ac. Gálico

En la Figura 14 se presenta el electroferograma de la mezcla de estándares identificados en el extracto donde se observa el orden de migración para cada compuesto como se muestra en el cuadro 4.

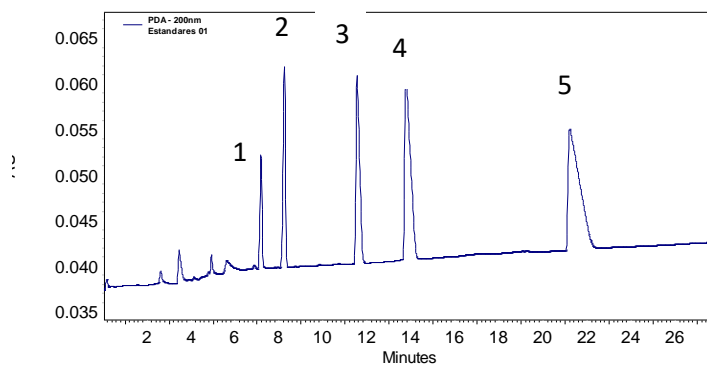


Figura 1413. Mezcla de los estándares puros.

Para confirmar la presencia de los polifenoles mencionados en el cuadro 4, se realizaron nuevas corridas, agregando estándar puro de cada compuesto para poder identificar su existencia.

Como se puede observar en la Figura 15 se adicionó el estándar de ácido gálico al extracto metanólico, aumentando la señal correspondiente a los 19.4 minutos, identificándose de esta forma la presencia de la señal del ácido gálico.

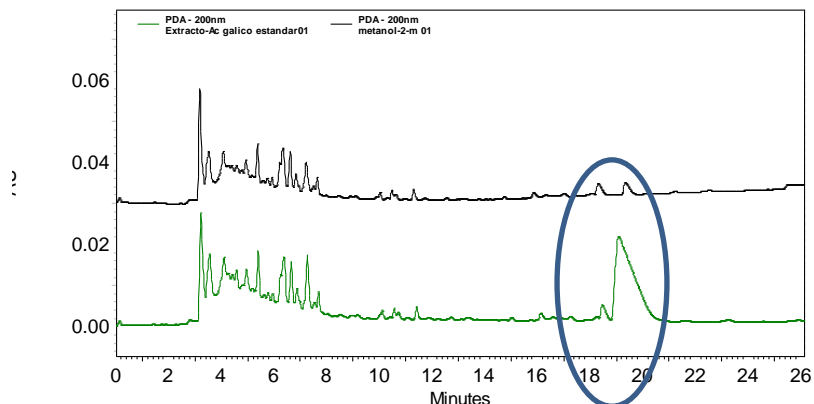


Figura 1514. Electroferograma comparando el estándar de ácido gálico y el extracto metanólico.

La Figura 16 muestra la identificación de la señal de rutina en el extracto metanólico que aparece a los 6.6 minutos ya que al adicionarle el estándar de este compuesto la altura de la señal aumenta confirmando la presencia del polifenol rutina. Ha demostrado poseer propiedades bioactivas como antioxidante y antiinflamatorio (Panchal *et al.*, 2011)

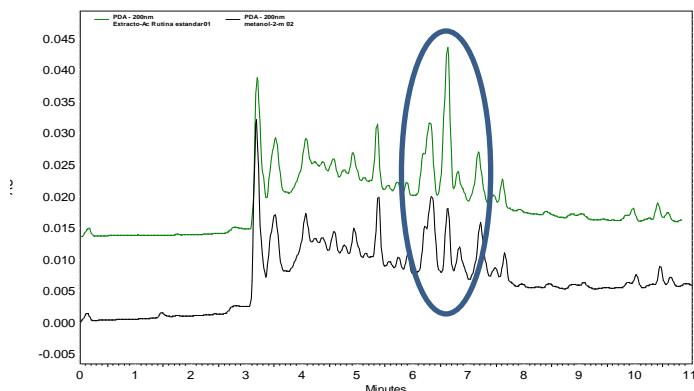


Figura 1615. Electroferograma comparando el estándar de Rutina y el extracto metanólico.

En la Figura 17 se muestra la identificación de la señal de ácido ferúlico en el extracto metanólico la cual se presenta a los 10.4 minutos, ya que al adicionarle estándar de ácido ferúlico aumento la señal confirmando la presencia de ácido ferúlico. Vallverdu-Queralt *et al.*, (2014) identificaron la presencia de este polifenol

en tomillo, orégano, comino, canela y laurel. Los ácidos hidroxicinámicos pueden ser encontrados en casi todas las plantas, son producidas en respuesta al estrés del ambiente, como el ácido ferúlico y *p*-cumárico. Estos compuestos han demostrado poseer capacidad antioxidante, hipoglicemiantes, antivirales y hepatoprotectivos (Farah y Donangelo, 2006).

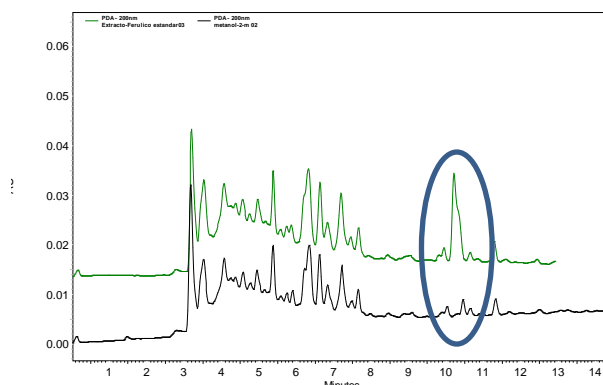


Figura 1716. Electroferograma comparando el estándar de ácido ferúlico y el extracto metanólico.

La Figura 18 muestra la identificación de la señal del ácido cumárico en el extracto con metanol que se presenta a los 12.1 minutos ya que al adicionarle estándar de ácido cumárico a la muestra de extracto metanólico aumento la señal.

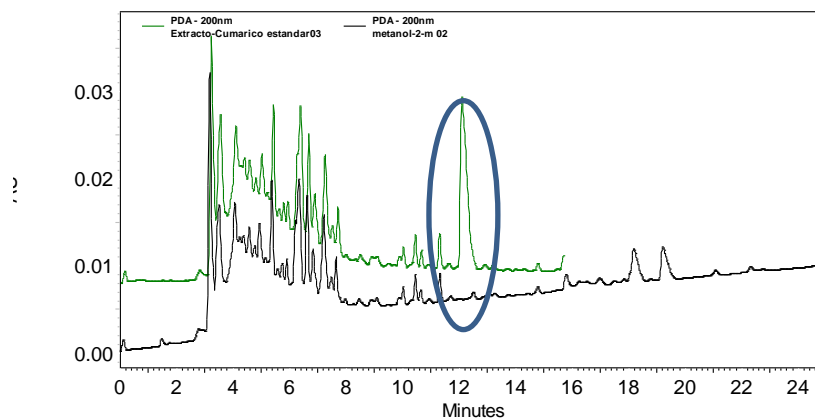


Figura 1817. Electroferograma comparando el estándar de Ácido Cumárico y el extracto metanólico.

En la Figura 19 se muestra la identificación de la señal de vainillina en el extracto metanólico evaluado, el cual aparece a los 7.6 minutos ya que al adicionarle estándar de Vainillina aumento la señal en el electroferograma. Badaracco *et al.*, (2020) presenta que la Vainillina inhibió el crecimiento y/o actuó como bio-fungicida en las cepas evaluadas de *Alternaria* sp., *R. stolonifer*.

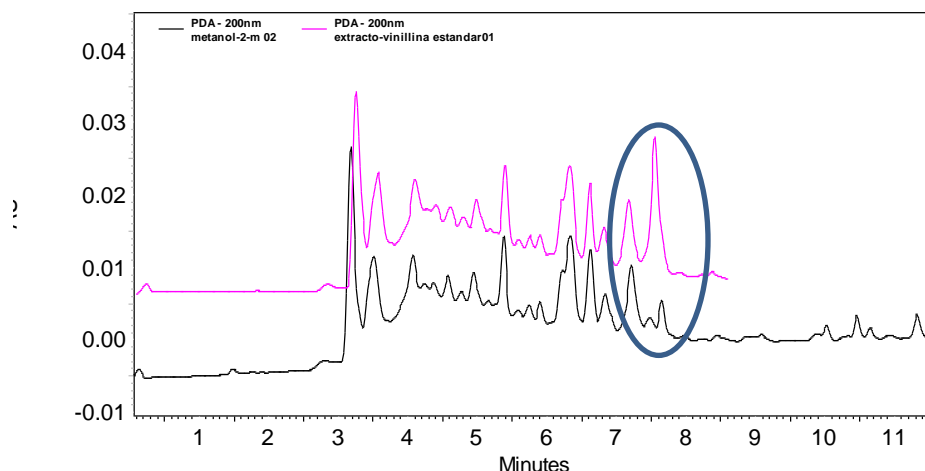


Figura 1918. Electroferograma comparando el estándar de Vainillina y el extracto metanólico.

6.1.2 Identificación de compuestos presentes en el extracto metanólico

Se evaluó la precisión en tiempo, área y altura de los picos de cada uno de los fenoles. De la respuesta analítica se obtuvo el promedio y desviación estándar. En el cuadro 5 se muestran los resultados de precisión en tiempos de migración, el promedio de concentración de los compuestos presentes en el extracto metanólico de aranto, así como la cantidad de cada compuesto por cada 100 g de planta, en donde se observa que el polifenol rutina es el compuesto mayoritario presente en *Decatropis bicolor*, seguido del ácido ferúlico y el ácido cumárico es el que se encuentra en menor concentración en la planta para el extracto metanólico.

Cuadro 5. Cuantificación de los polifenoles en el extracto metanólico.

