



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A. C.**

**CAPSAICINA, *Larrea tridentata* Y QUITOSANO PARA
EL CONTROL DE *Colletotrichum musae***

Por:

ITA Ariel Arami Echenique Martínez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ariel Arami Echenique Martínez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Alberto González León
Director de Tesis



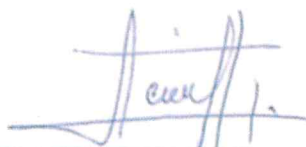
Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Asesor



Dr. Reginaldo Báez Sañudo
Asesor



M. en C. Jesús Antonio Orozco Avitia
Asesor




Dr. Daniel Nieto Ángel
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero durante la realización de esta investigación, a través de la beca otorgada.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD)

A la Dra. Gloria Yepiz por brindarme las consultas e informaciones necesarias así como su apoyo incondicional para poder ingresar al CIAD.

Al Dr. Alberto González por acogerme como su alumno en el Laboratorio de Inocuidad Agroalimentaria y brindarme su tiempo, empeño, consejos y asesoramiento a puertas abiertas en cada circunstancia.

A Laura García por ser la primera persona en acogerme en su casa sin distinción alguna.

A mis asesores: Dra. Rosalba Troncoso por su gentileza y humildad, por cada momento de consejos, asesoramiento y apoyo incondicional al proyecto, al Dr. Daniel Nieto por auxiliar y brindar su apoyo al proyecto, al Dr. Reginaldo Báez por su ímpetu y detalles de mejoramiento al proyecto y a las aseveraciones y apoyo al proyecto del M. en C. Antonio Orozco.

A todos mis compañeros de generación por su apoyo y amistad incondicional, sobre todo a: Carmen, Cristóbal, Andrés, Isabel, Efrén, Ofelia, Alicia y Rodrigo.

Al equipo de trabajo de la coordinación de programas académicos, sobre todo a: Argelia, Laura y Verónica.

DEDICATORIA

Gracias a Dios todopoderoso por sus bendiciones, sabiduría y salud para poder cumplir cada meta propuesta, sobre todo por sostenerme en cada momento de caídas y guiarme a seguir adelante.

A mi abuela, madre y hermanos: Reyna Rodríguez Guzmán, Esmerilda Martínez, Anderson Echenique, Amy Concepción y Carlos Desío.

A mis compañeros de infancia que siempre me han apoyado para superarme: Luis Martínez, Manuel Cordero, Emmanuel Valerio, Carlos Guzmán.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Postcosecha y Antracnosis en Banano	3
2.2 Compuestos Sintéticos Utilizados en Postcosecha del Banano	5
2.3 Agentes Antimicrobianos de Origen Natural	9
2.4 Capsaicina: Componente Activo de los Pimientos Picantes	12
2.5 <i>Larrea tridentata</i> : Especie Vegetal con Capacidad Inhibitoria en Hongos	14
2.6 Quitosano: Polisacárido Usado en la Agricultura Como Fungicida.....	17
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo General	22
4.2. Objetivos Específicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Materiales Biológicos y Reactivos	23
5.1.1. Tiabendazol.....	23
5.1.2. Capsaicina	23
5.1.3. <i>Larrea tridentata</i>	23
5.1.4. Quitosano.....	24
5.1.5. Extracto Etanólico de <i>Larrea tridentata</i>	24
5.2. Análisis Cualitativo de los Compuestos Volátiles Orgánicos	24
5.3. Obtención, Aislamiento e Identificación del Patógeno	25
5.4. Cultivo Monospórico	26
5.5. Patogenicidad de <i>Colletotrichum musae</i>	27
5.6. Concentración Mínima Inhibitoria	27
5.7. Preparación de los Compuestos Bioactivos.....	28

CONTENIDO (continuación)

5.8.	Ensayo Antifúngico - Crecimiento Micelial	29
5.9.	Ensayo Antifúngico - Germinación de Conidias.....	29
5.10.	Análisis Estadístico.....	30
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1.	Extracto Etanólico de <i>Larrea tridentata</i>	31
6.2.	Análisis Cualitativo de los Compuestos Volátiles Orgánicos	31
6.3.	Identificación y Patogenicidad del Fitopatógeno.....	34
6.4.	Actividad Antifúngica de los Compuestos Naturales sobre el Crecimiento Micelial.....	34
6.4.1.	Efecto de la Combinación de los Compuestos Naturales sobre el Crecimiento Micelial.....	47
6.5.	Actividad Antifúngica de los Compuestos Naturales sobre la Germinación de Conidias.....	51
VII.	CONCLUSIÓN.....	58
VIII.	RECOMENDACIONES.....	59
IX.	REFERENCIAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de Vida de <i>Colletotrichum musae</i>	6
2	Estructura de la Capsaicina	12
3	Estructura del Quitosano	18
4	Identificación Taxonómica del Arbusto de <i>Larrea tridentata</i>	32
5	Observación Macro y Microscópica (Objetivo 100X) de <i>Colletotrichum musae</i>	35
6	Desarrollo de <i>Colletotrichum musae</i> en Banano Durante 192 h de incubación	36
7	Efecto de la Capsaicina sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i>	38
8	Efecto de 400ppm de Capsaicina sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> Durante 120 h de Incubación	39
9	Efecto del Extracto Etanólico de <i>Larrea tridentata</i> sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i>	41
10	Efecto de 1,600ppm de Extracto Etanólico de <i>Larrea tridentata</i> sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> Durante 120 h de Incubación	42
11	Efecto del Quitosano sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i>	45
12	Efecto de 1,200 ppm de Quitosano sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> Durante 120 h de Incubación	46
13	Efecto de 400ppm de Capsaicina, Extracto Etanólico de <i>Larrea tridentata</i> y Quitosano Combinados sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i>	49
14	Efecto de 400ppm de Extracto Etanólico de <i>Larrea tridentata</i> (B), 400ppm de Capsaicina (C) y la Combinación de Ambos (D) sobre el Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> (A) Durante 120 h de Incubación	50
15	Germinación de Conidias Durante 4 h de Incubación (Objetivo 40x)	54
16	Observación Microscópica de las Conidias de <i>Colletotrichum musae</i> sin tratamientos (objetivo 10X)	55
17	Ruptura de Conidias y Fuga de los Constituyentes Citoplasmáticos por Efecto de los Tratamientos (Objetivo 40x)	56

LISTA DE FIGURAS (continuación)

18	Efecto de los Tratamientos sobre las Conidias de <i>Colletotrichum musae</i> . A, B, C (sin Tratamiento) y D (con Tratamientos Combinados) (Objetivo 40x)	57
----	---	----

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características Biológicas y Taxonómicas de <i>Colletotrichum musae</i>	7
2	Principales Componentes Fitoquímicos de <i>Larrea tridentata</i>	16
3	Compuestos Volátiles Orgánicos Identificados en el Extracto Etanólico de <i>Larrea tridentata</i> por Cromatografía GC-MS	33
4	Inhibición del Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> en Presencia de Capsaicina Durante 112 h de Incubación	40
5	Inhibición del Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> en Presencia de EELt Durante 112 h de Incubación	43
6	Inhibición del Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> en Presencia de Quitosano Durante 112 h de Incubación	47
7	Inhibición del Crecimiento Micelial de <i>Colletotrichum musae</i> en Presencia del Efecto Combinado de 400ppm de Capsaicina, EELt y Quitosano Durante 112 h de Incubación	48
8	Velocidad de Crecimiento de <i>Colletotrichum musae</i> en mm/h	51
9	Efecto de los Compuestos Naturales sobre la Germinación de Conidias en PDA	53
10	Efecto de la Capsaicina, EELt y Quitosano sobre la Producción de Conidias	53

RESUMEN

Colletotrichum musae es el agente causal de la antracnosis en plátanos y bananos. La enfermedad se manifiesta en postcosecha con manchas pequeñas y redondas, tornándose acuosas y de color oscuro, penetrando al fruto y deteriorando la pulpa. El control del patógeno comúnmente se lleva a cabo mediante la aplicación de compuestos sintéticos, cuya aplicación repetitiva puede causar resistencia del patógeno al ingrediente activo, aumento de los costos de producción y contaminación. Como una alternativa a esta problemática se propone el uso de compuestos bioactivos naturales (capsaicina (C), extracto etanólico de *Larrea tridentata* (EELt) y quitosano (Q)) determinando su acción individual y combinada contra el crecimiento micelial y la germinación de conidias de *C. musae*. Se obtuvo el EELt a partir de hojas frescas identificando los componentes termoestables mediante GC-MS. Se aisló y se obtuvo un cultivo monospórico de *C. musae* a partir de bananos. Mediante el ensayo antifúngico de crecimiento micelial se observó que 450ppm de Tiabendazol, 400ppm de C, 1,600ppm de EELt, 1,200ppm de Q inhiben 100, 74, 90, 89% a *C. musae* respectivamente, mientras que el efecto combinado de cada uno de los compuestos a 400ppm de EELt-C, EELt-Q, C-Q, EELt-C-Q inhiben 91, 82, 78, 84% el crecimiento micelial del patógeno. Asimismo Q retraso la fase lag a 104 h y redujo la velocidad de crecimiento de 0.89 mm/h a 0.05 mm/h. En tanto que 400ppm de C, EELt, Q y el efecto combinado a 400ppm de C-EELt, C-Q, EELt-Q y C-EELt-Q inhiben la germinación de conidias en 95, 97, 98, 100, 100, 100 y 100% respectivamente. Por lo tanto, se concluye que los compuestos bioactivos naturales pueden ser considerados como agroquímicos potenciales de bajo impacto ambiental para ser usados como fungicidas orgánicos, pero se requiere más trabajo de investigación antes de que estos compuestos tengan una aplicación comercial *in vivo*.

Palabras Clave: Antifúngico, *Larrea tridentata*, Capsaicina, Quitosano, Antracnosis, *Colletotrichum musae*.

ABSTRACT

Colletotrichum musae is the causal agent of anthracnose in plantain and bananas. The disease manifests in postharvest with small round spots, becoming watery and dark, penetrating and damaging the fruit pulp. The pathogen control are commonly performed by repetitive application of synthetic compounds generating significant pathogen resistance to the active ingredient significant, furthermore their increases cost of production and could causes serious problems of environmental pollution. As an alternative to this problem, the use of natural bioactive compounds (capsaicin (C), ethanol extract of *Larrea tridentata* (EELt) and chitosan (Q)) was studied, determining their individual and combined action against mycelial growth and conidial germination of *C. musae*. The EELt was obtained from fresh leaves; volatile thermos stable components were identified by GC-MS chromatography. A monosporic culture of *C. musae* was obtained and isolated from bananas. The antifungal assay of mycelial growth showed that 450 ppm Thiabendazole, 400 ppm of C, 1,600 ppm EELt, 1,200 ppm of Q inhibit 1,200ppm of Q 100, 74, 90, 89% to *C. musae* respectively, while the combined effect of each of the compounds to 400 ppm of EELt- C, EELt-Q, C-Q, EELt-C-Q inhibit 91, 82, 78, 84% mycelial growth of the pathogen. Q also delays to 104 h lag phase and reduced growth rate of 0.89 mm/h at 0.05 mm/h. While 400ppm of C, EELt, Q and the combined effect 400 ppm of C-EELt, C-Q, EELt-Q y C-EELt-Q inhibit the germination of conidia in 95, 97, 98, 100, 100, 100 and 100% respectively. Therefore, concluded that natural bioactive compounds can be considered as potential agricultural chemicals with low environmental impact for use as organic fungicides, but more research is needed before these compounds have a commercial application *in vivo*.

Keywords: Antifungal, *Larrea tridentata*, Capsaicin, Chitosan, Anthracnose, *Colletotrichum musae*.

I. INTRODUCCIÓN

Colletotrichum musae es el agente causal de la antracnosis en plátanos y banano, una de las principales enfermedades que afecta al fruto con gran impacto comercial, sobre todo en regiones con temperaturas y humedad relativa alta (Salazar *et al.*, 2012). En México esta enfermedad se encuentra diseminada en sus principales estados productores presentándose en todas las etapas fenológicas del cultivo (Suzuki *et al.*, 2010). Lo que conlleva a que *C. musae* cause pérdidas considerables en la floración, fructificación, cosecha y ataque destructivo del fruto en postcosecha (Aguilar *et al.*, 2014).

Los estados productores de esta inflorescencia se agrupan en tres regiones: Golfo de México (Tabasco, Veracruz y Oaxaca), Pacífico (Chiapas) y Pacífico Centro (Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Nayarit), de las cuales 95% se destina al consumo nacional. No obstante, en los últimos cinco años, la industria platanera nacional ha sufrido una reducción de la producción de hasta 10%, a pesar de haberse incrementado el área de cultivo en 5% (Beltrán *et al.*, 2009). Entre las causas de este descenso se encuentran las enfermedades causadas por microorganismos, como es el caso de *C. musae* (Canto, 2012).