Polifenol	STDs			Peso real	mg/L	mg/100g planta	S *
	Tiempo(min)	Área	Altura		(polifenol) std	Promedio	
Rutina	7.133	78135	12485	10.64	100.02	33.35	5.93

Caracterización química de *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk y su actividad antifúngica en contra de *Botrytis cinerea* Pers. y *Colletotrichum* spp

Vainillina	8.2	164415	21976	10.1	99.99	5.55	0.29
Ac. Ferúlico	11.5	23592	20603	10.1	99.99	30.70	8.44
Ac. Cumárico	13.733	355260	20133	10.2	99.96	0.63	0.03
Ac. Gálico	21.167	466905	13232	10.21	100.06	5.35	0.71

*desviación estándar

Vinaturu (2001), publicó una visión general de la extracción de principios activos de menta, manzanilla, árnica, caléndula, genciana, asistida por ultrasonido, mostrando que el ultrasonido mejoró los rendimientos comparados con los métodos clásicos. Esto podría deberse al efecto de la temperatura en conjunto con la cavitación del baño del ultrasonido, lo que resulta en una disminución de la viscosidad y la tensión superficial, e induce la presión del vapor lo que hace que, entre más vapores de solvente en la cavidad de la burbuja y numerosas burbujas de cavitación, que colapsara con menos violencia y reducirán los efectos de sonicación (Xu *et al.*, 2017).

Hernández Sánchez (2018) afirma que la planta de aranto tiene una alta capacidad antioxidante tanto en compuestos de vía radicalaria, vía redox y fenoles totales en comparación con otras especies como *acanthopanax gracilistylus*, *Brassica alba* L. *Boiss*, *Curcuma aroatica* *Salisb* utilizando un tipo de extracción sólido-liquido. Donde la temperatura contribuye a la eficiencia de extracción (Chemat *et al.*, 2016). Para que no exista una pérdida o degradación de algún metabolito secundario en la planta.

6.2 Ensayos in vitro *Colletotrichum* spp

6.2.1 Crecimiento micelial

La inhibición del crecimiento se observó principalmente con concentraciones altas de los solventes etanol, hexano y metanol. Los tratamientos TCE y TCM al 9% inhibieron en su totalidad el desarrollo del patógeno, mientras que los extractos acuosos tuvieron un comportamiento similar al testigo, iniciando el desarrollo desde las primeras 24 horas, mientras que los tratamientos con efectos negativos sobre el patógeno iniciaron su crecimiento hasta cuatro días después de su siembra. Esto puede indicar que solventes diferentes al agua arrastraron metabolitos secundarios que tuvieron un

efecto fungistático o fungicida sobre éste patógeno. Al respecto López *et al.*, (2006) mencionan que extractos etanólicos de *Plantago major* controlaron en un 68 % el desarrollo de *C. musae* en banano, en dicho extracto se encontraron presentes flavonoides, que se conoce tienen efecto antifúngico. La resina de la gobernadora tiene una potente acción antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra hongos fitopatógenos de notable importancia económica como son los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Montes-Belmont *et al.*, 2000)

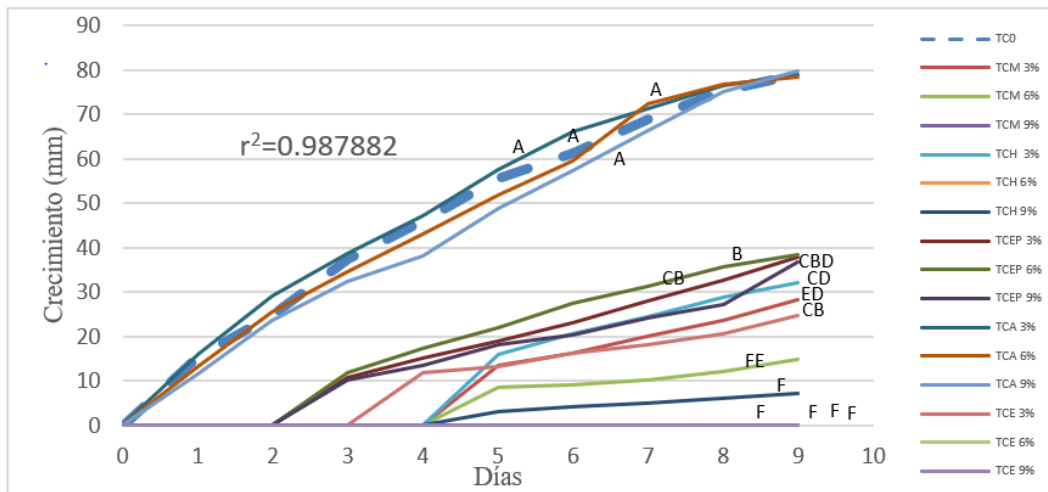


Figura 20. Crecimiento micelial diario de *C. gloeosporioides* bajo diferentes tratamientos a base de *Decatropis bicolor*.

(TB0): Testigo *Botrytis*. (TBA): *Botrytis*/Agua. (TBE): *Botrytis*/Etanol. (TBH): *Botrytis*/Hexano. (TBM): *Botrytis*/Metanol. (TBEP): *Botrytis*/Éter de Petróleo, (TC0): Testigo *Colletotrichum*. (TCA): *Colletotrichum*/Agua. (TCE), *Colletotrichum*/Etanol. (TCH): *Colletotrichum*/Hexano. (TCM): *Colletotrichum*/Metanol. (TCEP): *Colletotrichum*/Éter de Petróleo.

Los resultados mencionados anteriormente se corroboran con las imágenes de la Figura 21, en la que el testigo presenta crecimiento total en la caja de Petri.



Figura 21. Crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp en las diferentes concentraciones de los extractos de *D. bicolor* *in vitro* a los nueve días de evaluación.

No existen datos de extractos de *Decatropis bicolor* reportados para el manejo de patógenos en la agricultura, pero sí de otros extractos como el de ruda (*Ruta graveolens*) en etanol. Aguilar-Alonso *et al.*, (2013) encontraron que con extracto etanólico de ruda había inhibición de *C. gloeosporioides*. Por su parte, Barrera *et al.*, (2012) emplearon extractos etanólicos de propóleos a concentraciones de 1000, 3000 y 5000 ppm, donde la mayor inhibición se presentó a 5000 ppm en las primeras 24 h. Estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio, en el que con las más altas concentraciones de extractos etanólicos se inhibió el desarrollo del hongo.

Cuadro 6. Medias de crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* spp bajo diferentes tratamientos a base de *D. bicolor*.

Tratamientos*	Medias (ABC)**	Tukey agrupamiento
TCA 3 %	433.87	A
TC0	416.51	A

Caracterización química de Decatropis bicolor (Zucc.) Radlk y su actividad antifúngica en contra de Botrytis cinerea Pers. y Colletotrichum spp

TCA 6 %	409.13	A
TCA 9 %	387.74	A
TCEP 6 %	164.59	B
TCE 3 %	149.62	C B
TCEP 3 %	147.55	C B
TCEP 9 %	131.85	C B D
TCH 3 %	108.42	C D
TCM 3 %	87.55	E D
TCM 6 %	47.33	F E
TCH 9 %	21.8	F
TCM 9 %	0	F
TCE 9 %	0	F
TCE 6 %	0	F
TCH 6 %	0	F

**valores adimensionales

*(TC0): Testigo sin tratar. (TCA3%): Extracto acuoso 3%, (TCA6%): Extracto acuoso 6%, (TCA9 %): Extracto acuoso 9%, (TCE3%), Extracto de etanol al 3%, (TCE6%), Extracto de etanol al 6%, (TCE9 %): Extracto de etanol al 9%, (TCH 3%): Extracto de hexano del 3%, (TCH 6 %): Extracto de hexano del 6%, (TCH9%): Extracto de hexano a 9 %, (TCM3%): Extracto de metanol 3%, (TCM6 %): Extracto de metanol 6 %, (TCM9%): Extracto de metanol 9%, (TCEP3%): Extracto de Éter de Petróleo 3%, (TCEP6%): Extracto de Éter de Petróleo 6%, (TCEP9%): Extracto de Éter de Petróleo 9%.

6.2.2 Esporulación

El número de esporas de *Colletotrichum* spp en presencia de los extractos preparados (agua, metanol, etanol, éter de petróleo y hexano) con *D. bicolor* a los nueve días se muestra en la Figura 22. Hay diferencia estadística entre todos los tratamientos evaluados con respecto al testigo ($p = 0.0032$). Los tratamientos en los que no se presentaron esporas son TCE y TCH al 6 y 9 %, así como TCM 9 %, el resto de los tratamientos presentaron diferentes cantidades que no superaron las 15 esporas. (Figura 22). La falta de esporas evitará que el patógeno se disperse, disminuyendo la incidencia y severidad sobre otros frutos. Guerrero-Rodríguez *et al.*, (2007) lograron afectar la producción de conidios de *C. gloeosporioides* utilizando un extracto etanólico de *Flousensia cernua* D.C. en una concentración de 2000 y 4000 mg/L, contrario a lo anterior el extracto hexánico estimuló la formación de conidios del hongo a la concentración de 500 mg/L en comparación del testigo. Bautista- Baños *et al.*, (2002) reportan la inhibición total de esporulación de *C. gloeosporioides* con cinco extractos acuosos. Los resultados obtenidos nos dan la oportunidad de evaluar los extractos etanol y metanol en bioensayos *in vivo*.

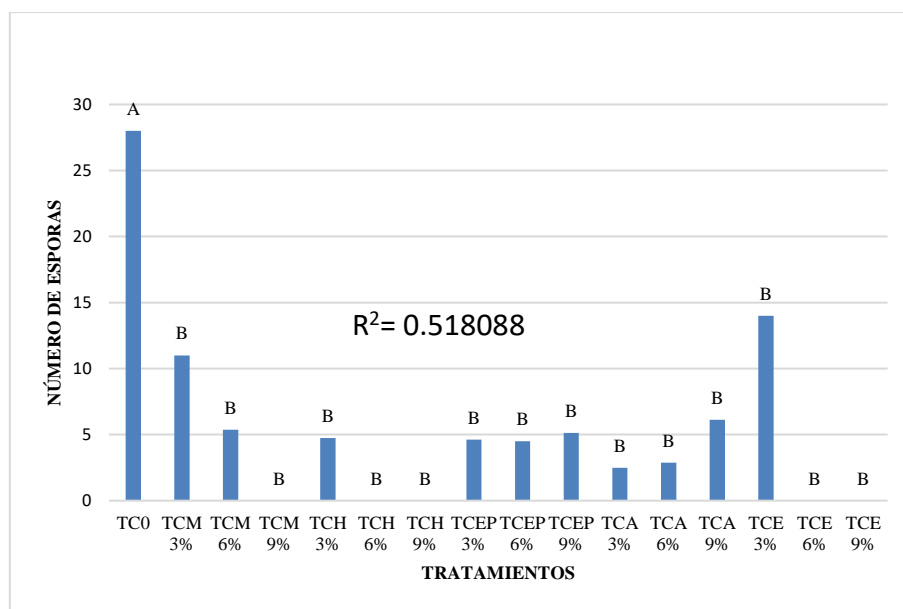


Figura 22. Esporulación de *Colletotrichum* spp bajo diferentes tratamientos a base de extractos de *D. bicolor* in vitro a los nueve días de evaluación.