El control del patógeno comúnmente se lleva a cabo mediante la aplicación de compuestos sintéticos, cuya aplicación repetitiva ha generado resistencia al ingrediente activo (Huerta *et al.*, 2009). Sin embargo, los plaguicidas de síntesis química a pesar de sus altos costos, han tenido uso indiscriminado ocasionando altos costos y afectando colateralmente al medio ambiente, la salud del operario y al consumidor final, así como de pérdidas económicas por la detención de exportaciones por la presencia de residuos de pesticidas, por arriba de los máximos permitidos (Maruris, 2008; Montoro *et al.*, 2009). Como una alternativa

a esta problemática, se ha estudiado el efecto fungistático y fungicida *in vitro* e *in vivo* de los extractos de plantas catalogadas como medicinales y aromáticas, así como el uso de otros componentes activos para inhibir el crecimiento micelial, disminuir la velocidad de crecimiento, la producción y germinación de esporas en *C. musae* (Alzate *et al.*, 2009; Taborda *et al.*, 2015).

Compuestos naturales como la capsaicina, amida de origen vegetal que ha demostrado ser antibacterial e incluso fungicida inhibe el crecimiento de diversos hongos contribuyendo a evitar el deterioro de la calidad de productos postcosecha (Moreno *et al.*, 2012). Por otra parte, las hojas de *Larrea tridentata* están cubiertas con un revestimiento resinoso que contiene una mezcla compleja de compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, saponinas y ésteres de cera indicando que más del 80% de la resina tiene un potente efecto antioxidante. Estos compuestos han demostrado tener propiedades fungicidas y bactericidas en muchos patógenos y microorganismos (Lira *et al.*, 2006). Otro compuesto natural es el quitosano, es uno de los productos más prometedores para el control de varios hongos en postcosecha, no solo por su capacidad fungicida sino por su potencial de inducción en mecanismos de defensa en los frutos ante el ataque de patógenos, como lo demuestran los trabajos de Bosquez *et al.* (2010), Gutiérrez *et al.* (2012) y Velázquez *et al.* (2012).

Por lo descrito anteriormente, surge la necesidad de realizar investigaciones utilizando alternativas naturales que demuestren viabilidad y sean eficientes controles a estos problemas fitosanitarios, las elecciones apropiadas de estos productos contribuirán al desarrollo de producciones limpias y sostenibles (Jacometti *et al.*, 2010; Montoro *et al.*, 2009; Taborda *et al.*, 2015). Por tal motivo, se propone realizar la investigación utilizando la capsaicina, extracto etanólico de *Larrea tridentata* y quitosano evaluando su efecto individual y combinado como alternativa antifúngica contra *C. musae*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Postcosecha y Antracnosis en Banano

El banano es el tercer fruto más importante del mundo y el segundo en la agricultura mexicana, además de ser considerado un producto básico y de exportación, constituyendo una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo (Arias, 2004; COVECA, 2010). Se comercializa en fresco y en menor escala deshidratado, en harina, vinagre, puré, dulce, entre otros; para su consumo en fresco los bananos deben estar intactos, sin golpes ni magulladuras de un matiz uniforme y atractivo, el color de la piel es indicativo del grado de madurez (SE, 2012). Siendo el banano un producto importante para la producción nacional y la exportación en México y otros países, es de vital importancia para su consumo fresco no presentar indicios de ataques por microorganismos en la piel, los cuales afectan y demeritan su calidad y rechazo por el consumidor, se le atribuye del 30 al 40% en pérdidas postcosecha.

De acuerdo al informe estadístico del mercado de banano de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el volumen de producción mundial del banano fue de 104,885,753 t y 105,956,705 t en los años 2012 y 2013 respectivamente. México para el año 2012 produjo 2,203,861 t y 2,127,772 t para el 2013 (FAOSTAT, 2015). Según lo reportado para este período hubo un descenso de 3.45% en la producción de banano en México, entre las cuales se atribuyen las pérdidas postcosecha y los ataques fitopatológicos.

Las regiones del Golfo de México, Pacífico y Pacífico Centro cultivan alrededor de 82,089.82 ha, estas han sufrido una reducción de la producción de hasta 10%, a pesar de haberse incrementado el área de cultivo en 5%. Entre las causas más importantes que afectan la producción de plátano y banano en México se encuentran los problemas fitopatológicos, tales como: la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), el nemátodo barrenador (*Radopholus similis*), el mal de Panamá razas 1 y 2 (*Fusarium oxysporum* y *F. cubense*), antracnosis (*Colletotrichum musae*), moko del plátano (*Ralstonia solanacearum*), mancha foliar café (*Cordana musae*) y la pudrición del pseudotallo por *Erwinia carotovora*.(Beltrán *et al.*, 2009; Canto, 2012).

En los bananos de exportación, la pudrición de la corona es la principal causa de pérdida; la sintomatología característica es el ennegrecimiento de la corona, debilitación de pedicelos y subsiguiente caída de los dedos (Alvindhia *et al.*, 2004). La pudrición de la corona es causada por un consorcio de patógenos fungosos catalogados de herida o de debilidad, que forman parte de la microflora del cultivo, de los cuales *C. musae* es uno de los principales. Este patógeno también causa manchas en el pericarpio de la fruta madura y hundimiento en el área afectada (Nuangmek *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2011).

Aunque México es un productor de una diversidad de frutas y hortalizas, no figura como uno de los principales exportadores de productos agrícolas en el mundo (García *et al.*, 2013). Dado que su producción y calidad se ve disminuida por la acción de microorganismos fitopatógenos, no logrando cumplir con los requerimientos de calidad exigidos por el mercado internacional (Avedaño *et al.*, 2007). Las subsiguientes producciones de esta inflorescencia pretenden contar con métodos y alternativas que aseguren controlar el ataque de fitopatógenos, logrando así elevar los estándares para la comercialización del banano fresco.

Colletotrichum musae (Figura 1) afecta hojas, inflorescencias y frutos, ocasionando severos daños que demeritan la calidad externa e interna de los frutos en cosecha y postcosecha, lo que causa pérdida de valor comercial y menor rendimiento por unidad de superficie (Intra *et al.*, 2011). La enfermedad inicia con manchas pequeñas y redondas, tornándose acuosas y de color oscuro cuando está en estado avanzado. Además de provocar daño superficial, la lesión también penetra en el fruto deteriorando la pulpa, provocando que los frutos se pudran totalmente y se desprendan de la planta con facilidad (Aguilar *et al.*, 2014), esto debido a que este género produce enzimas como la pectato liasa y la poligalacturonasa que degradan la pared celular vegetal rompiendo moléculas de pectina (Rodríguez *et al.*, 2009). SENASA (2010) describe la características biológicas y taxonómicas de *Colletotrichum musae* como agente causal de la antracnosis (Cuadro 1).