(TC0): Testigo sin tratar. (TCA3%): Extracto acuoso 3%, (TCA6%): Extracto acuoso 6%, (TCA9 %): Extracto acuoso 9%, (TCE3%), Extracto de etanol al 3%, (TCE6%): Extracto de etanol al 6%, (TCE9 %): Extracto de etanol al 9%, (TCH 3%): Extracto de hexano del 3%, (TCH 6 %): Extracto de hexano del 6%, (TCH9%): Extracto de hexano a 9 %, (TCM3%): Extracto de metanol 3%, (TCM6 %): Extracto de metanol 6 %, (TCM9%): Extracto de metanol 9%, (TCEP3%): Extracto de Éter de Petróleo 3%, (TCEP6%): Extracto de Éter de Petróleo 6%, (TCEP9%): Extracto de Éter de Petróleo 9%.

6.3 Ensayos in vitro con *Botrytis cinerea*

6.3.1 Crecimiento micelial

El Crecimiento micelial del patógeno en general fue inversamente proporcional a las concentraciones de *D. bicolor*, mostrando una inhibición del crecimiento en su totalidad en las concentraciones de TBE 3,6,9 % y TBM 3,6,9 %, mientras que los extractos acuosos tuvieron un comportamiento similar al testigo iniciando su desarrollo desde las 24 horas, los demás tratamientos con efecto negativo sobre el patógeno, iniciaron su crecimiento hasta después del tercer y quinto día de la siembra. Pudiendo indicar que los solventes diferentes al agua arrastraron metabolitos secundarios que tienen efecto sobre el patógeno. Al respecto Tegegneva *et al.*, (2008) mostraron que el extracto metanólico de Lirio africano inhibió el crecimiento micelial de *B. cinerea* a un 97 % a

concentración de 1000 ppm en un tiempo de 4 días. Al igual que el extracto preparado con metanol, que presenta una inhibición del patógeno hasta por 9 días.

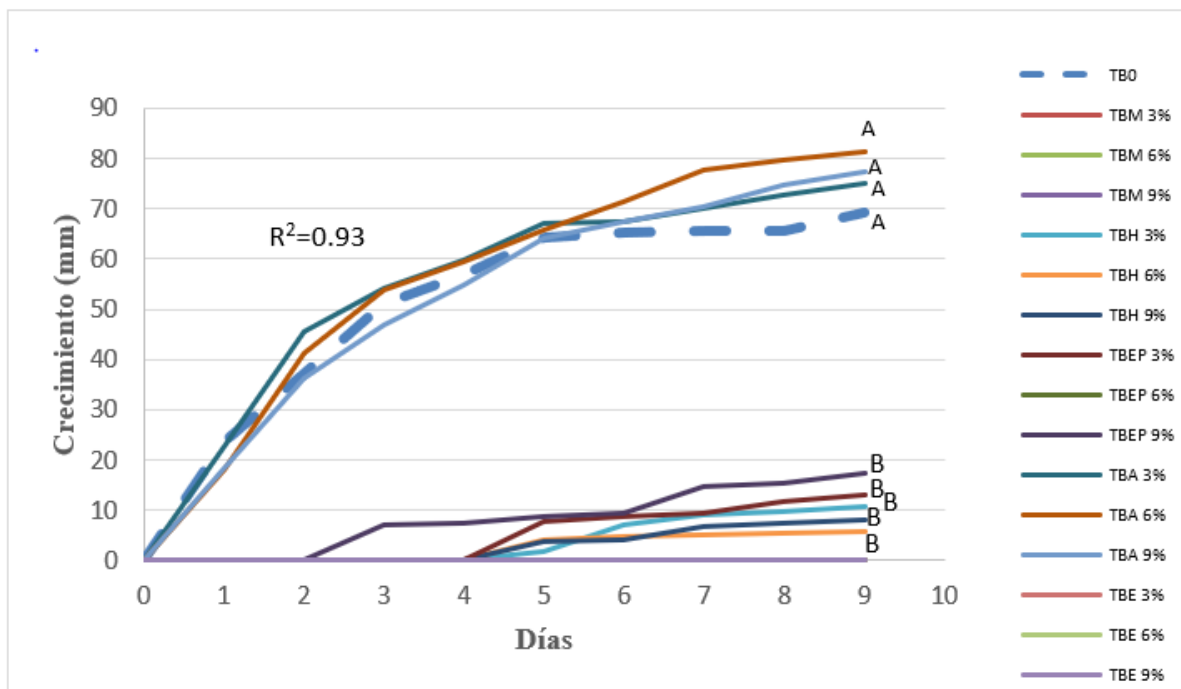


Figura 2319. Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* bajo diferentes tratamientos a base de extractos de *D. bicolor*.

(TC0): Testigo sin tratar. (TCA3%): Extracto acuoso 3%, (TCA6%): Extracto acuoso 6%, (TCA9 %): Extracto acuoso 9%, (TCE3%), Extracto de etanol al 3%, (TCE6%), Extracto de etanol al 6%, (TCE9 %): Extracto de etanol al 9%, (TCH 3%): Extracto de hexano del 3%, (TCH 6 %): Extracto de hexano del 6%, (TCH9%): Extracto de hexano a 9 %, (TCM3%): Extracto de metanol 3%, (TCM6 %): Extracto de metanol 6 %, (TCM9%): Extracto de metanol 9%, (TCEP3%): Extracto de Éter de Petróleo 3%, (TCEP6%): Extracto de Éter de Petróleo 6%, (TCEP9%): Extracto de Éter de Petróleo 9%.

Los resultados mencionados anteriormente se corroboran en la Figura 24 en la que el testigo presenta crecimiento total en la caja de Petri, mientras que algunos tratamientos disminuyeron notablemente su desarrollo.

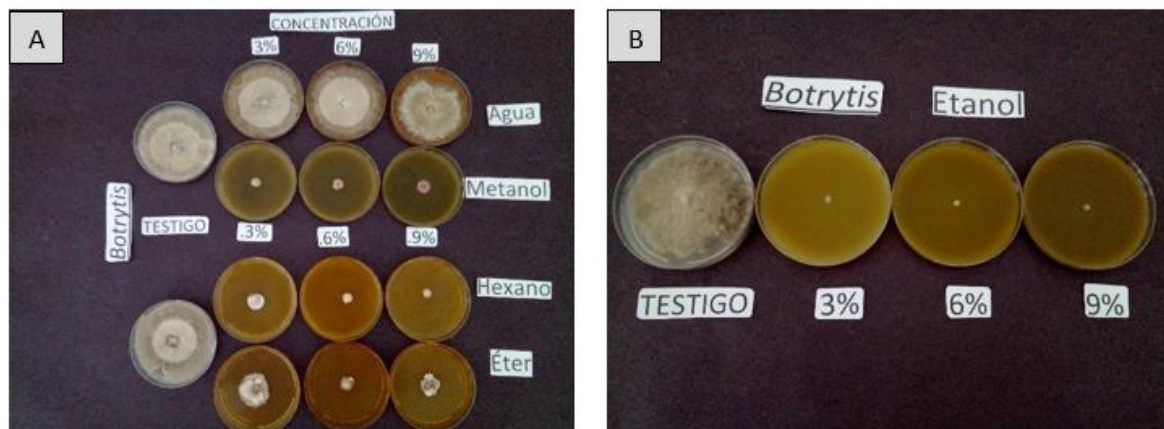


Figura 2420. Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* bajo diferentes tratamientos a base de extractos de *D. bicolor* *in vitro*.

Cuadro 7. Medias de crecimiento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea* bajo diferentes tratamientos a base de *D. bicolor*.

Tratamientos*	Medias (ABC)**	Tukey agrupamiento
TBA 6 %	499.11	A
TBA 3 %	485.98	A
TBA 9 %	462.63	A
TB0	452.29	A
TBEP 9 %	71.53	B
TBEP 3 %	44.56	B

TBH 3 %	33.62	B
TBH 9 %	25.91	B
TBH 6 %	22.34	B
TBM 3 %	0	B
TBM 6 %	0	B
TBM 9 %	0	B
TBE 3 %	0	B
TBE 6 %	0	B
TBE 9 %	0	B
TBEP 6 %	0	B

**valores adimensionales

*(TC0): Testigo sin tratar. (TCA3%): Extracto acuoso 3%, (TCA6%): Extracto acuoso 6%, (TCA9 %): Extracto acuoso 9%, (TCE3%), Extracto de etanol al 3%, (TCE6%), Extracto de etanol al 6%, (TCE9 %): Extracto de etanol al 9%, (TCH 3%): Extracto de hexano del 3%, (TCH 6 %): Extracto de hexano del 6%, (TCH9%): Extracto de hexano a 9 %, (TCM3%): Extracto de metanol 3%, (TCM6 %): Extracto de metanol 6 %, (TCM9%): Extracto de metanol 9%, (TCEP3%): Extracto de Éter de Petróleo 3%, (TCEP6%): Extracto de Éter de Petróleo 6%, (TCEP9%): Extracto de Éter de Petróleo 9%.

6.3.2 Esporulación

El número de esporas de *Botrytis cinerea* en cada uno de los tratamientos fue muy variada, mostrando diferencias significativas después de nueve días de incubación con los tratamientos a base de *D. bicolor* extraído con diferentes solventes (agua, metanol, etanol, éter de petróleo y hexano). Los tratamientos con la menor cantidad de esporas fueron metanol y etanol al 3, 6 y 9% en comparación con el testigo (Figura 25). Sin embargo, no hubo diferencia estadística entre tratamientos. De forma particular, los tratamientos TBH 3% y TBEP 6% presentaron los valores más altos de esporas. Esto puede deberse a una estimulación por parte del extracto, el cual causó estrés sobre el hongo aumentando su esporulación. Hernández *et al.*, (2007) Aplicaron extractos de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) en *B. cinerea* obteniendo una inhibición entre un 50% y 78%. Sin embargo, también se han reportado que algunos extractos resultan ser inhibitorios para un hongo y estimuladores para otros como sucede con *Pithecellobium dulce* L. que inhibe a *Uromyces Appendiculatus* pero estimula la germinación de esporas de *Aspergillus flavus* (Montes *et al.*, 2000), tal y como fue observado con los extractos de TBH 3%, TBEP 6% que fueron superiores al testigo.

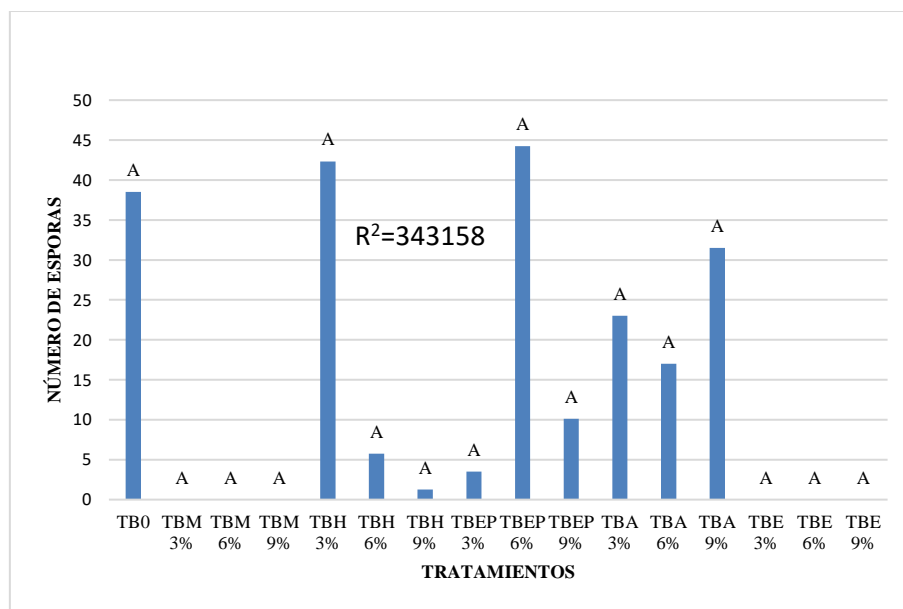


Figura 2521. Esporulación de *Botrytis cinerea* bajo diferentes tratamientos *in vitro* a base de extractos de *D. bicolor* a los nueve días de evaluación.

(TC0): Testigo sin tratar. (TCA3%): Extracto acuoso 3%, (TCA6%): Extracto acuoso 6%, (TCA9 %): Extracto acuoso 9%, (TCE3%), Extracto de etanol al 3%, (TCE6%), Extracto de etanol al 6%, (TCE9 %): Extracto de etanol al 9%, (TCH 3%): Extracto de hexano del 3%, (TCH 6 %): Extracto de hexano del 6%, (TCH9%): Extracto de hexano

a 9 %, (TCM3%): Extracto de metanol 3%, (TCM6 %): Extracto de metanol 6 %, (TCM9%): Extracto de metanol 9%, (TCEP3%): Extracto de Éter de Petróleo 3%, (TCEP6%): Extracto de Éter de Petróleo 6%, (TCEP9%): Extracto de Éter de Petróleo 9%.

Existen algunos estudios previos que han demostrado la actividad antimicrobiana del extracto de arantó con una extracción por maceración, mostrando su eficiencia sobre algunas bacterias como *A. flavus* (Cárdenas *et al.*, 2007)

6.4 Efecto Antifúngico *in situ* sobre *Colletotrichum spp*

6.4.1 Incidencia

Los valores más bajos de incidencia se encontraron con los tratamientos metanólicos, y el más alto con el testigo. Esto demuestra que los extractos tanto etanólico como metanólico tienen un efecto antifúngico sobre *Colletotrichum*. Esta observación puede respaldarse con la determinación de la composición química de la especie en el presente trabajo, ya que se encontraron polifenoles y éstos generalmente participan en mecanismos de defensa frente a la radiación ultravioleta o agresión de agentes patógenos. De acuerdo a Xoca-Orozco *et al.*, (2018) los tratamientos de quitosano de LMW resultaron en una disminución de la incidencia de antracnosis en más del 80 % en comparación con los frutos no tratados.

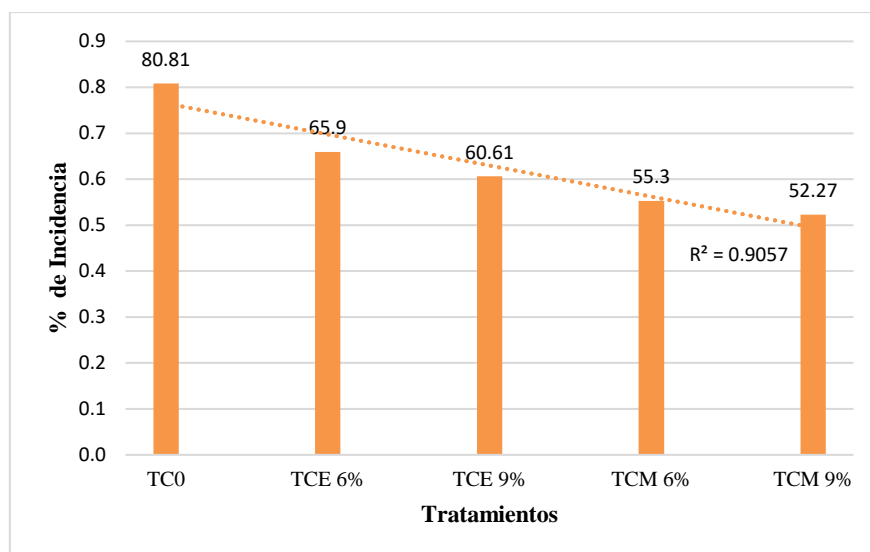


Figura 26. Incidencia de *Colletotrichum* spp en frutos de Mango bajo tratamientos a base de extracto de *D. bicolor* in situ.

(TC0): Testigo sin tratar, (TCE6 %), Extracto de etanol al 6%, (TCE9%): Extracto de etanol al 9%, (TCM6%): Extracto de metanol 6%, (TCM9%): Extracto de metanol 9%.

6.4.2 Severidad

Los tratamientos de etanol y de metanol arrojaron valores más bajos de severidad en comparación con el testigo. Lo anterior puede estar relacionado al tipo de metabolitos secundarios extraídos con los solventes y que probablemente tengan un efecto en inhibir el desarrollo del hongo sobre el fruto. En el presente trabajo se encontró que con metanol se extrajo el fenol rutina en mayor cantidad, el cual también está presente en otras plantas utilizadas en medicina. Todos los extractos con los dos solventes mostraron diferencias estadísticas ($p=0.0002$) con respecto al testigo. Para Mulkay-Vitón *et al.*, (2016) Al utilizar un extracto etanólico de propóleo pardo a 10000 mg/L redujo significativamente la severidad de la enfermedad en comparación al control.

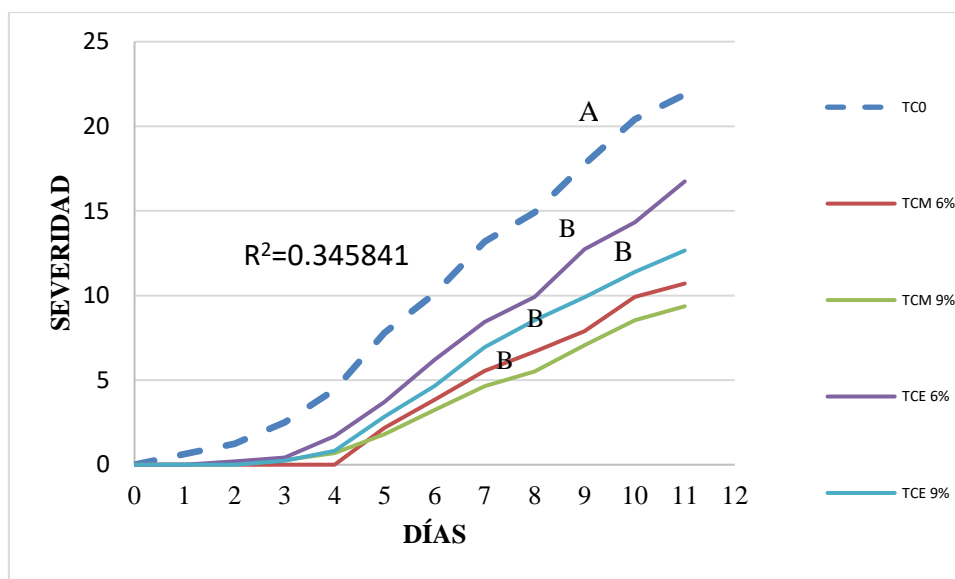


Figura 27. Severidad de *Colletotrichum* spp. en frutos de mango bajo diferentes tratamientos a base de extracto de *D. bicolor* *in situ*.

(TC0): Testigo sin tratar, (TCE6 %), Extracto de etanol al 6%, (TCE9%), Extracto de etanol al 9%, (TCM6%): Extracto de metanol 6%, (TCM9%): Extracto de metanol 9%.