Colletotrichum se encuentra en la naturaleza en su estado asexual (esporas conidiales), produce unas estructuras en forma de disco subepidermal llamado acérvulos; las conidias son rectas, cilíndricas (hialianas), incoloras, unicelulares de forma ovoide con un diámetro de 12-17 x 4.5-6 μm . Estas conidias tienen una vacuola en el centro, hifas septadas, apresorio irregular pero con grandes lóbulos, cultivo color anaranjado y de crecimiento uniforme (Weir *et al.*, 2012; Zakaria *et al.*, 2009).

2.2 Compuestos Sintéticos Utilizados en Postcosecha del Banano

Comúnmente el control de la antracnosis se lleva a cabo mediante la aplicación de compuestos sintéticos como el tiabendazol, imazalil, miclobutanil, azoxistrobina, proclorax, oxiclورو de cobre, captan, ortocida, carbendazina, clorotalonil y la combinación de sulfato cúprico y cal hidratada (Huerta *et al.*, 2009). La aplicación repetitiva de estos compuestos puede causar resistencia del patógeno al ingrediente activo, mayor contaminación al medio ambiente y toxicidad al consumidor, impactando directamente la seguridad alimentaria.

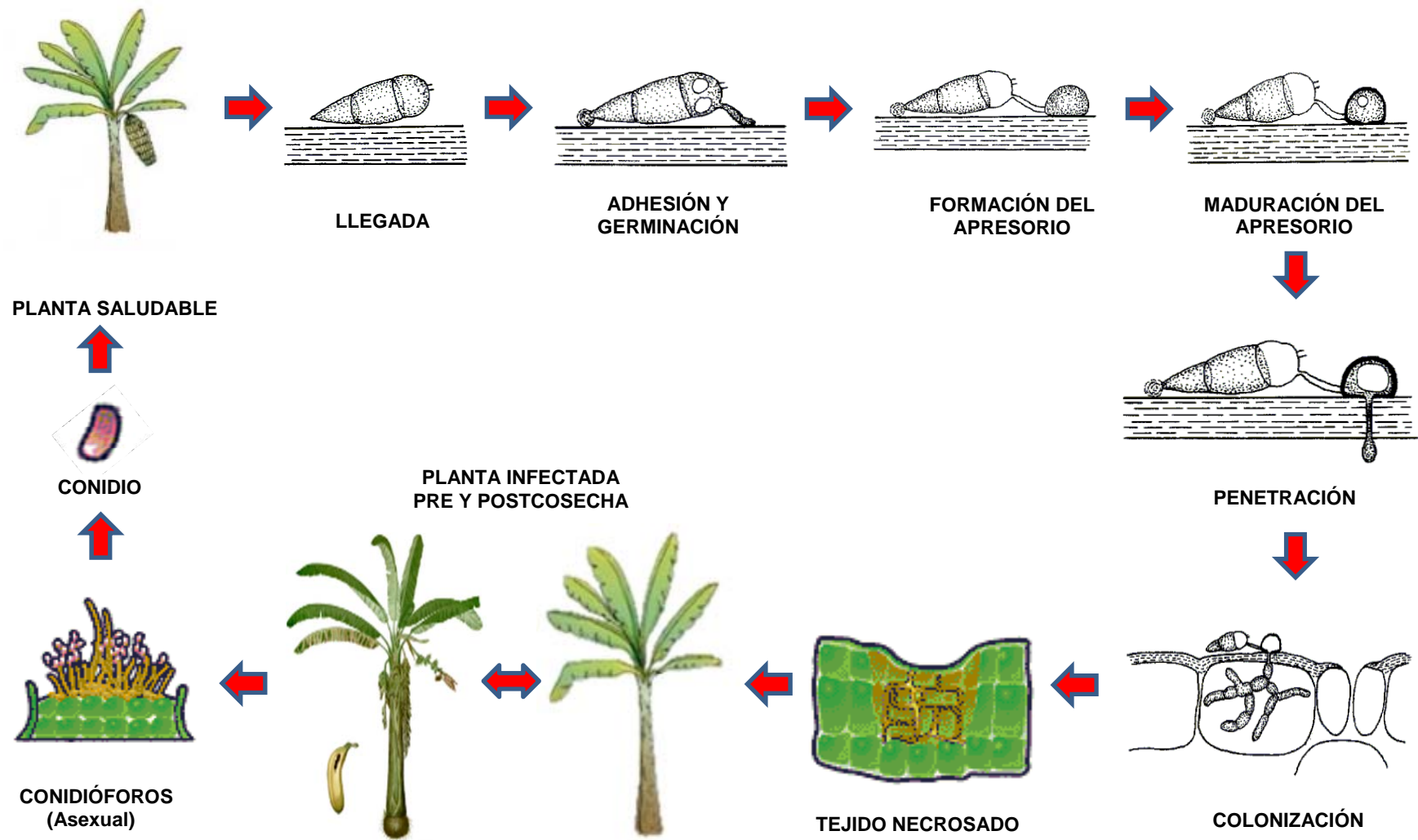


Figura 1. Ciclo de Vida de *Colletotrichum musae*.
Modificado de: (Agrios, 2005; Thines *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Características Biológicas y Taxonómicas de *Colletotrichum musae*.