6.4.3 Sólidos solubles totales

La comparación de sólidos solubles totales en frutos de mango inoculados con *Colletotrichum* spp se muestra en la Figura 28, después de estar en contacto once días con los extractos de etanol y metanol de *D. bicolor*. Los sólidos solubles totales indican la cantidad de dulzor en un fruto, por lo que es deseable que no exista diferencia estadística con el testigo ($p= 0.7391$). Los valores estuvieron comprendidos entre 14 y 15.5 °Brix los cuales son similares a los señalados por Bolívar *et al.* (2009) que muestran un incremento de sólidos a medida que avanza el estado madurez de los frutos de mango y/o el tiempo de almacenamiento, reportando valores entre 6.6 y 14.75 °Brix. También Aular y Rodríguez (2005) reportan valores inferiores a los 18.02 °Brix para mangos criollos.

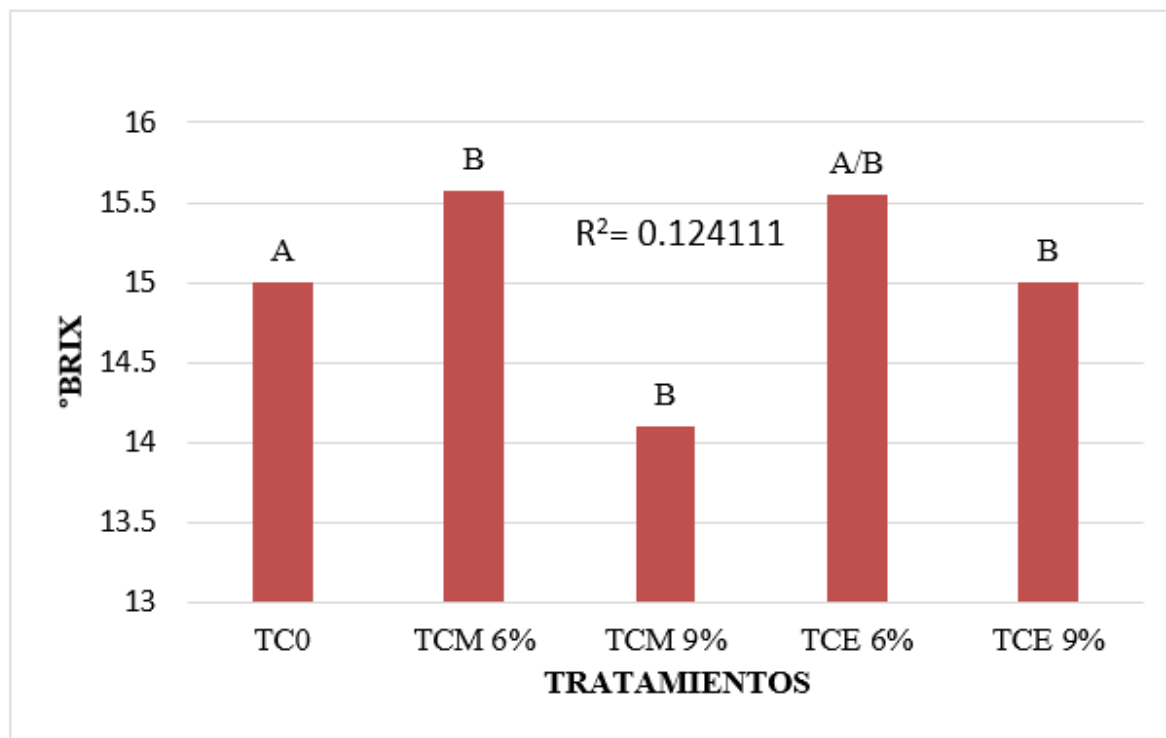


Figura 28. Sólidos solubles totales en frutos de mango tratados con extractos de *D. bicolor*.

(TC0): Testigo sin tratar, (TCE 6%), Extracto de etanol al 6%, (TCE9%): Extracto de etanol al 9%, (TCM6%): Extracto de metanol 6%, (TCM9%): Extracto de metanol 9%.

6.4.4 Acidez activa-pH

Los tratamientos a base de *D. bicolor* no mostraron diferencias estadísticas sobre la variable de pH sobre frutos de mango; sin embargo, no hubo diferencia con el control, lo cual indica que esta variable no se ve afectada con la aplicación de los diferentes extractos, encontrando los valores similares con en el testigo (Figura 29). Jarvio (2006), identifica que el pH del mango aumento levemente, lo cual favorece las paredes celulares y las fuerzas cohesivas que mantienen las células unidas, esto favorece la perdida de la firmeza del fruto y el aumento de los azucares solubles durante el proceso de maduración. Bolívar *et al.*, (2009) reportan valores de pH entre 4 y 5 para mangos con extracto de orégano silvestre y rabo de alacrán y de 3.5 para aquellos que solo tenían agua. Mostrando que los valores de pH aumentan con el tiempo de almacenamiento (11 días) a temperatura ambiente.

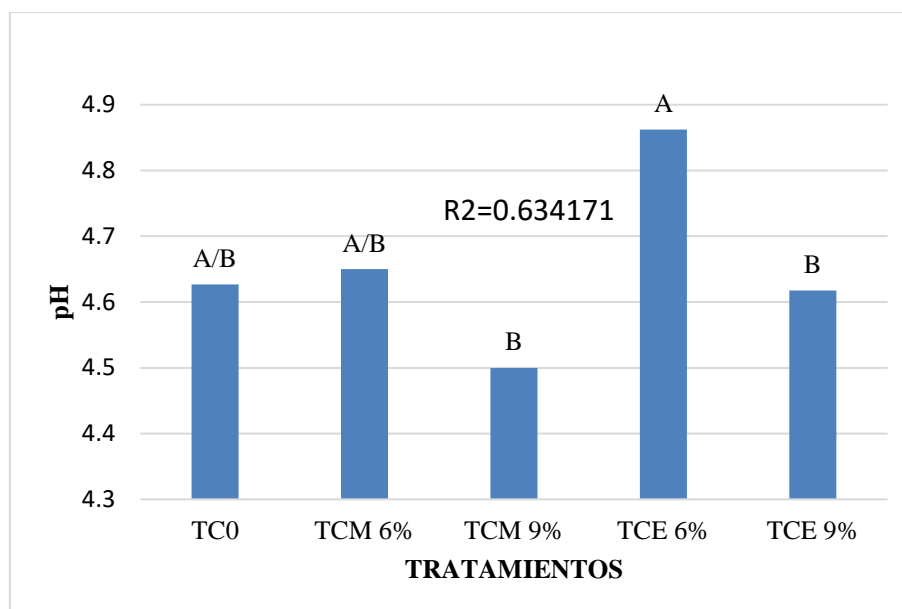


Figura 29. Medidas de pH obtenidas de frutos de mango con los tratamientos a base de extracto de *D. bicolor*.

(TC0): Testigo sin tratar, (TCE6%), Extracto de etanol al 6%, (TCE9%): Extracto de etanol 9%, (TCM6%): Extracto de metanol 6%, (TCM9%): Extracto de metanol 9%.

6.5 Efecto Antifúngico *in situ* sobre *Botrytis cinerea*

6.5.1 Incidencia

El valor más bajo de incidencia se encuentra en el tratamiento metanólico y más alto en los extractos etanólicos, superando al testigo. Comprobando que el extracto metanólico tiene un efecto antifúngico sobre *Botrytis*, pero los extractos etanólicos estimulan el crecimiento del patógeno *in situ*. Los resultados de Chávez y Wang (2004), muestran que existe incidencias más altas de la enfermedad en condiciones postcosecha con respecto a las que se presentaron en condiciones de campo, esto se puede atribuir a que las cámaras proporcionan condiciones de temperatura y humedad para el patógeno.

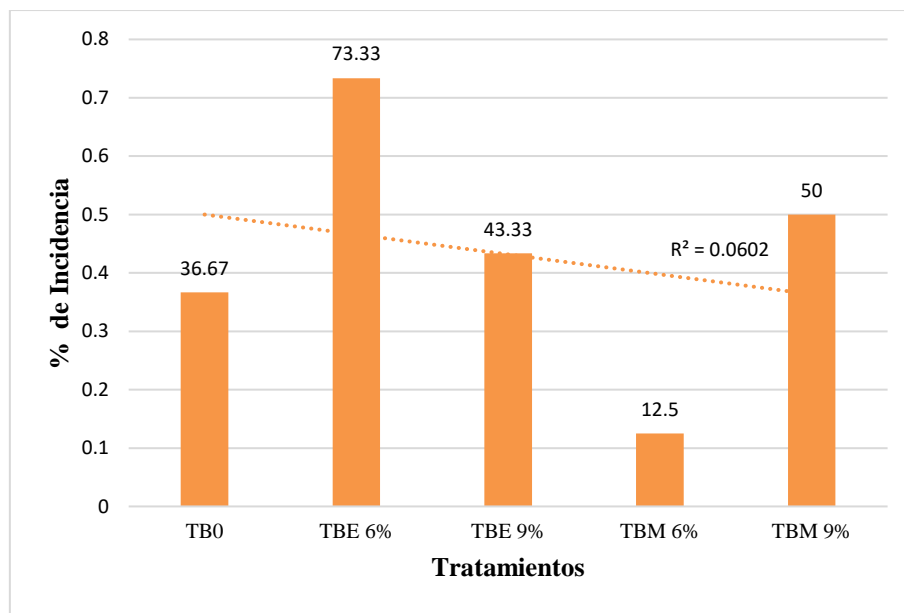


Figura 30. Incidencia de *Botrytis cinerea* en frutos de fresa bajo diferentes tratamientos a base de extractos de *D. bicolor* in situ.

(TB0): Testigo sin tratar. (TBE6%): Extracto de etanol al 6%, (TBE9 %): Extracto de etanol 9%, (TBM6 %): Extracto de metanol 6%, (TBM9%): Extracto de metanol 9 %

6.5.2 Severidad

La severidad de *Botrytis cinerea* sobre frutos de fresa tratadas con los extractos metanólico y etanólico mostraron valores mayores con respecto al testigo, el TBM al 6 % comenzó a mostrar lesión hasta el quinto día, pero después se comportó muy parecido al testigo ($p = <.0001$). No existen reportes de extractos de *D. bicolor* aplicados para reducir la severidad de *Botrytis cinerea*, pero Pazmiño *et al.*, (2017) utilizó un extracto etanólico de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) como alternativa y se mostró una severidad del 11.8 % en frutos de fresa a una dosis de 15000 ppm.

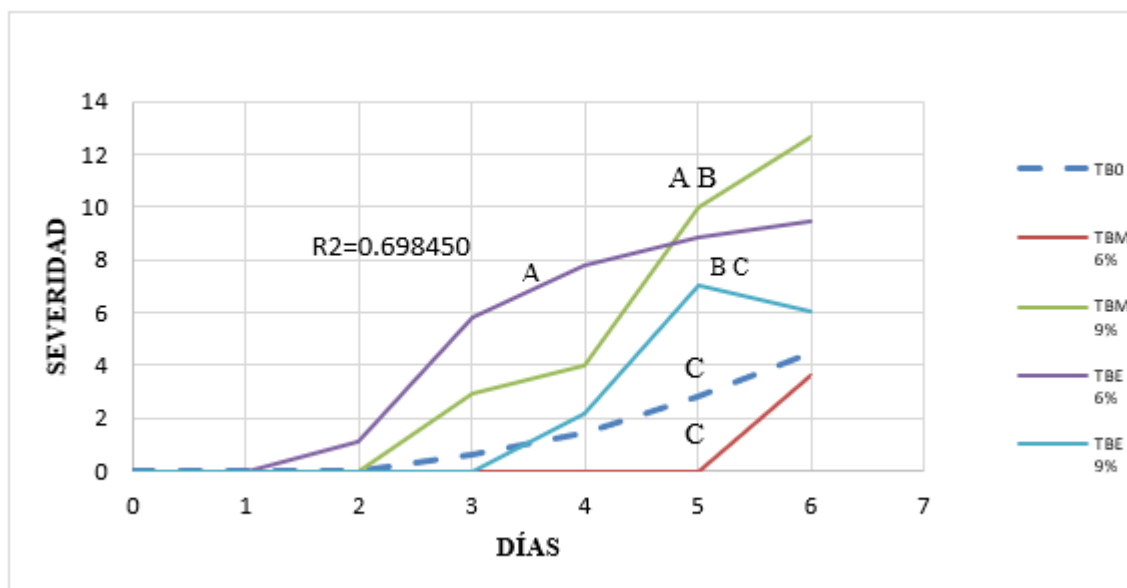


Figura 221. Severidad de *Botrytis* en frutos de fresa tratados con extractos de *D. bicolor* in situ.

(TBO): Testigo sin tratar. (TBE6%): Extracto de etanol 6%, (TBE9%): Extracto de etanol al 9%, (TBM6%): Extracto de metanol 6%, (TBM9%): Extracto de metanol 9%.

6.5.3 Sólidos solubles totales

La comparación de sólidos solubles totales en frutos de fresa (Figura 32) inoculados con *Botrytis cinerea* después de seis días de estar en contacto con los extractos de etanol y metanol al 6 y 9% de *D. bicolor* muestran que no hubo diferencias estadísticas significativas, lo cual es deseable, ya que indica que los tratamientos aplicados no tuvieron efecto sobre el contenido de azúcares en los frutos de fresa. Cabe destacar que, con la aplicación de TBE 9% se nota una tendencia hacia mayor cantidad de °Brix en los frutos, sin haber diferencia estadística. Pasto (2010) utiliza un recubrimiento comestible a base de Hidroxipropil Metilcelulosa, el cual mantiene los valores de sólidos solubles entre 5 a 6.17 °Brix.

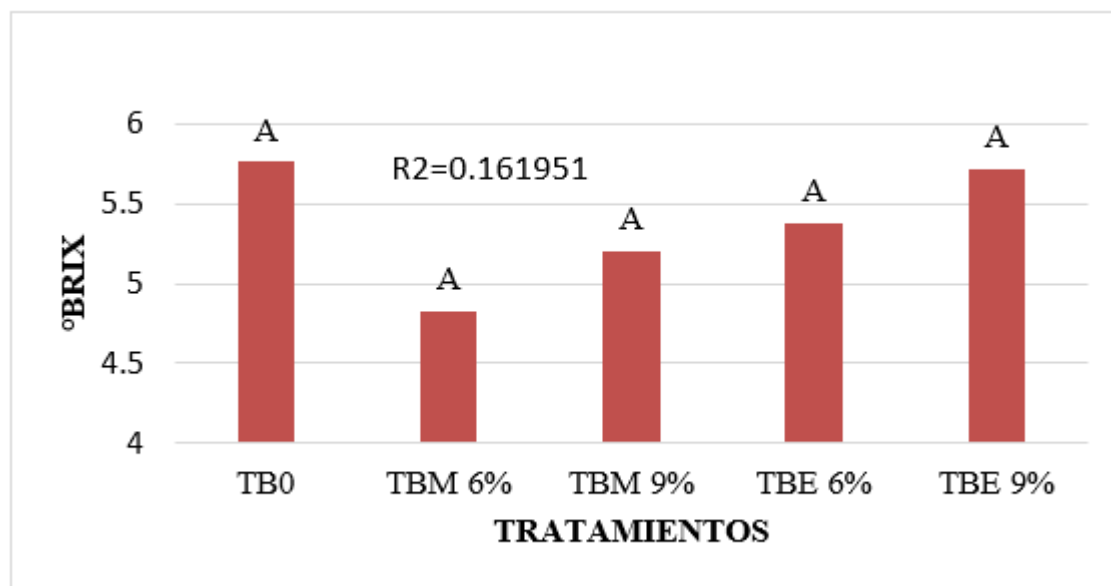


Figura 3223. Sólidos solubles totales encontrados en fresa bajo tratamientos a base de extractos de *D. bicolor*.

(TB0): Testigo sin tratar, (TBE6%): Extracto de etanol 6%, (TBE9%): Extracto de etanol 9%, (TBM6%): Extracto de metanol 6 %, (TBM9%): Extracto de metanol 9%

6.5.4 Acidez activa-pH

Los resultados de pH muestran que no hay diferencia estadística entre los tratamientos aplicados a los frutos de fresa. Lo cual indica que *D. bicolor* en las diferentes concentraciones probadas no ejerce efecto en el pH de los frutos de fresa comparados con los del testigo (Figura 33). El pH condiciona la actividad de un número de enzimas responsables de sucesos importantes en la fresa como el ablandamiento, el control, entre otros que se encuentran asociados a su maduración (Bello *et al.*, 2005). Vargas *et al.*, (2006) muestra que los valores de pH obtenidos durante un tiempo de almacenamiento con o sin algún recubrimiento, tuvieron un rango entre 3.09 y 3.47.

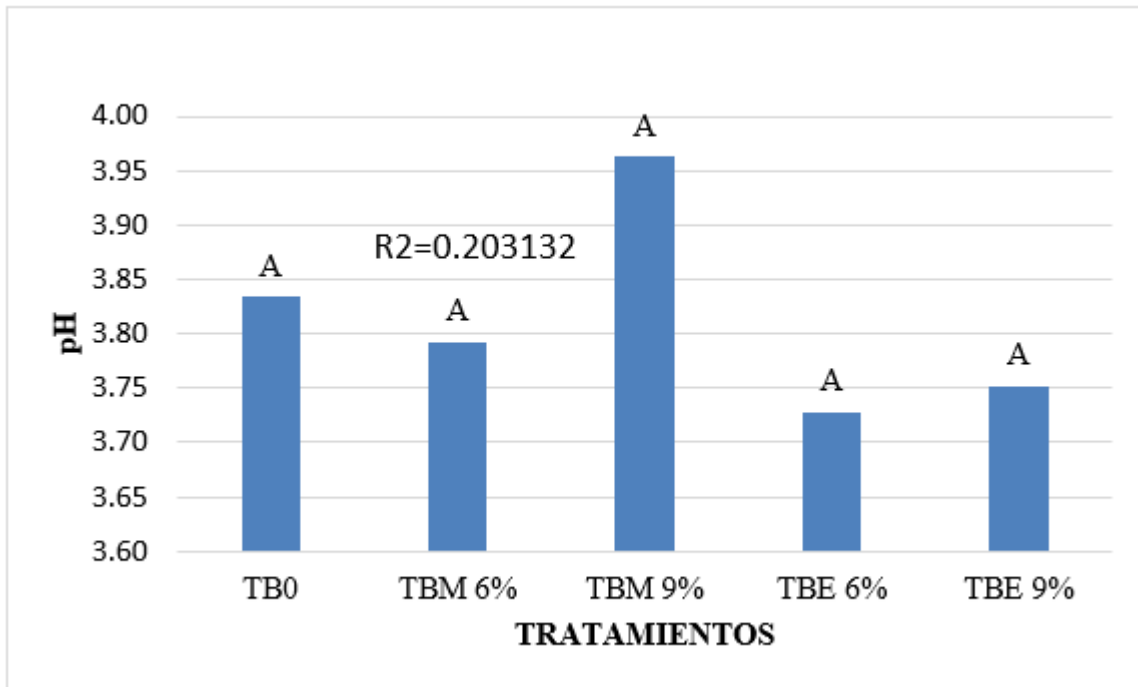


Figura 3324. Valores de pH obtenidos de los frutos de fresa con los tratamientos a base del extracto de *D. bicolor*.

(TB0): Testigo sin tratar, (TBE6%), Extracto de etanol 6%, (TBE9%): Extracto de etanol 9%, (TBM6%): Extracto de metanol 6%, (TBM9%): Extracto de metanol 9%.

6. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *D. bicolor* presentó los compuestos fenólicos: Rutina, Vainillina, Ac. Ferúlico, Ac. Cumárico, Ac. Gálico, entre otros. Es probable que estos compuestos en conjunto provocaran una inhibición del 100 % de crecimiento micelial en la prueba *in vitro* en los hongos evaluados (*Colletotrichum* spp. y *Botrytis cinerea*) a una concentración de 6 y 9 % de *D. bicolor*, mostrando una actividad antifúngica (contra el crecimiento micelial y la esporulación). Se requieren más estudios para determinar cuál o cuáles compuestos específicamente son los que tienen el efecto antifúngico sobre los hongos patógenos en esta investigación.

Se redujo el porcentaje de incidencia sobre los frutos de mango cuando se empleó el tratamiento con metanol, mientras que en frutos de fresa la aplicación de los tratamientos tuvo un efecto contrario para la misma variable.