<i>Colletotrichum musae</i>	
Plaga (nombre vulgar)	Antracnosis del fruto
Tipo de plaga	Hongo
Hospedero	Banano
Dominia	Eukaryota
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Sordariomycetidae
Descripción	Produce una enfermedad fúngica muy difundida en las regiones productoras de plátano y banano del mundo, se manifiesta inicialmente sobre frutos verdes que permanecen aún en la planta, pero los daños se agravan durante la postcosecha.
Síntomas y Signos	Se manifiestan sobre la cáscara de los frutos como puntos oscuros, necróticos, de forma circular, que al aumentar de tamaño se unen formando grandes áreas hundidas, que pueden llegar al estado de putrefacción; la acción agresiva de este microorganismo acelera la maduración de la fruta. Generalmente la pulpa del fruto no se ve afectada, salvo cuando se encuentra sometido a condiciones de elevada temperatura y humedad. <i>C. musae</i> no se desarrolla sobre las partes verdes del banano, sino sobre hojas y partes florales senescentes. Los conidios de <i>C. musae</i> forman infecciones quiescentes, germinando rápidamente y formando un apresorio que permanece inactivo hasta la maduración de la fruta. Los mismos son diseminados a causa de las precipitaciones dentro de plantación. Algunos insectos, presentes en las partes florales, pueden actuar también como agentes de dispersión de conidios dentro de la misma. Asimismo, los conidios presentes en las partes florales, son la principal fuente de inóculo para la infección de los frutos.
Condiciones Predisponentes	El período crítico de contaminación de los frutos ocurre entre los 20 a 40 días posteriores a la emergencia de la inflorescencia; después de dicho período, la susceptibilidad del cultivo disminuye. Las precipitaciones durante este período favorecen la generación de inóculo y la contaminación del fruto, en un rango de temperatura de 10-38°C y agua libre ó humedad relativa del 90-100%.

Fuente: (SENASA, 2010).

Estos fungicidas son considerados de sitio específico e inhiben un proceso particular en el metabolismo del patógeno. Sin embargo, el uso de fungicidas de este tipo enfrenta el problema de la selección de individuos resistentes en la población del patógeno, resultando en una disminución en la eficacia de los productos y una pérdida de esta estrategia de combate (Hernández, 2009). En un esfuerzo por cumplir con los requerimientos de calidad exigidos por el mercado internacional se hace mal uso o se abusa de plaguicidas, los cuales tienen un efecto residual en los productos agrícolas (Gutiérrez *et al.*, 2014). Aunque muchos son de sitio específico, en ocasiones se ha reportado daños en frutos y plantas, generando menores ingresos de productos hortofrutícolas y mayores costos por parte de estos fungicidas.

El posible riesgo asociado al uso de fungicidas se distingue entre dos tipos: la toxicidad aguda o la intoxicación resultante de la manipulación y aplicación de materiales tóxicos y el riesgo crónico de toxicidad o peligro para la larga exposición a pequeñas cantidades o por ingestión indirecta de cantidades residuales en los productos alimenticios, especialmente frutas y vegetales (González y Valenzuela, 2007). Sin embargo, existen varios productos que se utilizaban después de la cosecha que ya hoy en día no están permitidos, por la preocupación de su posible presencia en concentraciones residuales y efectos tóxicos en el consumidor.

El control de plagas y enfermedades dependen principalmente de la utilización de agroquímicos sintéticos, lo que ha incrementado la población de organismos fitopatógenos resistentes provocando un aumento significativo de los costos de producción y problemas graves de contaminación ambiental (Moreno *et al.*, 2011). A través del tiempo, los métodos de combate de microorganismos patógenos, han tenido innovaciones significativas, las cuales han sido motivadas principalmente por: la emergencia de nuevos patógenos, la creciente demanda de alimentos y la necesidad de evitar la contaminación del medio ambiente sin que impacte la seguridad alimentaria (Moreno *et al.*, 2012).

Tomando en cuenta estos tres factores, uno de los tratamientos que ha adquirido mayor importancia en los últimos años, es aquel que basa su acción en el uso de sustancias de origen natural (Gutiérrez *et al.*, 2014). Entre los que cabe citar los extractos acuosos, etanólicos, oleosos, entre otros, obtenidos de plantas con actividad fungicidas, herbicidas, bactericidas e insecticidas (Taborda *et al.*, 2015). Además, que los tratamientos recurrentes con tiabendazol, imazalil, captan y otros químicos (que tienen límites máximos permitidos, (MRL por sus siglas en inglés, bastante altos) han declinado su efectividad como fungicida, sin que se promueva su aplicación en la postcosecha de productos hortofrutícolas (González y Valenzuela, 2007).

2.3 Agentes Antimicrobianos de Origen Natural

Los compuestos antimicrobianos de origen natural son producidos por plantas, animales y microorganismos. En las plantas estos pueden estar presentes en diferentes órganos (semillas, hojas, flores, etc). Además, se pueden usar para controlar enfermedades en el manejo postcosecha de productos hortofrutícolas (Bobbarala *et al.*, 2009). En general, cada vez se descubren más plantas o partes de estas que contienen antimicrobianos naturales, por lo que no solo se tendrá mayor seguridad, sino mejor calidad en los alimentos (Rodríguez, 2011). Estos tipos de antimicrobianos se consideran como fuentes potencialmente seguras, utilizándose como posibles agentes fungistáticos o fungicidas.

La extracción de estos compuestos antimicrobianos con el tiempo se van desarrollando y perfeccionando atribuyéndole actividad biológica. Entre los diversos métodos de extracción de sustancias químicas de plantas medicinales y aromáticas se encuentran las técnicas de extracción con solventes químicos como son los alcoholes y la hidroddestilación, las cuales son de gran reconocimiento y de amplio uso; con gran precaución sobre la seguridad de los alimentos (Munir *et al.*, 2014). El tema de inocuidad de los alimentos con relación a la contaminación microbiana, la cual proviene, principalmente de

hongos y bacterias, representa un reto en la actualidad debido a la alta demanda de los consumidores para la sustitución de conservadores químicos (De León *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que una gran variedad de plantas contienen compuestos naturales, los cuales presentan actividad antioxidante, fungistática, así como antimicrobiana, entre otras. Estos compuestos son llamados agentes antimicrobianos y pueden ser añadidos intencionalmente al alimento o a empaques, debido a que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos aumentando así, la resistencia de la alteración de la calidad o inocuidad de un alimento (De León *et al.*, 2013).

En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de conservadores de alimentos de una manera natural y sin comprometer la salud de los consumidores; debido a que los agentes antimicrobianos han demostrado tener actividad biológica (De León *et al.*, 2013). Esta actividad, puede provenir de sus diversos componentes presentes en los extractos, los cuales pueden ser varios y no uno solo. Estos pueden ser del tipo fenólico, terpenos o tioles, probablemente esta diversidad presenta sinergismo ayudando a reducir la concentración mínima inhibitoria para el control del patógeno.

Debido a esto se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Umaña y García, 2009). Si hay algún posible efecto combinado entre los compuestos, ampliarán su espectro de cobertura en la preservación de frutas o alimentos en general, afectando los sitios activos de las enzimas y el metabolismo celular en hongos.