La severidad de *Colletotrichum* spp se vio disminuida sobre los frutos de mango, comparado con el control no tratado, lo contrario se presentó sobre los frutos de fresa en los cuales la severidad fue mayor en presencia de tratamientos y *B. cinerea*.

Los resultados de pH y sólidos solubles total tuvieron comportamientos similares a los obtenidos en los testigos, tanto para frutos de mango inoculados con *Colletotrichum* spp, como para frutos de fresa inoculados con *Botrytis cinerea*,

La concentración del polifenol rutina encontrada en *D. bicolor* fue de 33.35 mg/100 g, lo que sugiere se pueda utilizar contra otros hongos patógenos de importancia en pre y postcosecha, ya que es bien conocido este compuesto por su efecto antimicrobial.

7. LITERATURA CITADA

- Abang M, Winter S, Mignouna H, Green K, Asiedu R. (2003). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease American Journal of Botany 2(12):486-496.
- Abdel-Monaim, M. F.; Abo-Elyusr K. A. M., Y Morsy, K. M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop protection, 30(2), 185-191.
- Aguilar-Alonso P., Navarro-Cruz A.R., Sánchez-Flores A.B., Meneses-Sánchez Ma de la C. y Ávila-Sosa R. (2013). Antifungal effect of plant extracts from the state of Puebla on *Colletotrichum gloeosporioides*. Ciencia Uat. 25 (1): 6-11.
- Ajiquichí Acetún Luis Edgardo. Evaluacion de extractos vegetales para el control de trps *Frankliniella occidentalis* (Thipidae; Thysanoptera) en ejote francés *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae; Fabeles) en el municipio de Sacapulas, departamento del quiche. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo en Énfasis en General Agrícola. Universidad Rafael Landívar.
- Allende, R., Juárez, C., García, R., Carillo, A., Patiño, M., y Galindo, E. (2001). *Rhodotorula minuta*, agente de control biológico potencial contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. Brazilian Phytopathology, 26 (supplement), pp. 461-462.
- Álvaro celis, Cc. M., Marco Pachón, José cardona, Wilman delgado y Luis enrique cuca. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26(1), 97-106.
- Anez, N., Sergent, E. y Leal, F. (2004). Effect of thiosulphates and paclobutrazol on "type" and length of branch in mango (*Mangifera indica* L.) 'HADEN'. *Acta Horticulturae* 645:209-215
- Aparicio M. (1998). Tratamiento de almacenamiento del mango "Manila" para mejorar su competitividad en el mercado. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería Económica Financiera y de Costos. Universidad Veracruzana.

- Arauz, L.F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact current option or integrated management. *Plant Disease* 84:600-611.
- Aular, J. Y Rodríguez Y. (2005) Características físicas y químicas, y prueba de preferencias de tres mangos criollos venezolanos. *Bioagro* 17 (3): 171-176.
- Aybastier, Ö. Isik, e., Sahin, S., Demir, C. (2013). Optimization of ultrasonicassited extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response Surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 444, 558-565.
- Badaracco P., Sortino M., Pioli R. N., (2020). Estudio de compuestos de origen vegetal con potencial acción antifúngica sobre patógenos de plantas cultivadas. *Chilean J. Agric. Anim.Sci, ex Agro-Ciencia* (2020) 36(3):244-252. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS36-23CPB30023>.
- Barrera, B. E., Gil, L. M., García, P. C. M., Durango, R. D. L. (2012). Empleo de un recubrimiento formulado con propóleos para el manejo postcosecha de frutos de papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiana). *Revistas Facultad Nacional de Agronomía*. 65(1):6497-6506.
- Bautista- Baños, S., Barrera-Necha, L.L., Bravo-Luna, L., Bermúdez-Torres, K., 2002. Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plan species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20, 8-12.
- Bello-Pérez, L., García, M., Martino, M., Solorza-Feria, J., Romero-Bastida C. A., >aritzky, N., Physicochemical and microstrutural characterization of films prepared by termal and cold gelatinization from non conventional sources of staches, *Carbohydr. Polym.*, vol.60, num 2, pp. 235-244,2005.
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda M & Velázquez D. (2005). La investigación Etnobotánica sobre plantas Medicinales: Una Revisión de sus objetivos y Enfoque Actuales. *Revista Cubana Farmacia*. Vol. 30 (8): 453-459.
- Bofelli, E. y Sirtori, G. (1991). Los 100 errores del horticultor y cómo evitarlos. Ediciones de Vecchi.

Bolívar K., Sanabria M. E., Rodríguez D., Ulicio D., Camacaro M., Cumana L. J., Crescente O., (2009) Calidad de poscosecha en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratados con extractos vegetales. Revista UDO Agrícola 9 (1): 41-50.2009

Cabrera Calderón Samantha, Rivera Rebollar Rocío. (2015). Aplicación de extracto de epazote para el control de hongos causantes de enfermedades postcosecha en papaya, jitomate y chile. Tesis: Ing. en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México.

C. C. Estanislao Gómez, A. A. C., D. G. Pérez Ishiwara E. San Martín Martínez, J. Morales López, N. Pérez Hernández and M. C. Gómez García. (2016). *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk essential oil induces apoptosis of the MDA-MB-231 breast cancer cell line *BMC Complementary and Alternative Medicine*.

Cano J, Guarro J, Gené J. (2004). *Molecular and morphological identification of Colletotrichum species of clinical interest*. P.2450-2454.

Cárdenas, O. N. C., Pérez, G. C. Zavala, S. M. A. Hernández, R. A. B., Pérez, S. G., (2007). Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspegillus flavus* Link. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 36 (3), 21-26.

Castillo Rodríguez, M. A., Revilla Vázquez, A. L., López Arellano, R., & Rivera García, P. (2005). Fundamentos de Electroforesis Capilar. México: universidad Nacional Autónoma de México.

Caudillo Contreras Diana Iveth (2016). Tesis para el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias. Conservación postcosecha de fresa utilizando recubrimientos formulados con quitosano-quínoa. Universidad Veracruzana.

Cervantes Romero, V. (2012). Perfil electroforético y cuantificación de polifenoles de extractos etanolicos de *caléndula officinalis* L. e *Hippocratea excelsa* K. Tesis para obtener el grado de Química Farmacéutico Biólogo. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Chaves, Néstor, Wang, Amy (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía costarricense*, vol. 28, núm. 2, julio-diciembre, 2004, pp.73-85. Universidad de costa rica, San José, Costa Rica.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A. Fabiano-Tixier, A. S., Albert-Vian. (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Chung K, Ker. (1999). *Germination and Appresorium in Colletotrichum gloesporioides*. *PNAS*. 23:126-132.
- CONABIO (2016) Especies, México. <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6035108>
- Conde, E. (2009). Revaloración de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Ourense. Universidad de Vigo.
- Cortes, C. J. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del Cáncer e infecciones en Tepatepec, hidalgo (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México
- Dean, R., J.A. Van-kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, j. Elias and G. D. Foster. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13 (4). 414-430.
- Domínguez, X. A., Butruile, D., Wapinsky, J. (1971). Les alcaloides principaux de *ecatropis bicolor*. *Phytochemica report*, 10, 2554-2555.
- Doss, R.P., Potter, S. W., Chastagner, G. A. & Christia, J. K. (1993). Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Enviromental Microbiology* 59, 1786-1791.
- Fernández-Acero F. J., Carbú M., El-Akhal M. R., Garrido C., González-Rodríguez V. E. & Cantoral J. M. (2011). Development of proteomics-based ugcides: new

strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. *International Journal of Molecular Science* 12, 795-816.

Fernandez-Ortuno, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri., Peres, N. A., and Schnabel, G. (2014). Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U.S. states. *Plant Disease* 98:825-833.

Fito Maupoey, P., Andrés Grau, A. M., Barat Baviera, J. M., & Albors Sorolla, A. M. (2016). Introducción al secado de alimentos por aire caliente. España: Universitat Politècnica de Valencia.

Galán Saúco, V. (2000). The mango in latin america. *Acta Horticulturae* 509:123-134

García, A. A., Ramírez, A, T., Parra, D. H., Velázquez, G., Martínez, V. M. (2000). Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Medica*, 66(3), 279-281.

Garduño García Salgado Andrea (2018). Proyecto de exportación de polvo de mango deshidratado de Toluca, Estado de México a Millán. Italia para el año 2018. Tesis Negocios Internacionales, Bilingüe. Facultad de Economía. Universidad Autónoma del Estado de México.

Govea Salas Mayela, Alejandro Zugasti Cruz, Sonia Yesenia Silva Belmares, Blanca Valdivia Urdiales, Raúl Rodríguez Herrera, Cristóbal Noé Aguilar González, Jesús Morlett Chávez (2013). Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. Volumen 5, No 9

Guarro J., et al. (1998). *Subcutaneous Hyalohyphomycosis caused by Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Clinical Microbiology*. P. 3060-3065.

Guédez, Clemencia; Cañizalez, Lis; Castillo, Carmen; Olivar, Rafael. (2009) Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 29, núm. 1, enero-junio, pp. 34-38. Sociedad Venezolana de Microbiología. Caracas, Venezuela.

- Guerrero-Rodríguez E., Solís-Gaona S., Hernández-Castillo F. D., Flores-Olivas A., Sandoval-López V., Jasso-Cantú D. (2007) Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) y *Sacc.* Y *Penicillium* (Pers.:Fr.)Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol.25 no.1
- Han X., T. Shen, H. Lou. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J. Mol Sci* 8: 950-988.
- Hamad Maha Noori (2012). Insolation of rutin from *ruta gravioens* (*rutaceae*) cultivated in iraq by precipitacion and fractional solubilization. Departamento of Pharmacognosy and Medicinal Plants, Collage of Pharmacy, University of Baghdad, Iraq.
- Hernández, A., Batista S. y Velázquez M. (2007b) Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, vol. 30(2): 119-123
- Hernández Lauzardo, Ana Niurka; Bautista Baños, Silvia; Velázquez del Valle, Miguel Gerardo. (2007) Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 30, núm. 2, abril-junio, pp.119-123. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México.
- Hernández Sánchez T. (2018). Liberación de compuestos antioxidantes de ajeno (*Artemisia absinthium*) y aranthó (*Decatropis bicolor*) por diferentes métodos de extracción. (Licenciatura), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
- INEGI. Francisco I. Madero estado de Hidalgo: cuaderno estadístico municipal 1998.
- Jarvio M. A. M. (2006). Identificación de volátiles con posible actividad insecticida durante el desarrollo precosecha de mango (*Mangifera indica* var. Manila). (Maestría) Universidad veracruzana. Xalapa, Veracruz.