Este tipo de actividad en los compuestos bioactivos de plantas puede ser de carácter inherente descrito por la configuración química de los componentes,

las proporciones en las que están presentes y a las interacciones entre ellos (Delaquis *et al.*, 2002; Dorman y Deans, 2000; Marino *et al.*, 2001). Se observa un efecto aditivo cuando el efecto combinado es igual a la suma de los efectos individuales. El antagonismo se presenta cuando el efecto de uno o ambos compuestos es menor cuando se aplican juntos que cuando se aplican individualmente. La sinergia se observa cuando el efecto de las sustancias combinadas resulta mayor a la suma de los efectos producidos por cada uno de los componentes por separado (Ledezma *et al.*, 2008). Algunos estudios han concluido que los extractos y aceites esenciales concentrados tienen una mayor actividad antimicrobiana que sus componentes principales mezclados (Gill y Holley, 2006; Mourey y Canillac, 2002), lo que sugiere que los componentes de muy baja concentración son críticos para la actividad y pueden tener un efecto sinérgico o una influencia potenciadora.

Se ha determinado que los antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo; inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular; daño a la integridad de las membranas e interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales (Rodríguez, 2011). Esto ha provocado en mohos daños irreversibles en sus paredes, membranas y organelos celulares, polarizando el potencial de membrana y alterando la doble capa lipídica ocasionando un mayor flujo de electrones en la misma y alterando su homeóstasis, los cuales reducen la velocidad de crecimiento del patógeno afectando a los sitios activos de las enzimas y el metabolismo celular (Helal *et al.*, 2007; López *et al.*, 2005).

Se han publicado varios estudios científicos en los cuales se han utilizado este tipo de alternativas naturales para el control de hongos, así como lo reportan Marangon *et al.* (2008), quienes evaluaron el efecto del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*, contra *Aspergillus ochraceous*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* y *F. semitectum*, encontrando

que a una concentración de 3,000 ppm inhibe completamente el crecimiento y que 1,000 ppm alcanza una reducción superior al 90%.

Otros estudios como los de Maqbool *et al.* (2010a), determinaron el efecto del aceite de canela sobre la calidad de los bananos durante el almacenamiento a $13\pm 1^{\circ}\text{C}$, 80-90% de humedad relativa durante 28 días, mostrando diferencias significativas sobre la inhibición del crecimiento de micelios y conidias de *Colletotrichum musae*. Sus estudios mostraron que las placas modificadas en papa dextrosa agar (PDA) con aceite de canela a 4,000 ppm expresaron supresión del crecimiento de micelio y la inhibición de la germinación de esporas del 83,2%, los tratamientos de aceite de canela también retrasaron la incidencia de la enfermedad y demostraron que mantiene la calidad del banano durante el almacenamiento sin afectar sus propiedades físico-químicas.

2.4 Capsaicina: Componente Activo de los Pimientos Picantes

La capsaicina (Figura 2) es una amida y un subproducto de la vainillilamida, componente activo de los pimientos picantes (*Capsicum spp.*). Esta y otras sustancias relacionadas se denominan capsaicinoides, que además de muchas otras propiedades se ha reportado su actividad en problemas cardiovasculares, enfermedades crónicas degenerativas, estimulante, digestiva y colerético, así como su capacidad de reducir los riesgos de contraer cáncer y como bactericida (Moreno *et al.*, 2012). Este ingrediente activo el cual confiere la propiedad antibacteriana e incluso fungicida se recomienda evaluarlo de manera individual y en combinaciones enfatizando aún más sus efectos.

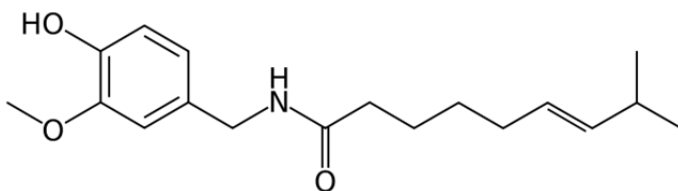


Figura 2. Estructura de la Capsaicina.

Fuente: (Cedrón, 2013).

Este compuesto orgánico nitrogenado, de naturaleza lipídica, se localiza fundamentalmente en las semillas y las membranas del género *Capsicum* siempre acompañada de otros capsaicinoides: principalmente dihidro-capsaicina y pequeñas cantidades de nordihidro-, homo-, homodihidro-, nor-, y nornorcapsaicina. Los capsaicinoides presentes en la fruta *Capsicum* son predominantemente la capsaicina y dihidrocapsaicina, representando del 80 a 90% de su concentración. La relación de la capsaicina a dihidrocapsaicina es generalmente alrededor de 1:1 y 2:1 (Govindarajan y Sathyarayanan, 1991).

En estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los capsaicinoides son metabolizados por diferentes vías, como son: la hidrólisis del enlace amida-ácido y desaminación oxidativa de la vainillilamida; la hidroxilación del anillo vanillil, posiblemente a través de epoxidación; la oxidación de un electrón del hidroxilo del anillo, formando radicales fenoxi y dímeros de capsaicinoides; y la oxidación en el carbono terminal de la cadena lateral (Surh y Lee, 1995). De tal manera Singh *et al.* (2001) reportan que los efectos de la capsaicina pueden inducir al daño oxidativo del ADN protegiéndolo contra células cancerígenas. Por lo tanto, puede evitar la reproducción de hongos fitopatógenos inhibiendo la proliferación de este tipo de células.

La capsaicina y otros compuestos capsaicinoides producen un gran número de estímulos fisiológicos tales como: efectos sobre el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular y respiratorio, así como el sistema sensorial y la termorregulación (Cázares *et al.*, 2005). Estos efectos resultan principalmente de la acción específica de capsaicinoides en las neuronas aferentes primarias del tipo C-fibra (Waizel y Morfín, 2011). Esto proporciona la justificación de su uso para el tratamiento de algunos estados dolorosos periféricos, como la artritis reumatoide y parálisis respiratoria (Surh y Lee, 1995).

La capsaicina purificada diluida cien mil veces, sigue siendo tan activa que es capaz de producir irritabilidad en membranas mucosas, es responsable de la sensación de ardor, picor e incluso dolor (Cázares *et al.*, 2005). En la mucosa oral estimula las secreciones gástricas y puede causar a su vez sangrado estomacal. Además, retarda el desarrollo de la peroxidasa y la oxidación de los ácidos grasos que son esenciales para el desarrollo bacteriano (Waizel y Morfín, 2011).

Moreno *et al.* (2012) demostraron que concentraciones de hasta 2,000 ppm de capsaicina inhibe el crecimiento micelial de *Aspergillus flavus*. Debido a su alta actividad se sospecha que puede ocasionar grandes cambios histológicos al usarlo en sinergia con otros compuestos. Se demostró que la presencia de inhibición del crecimiento de algunos hongos con capsaicina es estadísticamente igual a la inhibición presentada con el fungicida captan (Eich, 2008).

Se han introducido como repelentes para el manejo de plagas en la agricultura y se utilizan en sinergia con insecticidas sintéticos por su amplio espectro (Castillo *et al.*, 2012). Existen compuestos como CAPSIALIL 9.37 EC (capsaicina 4.685%, Alil isotiocianato 4.685%) que es un concentrado emulsionante utilizado como repelente botánico natural contra *Dysmiscooccus brevipes* (Pacheco, 2010). Actualmente, en los Estados Unidos de América, existen patentes de insecticidas y agentes de control que contienen capsaicinoides. Estudios como el de Castillo *et al.* (2012) mostraron que 29% de capsaicinoides causa el 50% de mortalidad en *Bemisia tabaci*.

2.5 *Larrea tridentata*: Especie Vegetal con Capacidad Inhibitoria en Hongos

Larrea tridentata L. (gobernadora, hediondilla o creosote), es un arbusto perteneciente a la familia Zygophyllaceae, de porte erecto, ramificado desde la base, perennifolio, de 0.6 a 3m de altura. Se distribuye abundantemente en el

norte del país en desiertos cálidos de la Península de Baja California a Tamaulipas e Hidalgo, en altitudes que van en el rango de 400 a 1800 m.s.n.m. Crece en los sitios más secos de México, en terrenos planos, laderas, lomeríos bajos (originados de materiales geológicos del cretácico superior e inferior) y en planicies aluviales (Moreno *et al.*, 2011).

Las hojas de este arbusto se cubren con un revestimiento resinoso que contiene una mezcla compleja de compuestos fenólicos, lignanos, terpenoides, flavonoides, aminoácidos, minerales, saponinas y ésteres de cera que representan el 20-35% de la hoja de peso seco (Cuadro 2) (Lira, 2003). Más del 80% de resina de *Larrea tridentata* se compone de agliconas fenólicas, el componente principal es el ácido nordihidroguaiarético, es un potente antioxidante y contiene gran efecto y propiedades fungicidas y biocida en diversos microorganismos; este atributo fitoquímico del arbusto se debe a su resina gruesa insoluble (Lira *et al.*, 2006).

Según Moreno *et al.* (2011) numerosos estudios han demostrado que los extractos de *Larrea tridentata* tienen acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia económica, cuya importancia crece al descubrir diferentes propiedades y aplicaciones en la industria de agroquímicos y farmacéutica, así como sus extractos y material vegetativo molido en polvo e incorporado.

Lira *et al.* (2006) observaron el efecto antifúngico del extracto etanólico y metanólico de *Larrea tridentata* utilizando una concentración de 4,000 ppm contra *C. coccodes* inhibiendo el crecimiento micelial en un 64.5 %. Jasso *et al.* (2007) reportaron que el extracto etanólico de este género a 4,000 ppm contra *C. gloesporoides* inhibió el crecimiento micelial en un 100%. Moreno *et al.* (2011) inhibieron el crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* y *Penicillium spp.* en 100% utilizando concentraciones de 7,000 y 5,000 ppm respectivamente, utilizando etanol como solvente.

Cuadro 2. Principales Componentes Fitoquímicos de *Larrea tridentata*.

Peso Seco (%)	Tipo	Compuesto
16 – 21	Lignanós Fenólicos	Ácido nordihidroguaiarético Ácido dihidroguaiarético Hemi-norisoguaiacin Nordihidroguaiacin
5 - 7.5	Flavonoides / Agliconas Flavonoides / Glucósidos	Apigenina / Kaempferol Chrysoeriol / Quercetina
10 – 15	Saponinas Triterpenos	Larreagenin A Ácido Larréico
0.1 – 0.2	Monoterpenos / Volátiles Hidrocarbónos 35	Alpha penene Delta - 3 - carene Limoneno
	Aromáticos	Benzaldheído Benzilacetato Benzilbutano
	Esteroides	Metil naftaleno Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos / Carbohidratos	Glucosa Sacarosa
70.1 (de tallos)	Lípidos / Ésteres de Cera Aminoácidos	Ésteres de Alquilo (C46-C56) Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspártico Glicina
15.6 mg/g 19.8 mg/100 g 13.7	Vitaminas Minerales	Caroteno Vitamina C Sodio Potasio Calcio Magnesio Hierro Azufre Fósforo

Fuente: (Lira, 2003).

Peñuelas *et al.* (2015) inhibieron el crecimiento micelial de *Aspegillus niger* y *Penicillium polonicum* en 96 y 75 % a concentraciones de 3,000ppm y 2,000ppm respectivamente, utilizando extracto etanólico de *Larrea tridentata*. Cabe resaltar que el efecto fungicida de los extractos de *Larrea tridentata* muestran consistencia, independientemente del solvente usado para la extracción (Lira, 2003).

Con base en esta información queda claro el potencial que tiene este arbusto de las zonas áridas para elaborar productos orgánicos vegetales derivados de su resina, que ayuden a promover una agricultura sostenible y de menor impacto ambiental (Lira *et al.*, 2003). Los extractos de estas plantas se caracterizan por identificar los principales compuestos bioactivos con actividad antifúngica como son el ácido nordihidroguaiarético y el ácido metil-nordihidroguaiarético (Vargas *et al.*, 2009). En Sonora este arbusto se ha esparcido en todo el territorio y el aprovechamiento del mismo solo ha quedado en remedios caseros, su incorporación en la industrialización se irá reflejando más cada día mediante investigaciones científicas que le ameriten notorios potenciales en el ámbito agrícola y farmacéutico.

2.6 Quitosano: Polisacárido Usado en la Agricultura Como Fungicida

El quitosano (Figura 3) es un biopolímero natural derivado de la N-desacetilación de la quitina, biodegradable, no tóxico, bioactivo, que se obtiene principalmente de la parte externa de crustáceos tales como cangrejos y camarones y posee actividad antifúngica contra determinados patógenos de plantas y alimentos, además de inducir los mecanismos de defensa en tejidos vegetales (Palma *et al.*, 2009). El uso del quitosano en frutas u hortalizas reduce el desarrollo de pudriciones durante el almacenamiento, además que no contamina al medio ambiente ni afecta la salud del consumidor (Martínez *et al.*, 2010). Además, ocasiona cambios físico-químicos favorables en el metabolismo de las frutas u hortalizas alargando su vida de anaquel (Bautista *et al.*, 2005).