- Jaimes, S.Y.Y., Moreno, V.C.A. y Cortes, P.A. (2009). Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma*. Acta biol. Colomb. 14(3):111-120.
- Jarvis, W.R. (1977). Botryotinia and Botrytis species - Taxonomy, physiology and pathogenicity. Ottawa, Research Branch, Canada Department of Agriculture.
- Kim Kim Y., et al. (1998). Indication of Ca²⁺ calmodulin signal by Hard-surface Contac Primer *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and appressoria. Journal of Bacteriology p. 5144-5150.
- Klug, W.S. y M. R. Cummings. (1999). Conceptos de Genética. Ed. Prentice Hall. 5 edic. Madrid. 814p.
- Latorre G. B.A. (2013). Control biológico de *Botrytis cinerea* en especies frutales en Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Leroux, P. (2003). Mode of action of agrochemical towards Plant pathogens. Comptes Rendus Biologies. 326:9-21.
- Lira Vargas Alma Adela (2017). Caracterización de *Colletotrichum spp*. En papaya "Maradol" de diferentes estados de la República Mexicana y su control postcosecha. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, México.
- Lira-Saldivar, R. H., Hernández-Suarez, M., Chávez- Betancurt, C., Hernández-Carrillo, F. D. y Cuellar-Villareal, E. (2007). Bioplaguicidas y control Biológico, CIQA- Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Sena Impresos, Monterrey, México. Pp. 13-29.
- Lis R. (2004). Potential synergy of Phytochemicals in cancer prevention, mechanism of action. Journal Nutr. Vol. 134 (12): 3479-3485.
- López Alonso, R., Ramírez de Lara, C., Rivero, L.; Torres Zapata, C. T., Vicente Ullán, R. (2011). Aplicación de una nueva FAE en la liberación químico-

enzimática de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha. Revista de investigaciones de la facultad de ciencias agrarias-UNR

Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco J., Insera, R. N. Lehman, P.S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R. I. & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1994 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, ditribution, biology and management. *Nematropica* 32, 149-227.

Martínez Hernández, J. J., (2015). Determinación de polifenoles presentes en extracto etanólico de gobernadora (*Larrea tridentata*) por electroforesis capilar. Tesis para obtener el grado de químico farmacéutico biólogo. México. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mercado Silva Eduardo (2012). Estado del arte del manejo pos cosecha del Mango cv "Manila". Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Mitscher, L. A., R. P. Leu, M. S. Bathala, W. N. Wu y J.L. Beal. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale ad methodology *Lloydia* 35(2):157-165

Mitscher, L.A. (1975). Antimicrobial agents from higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 9:243-282.

Montes, R., Cruz, V., Martínez, G., Sandoval, G., García, R., Zilch, S., Bravo, L., Bermúdez, K., Flores, H., y Carvajal, M. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 18(002): 125-131

Mukherjee S.K., and R. E. Litz. (2009). Introduccion. Botany and Importance. In Litz (Ed) *The Mango. Botany Production and Uses* 2nd Edition. Chapter 3. CAB International. Cambridge, MA. USA. P 1-18.

Mulkay-Vitón Tania., Paumier-Jimenez Adrián., González-Vasallo Juan (2016). Efecto de extractos de propóleo en calidad poscosecha del mango Super Haden. *Revista de Fitosanidad* 20(1) abril (2016) 5-11

- National Academy of Sciences. (1980). Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de plagas de plantas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. Pp.223
- Nickavar, B., Amin, G., Ghavamian, P., (2002). Antimicrobial activity of *Pulicaria dysenterica* L. Iran J.Pharm Res. 1:31-32.
- Nuez, F. (1995). El cultivo del Jitomate. 1era Edición. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, España. 793p.
- Páez Redondo Alberto Rafael, (2003). Tecnologías sostenibles para el manejo de las antracnosis. (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz&Sacc) en papaya (*Carica papaya* L.) y mango (*Mangifera Indica* L.). Boletín técnico No. 8 Valledupar.
- Pnachal, S. K., Poudyal, H., Arumugam, T. V., Brown, L. (2011). Rutin atenuantes metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. The Journal of Nutrition, 141(6), 1062-1069.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009). Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev. 2: 270-278.
- Pastor, N. C. (2010). Recubrimiento comestible a base de Hidroxipropil Metilcelulosa: caracterización y aplicación (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, España. España
- Patiño, O. A. (2000). Introducción a la ingeniería química: balances de masa y energía. Tomo I, México: Universidad Iberoamericana
- Pazmiño-Miranda, P., Velástegui-Espín, G.P., Curay, S., Yáñez-Yáñez, W., & Vásquez, C., (2017). Efecto de los extractos hidro-etanólicos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y cola de caballo (*Equisetum arvense* L.) sobre la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en fresa. Journal the Selva Andina Biospher, 5(1), 29-38.

- Parekh J, Jadeja S., (2005). Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. Turkish Journal Of Biology 29:203-210.
- Pérez-Salgado Juan, María Divina Ángeles-Ríos, Alejandro Arteaga-Deloya, Elías Hernández-Castro y Agustín Damián-Nava. (2003). Hongos entomopatógenos y extractos vegetales contra escama blanca (*Aulacaspis tubercularis* NEWSTEAD). En cultivo de mango en san Luis la loma, municipio de Tecpan de galeana, gro. México.
- Philogene, B.; Regnault-Roger, C. y Vincent C. (2004). Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. En: Regnault-Roger, C.; Philogene, B. y Vincent, C, (Ed). Biopesticidas de Origen Vegetal. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, pl-18.
- Plascencia- Tenorio, R. I. Olalde-Portugal, V., Mena-Violante, H. G., Ceja-Torres, L., F., Venegas-González, j., Oyoque-Salcedo, G., & Angoa-Pérez, M. V. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rizopus stolonifer*. Raximhai, 8(3)
- Quinde-Axtell, Zory; Baik, Byung-Kee (2006). Phenolic Compounds of Barley Grain and Their Implication in Food Product Discoloration. Journal of Agricultural and food Chemistry 54 (26): 9978-84.
- Rivera A. y Tong, C. (1998). Commercial Postharvest handling of Strawberries (*Fragaria* spp).
- Rodríguez Dorado, R. M. (2010). Estudio de compuestos antiulcerosos, sus metanolitos y productos de degradación por Electroforesis Capilar. Universidad de Castilla La Mancha. Tesis doctoral.
- Rodríguez, R. Z., Robaina, M.M., Jauregui, H. U., Blanco, G. G., Rodríguez, C. J. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. Revista CENIC Ciencias Químicas, 45(1), 189-147.

- Sommer, N. F., Fortlage, R. J., Mitchell, F. G. Y Maxie, E. C. (1973). Reduction of postharvest losses of strawberry fruit from grey mold. J. Amer. Soc. Hort.Sci. 98 (3): 285-288.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. (2007). Effects of extraction time, temperatura and solvento n concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, Journal Food Engineering, 81, 200-208.
- Stehman, F. B., P. Rose, B. Greer, M. Roy, M. Plante, M. Penalver, A. Jhingran, P. Eifel, F. Montz y J.T. Wharton. (2003). Innovations in the treatment of invasive cervical cancer. Cancer 98(9):2052-2065.
- Steven T. Koike & Mark Bolda, (2016)., El moho gris, o pudrición de Fresa. California Strawberry Comission Production Guideline.Watsonville, CA.
- Sumner, J. (2001). The natural history of nedicinal plants. Timber Press. Portland. 235 p.
- Sutton, B.C. (1992). Colletotrichum: Biology, pathology and control. International Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, TW9 3AF, UK. 1992 pp. 1-26 ref. 78.
- Takeda, F., Janisiewicz, W. J. (1991). Extending strawberry fruit shelf life with pyrrolnitrina. En: The Strawberry into the 21st Century. Proceedings of the Third North American Strawberry Conference, Houston, Texas. pp. 174-176.
- Tegegnea G., Pretorius J.C., Swartb W. J. (2008).Antifungal properties of *Agapantus africanus* L. extracts against plant pathogens. Crop Potection. 27: 1052-1060.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C., Quiality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings, Postharvest Biology and Thechnology, vol. 41, pp. 164-171,2006.
- Villverdu-Queralt, A., Regueiro, J., Martinez-Huelamo, M., Rinaldi Alvarenga, J. F., Leal, L. N., Lamuela-Raventos, R. M. (2014). A comprehensive study on the phenolicprofile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme,

oregano, cinnamon, cumin anbay. Food chem., 154, 299-307. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.106

Villavicencio, M. A., Pérez, E. B.E. (2002). Plantas útiles del Estado de Hidalgo. Tomo II. Pachuca, Hgo, México: UAEH

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8, 303-313.

Williamson B., Duncan G. H., Harrison J. G., Harding L.A. Elad y. & Zimand g. (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. Mycological Research 99. 1303-1310.

Williamson B., Tudzynski B., Ttudzynski P. & van Kan J. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8, 561-580.

Xoca-Orozco, L. A., Aguilera-Aguirre, S., López-García, U.M., Gutiérrez-Martínez, P., Chacón-López, 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 doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.05.e355>

Xu, D. P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, S., Li. H. B. (2017). Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. Food Chemistry, 217, 552-559.

Yoagne Maria Trapero Quintana, (2013). Farmacocinética y toxicología del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido (vainilla) en modelos in vivo. Tesis presentada en opción al grado científica de Doctor en Ciencias de la Salud. Universidad de Oriente Centro de Biofísica Médica.

Zhu, X., Wang, Q., Cao, J., Jiang, W., 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. Journal of Processing and Preservation 32, 770-784.