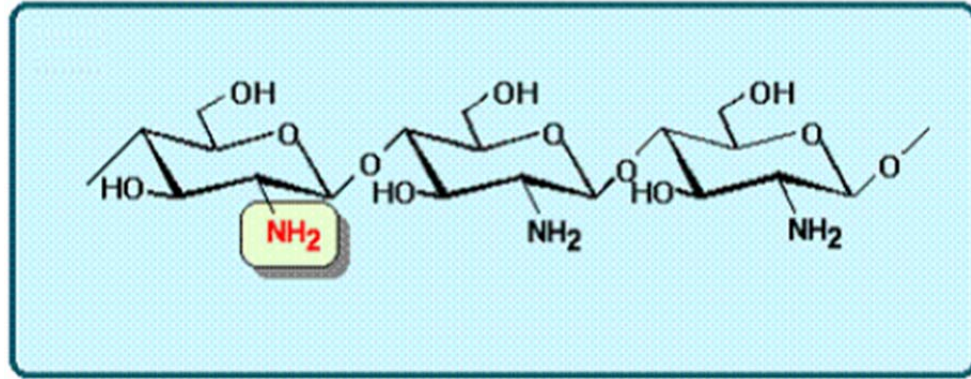


Figura 3. Estructura del Quitosano.

Fuente: (Lira *et al.*, 2006)

De igual modo según Palma *et al.* (2009) la actividad fungicida del quitosano se ha asociado desde hace mucho a su carácter policatiónico, lo que lo hace tener una capacidad de anticoagulante, humectante y quelante afectando el crecimiento micelial y produciendo daños a nivel de la membrana plasmática de las esporas, micelios e hifas.

El mecanismo de acción del quitosano está relacionado con la interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambiando la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones (Palma *et al.*, 2009). Otras posibles explicaciones de la actividad fungicida del quitosano se relacionan con la inhibición de la síntesis de algunas enzimas (peroxidasa, glucanasa, quitinasa, poligalacturonasa, pectato liasa, entre otras) presentes en los hongos o la ocurrencia de alteraciones citológicas (Velásquez, 2008).

En general, se ha observado un efecto fungicida en el rango del 1.0-1.5% de quitosano, obteniendo una reducción en el crecimiento micelial de más del 80% en *Alternaria spp.*, *Colletotrichum musae*, y *Fusarium spp.*, aislados de frutos de mango, guanábana, aguacate y plátano. Aun cuando se presenta crecimiento micelial en concentraciones al 0.01% de quitosano, en concentraciones

superiores al 0.5% se inhibe completamente la germinación y reduce notablemente la esporulación siendo muy evidente en *Alternaria alternata*, no así en *Colletotrichum musae*. Muy poca información se ha generado al respecto y de hecho no existe para frutos tropicales y subtropicales (Gutiérrez *et al.*, 2014; López *et al.*, 2012).

Muñoz *et al.* (2009), evaluaron las propiedades antifúngicas del quitosano modificado *in vitro* utilizando PDA para determinar su papel en la protección de las plantas de tomate y uva contra *Colletotrichum spp.* El quitosano inhibió significativamente el crecimiento micelial de *Colletotrichum spp.* en un 50% utilizando una concentración de 2.28% de quitosano. Después de 10 días a 24°C, el quitosano redujo significativamente el tamaño de la lesión de los frutos de tomate tratados con concentraciones de 1.0 y 2.5% de quitosano.

En ocasiones se han detectado hongos resistentes a la acción fungicida del quitosano y se han requerido altas concentraciones del mismo para controlar el hongo. Algunas cepas de *Colletotrichum* presentan una alta resistencia al quitosano, pero al combinarse con otros compuestos sinérgicamente se puede obtener un control absoluto del hongo a concentraciones bajas de quitosano (0.5%), siendo así una alternativa viable para la sanidad e inocuidad de alimentos de origen vegetal (Gutiérrez *et al.*, 2014).

Otros estudios, como los de Maqbool *et al.* (2010b) determinaron que una combinación de goma arábiga (10%) y quitosano (0.75%) en placas de PDA modificado ejercen un efecto sinérgico controlando la antracnosis causada por *Colletotrichum musae* y mejoran la vida útil del banano inhibiendo el crecimiento micelial (86%) y la germinación de esporas (80%).

Lira *et al.* (2003) observaron el efecto antifúngico del quitosano procedente del exoesqueleto de camarones utilizando una concentración de 2,000 ppm contra *Colletotrichum coccodes* inhibiendo el crecimiento micelial en un 100%. Además

observaron que combinado con *Larrea tridentata* ejerce un efecto sinérgico contra *Colletotrichum coccodes* a una concentración de 1,000 ppm de *Larrea tridentata* y 2,000 ppm de quitosano inhibiendo en un 100% el crecimiento micelial. Gutiérrez *et al.* (2012) inhibieron en un 80% a *Colletotrichum musae* y *Alternaria alternata in vitro* utilizando una concentración de 10,000 ppm de quitosano. Velázquez *et al.* (2012) inhibieron el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloesporoides* y *Alternaria alternata* en 56.16 y 50.6% respectivamente a una concentración de 10,500 ppm de quitosano *in vitro*.

III. HIPÓTESIS

La capsaicina, extracto etanólico de *Larrea tridentata* y quitosano, ejercen un efecto inhibitorio individual y sinérgico contra el crecimiento micelial y la germinación de conidias en *Colletotrichum musae*.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Evaluar la acción individual y combinada de la capsaicina, extracto etanólico de *Larrea tridentata* y quitosano, para el control del crecimiento micelial y la germinación de conidias en *Colletotrichum musae*.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtener y estandarizar el proceso de extracción del extracto etanólico de *Larrea tridentata*.
- Determinar cualitativamente por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MC) los compuestos volátiles orgánicos del extracto etanólico de *Larrea tridentata*.
- Aislar e identificar un cultivo monospórico de *Colletotrichum musae*.
- Determinar los efectos individuales y combinados de capsaicina, extracto etanólico de *Larrea tridentata* y quitosano sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidias de *Colletotrichum musae*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales Biológicos y Reactivos

5.1.1. Tiabendazol

Se obtuvo el compuesto activo (99% de pureza) ya procesado de Sigma-Aldrich, USA. Se utilizó como control positivo, este fungicida es recomendado para el control de enfermedades postcosecha como: la pudrición de la corona, pudrición del fruto y la antracnosis en el cultivo de plátano y banano (400-800 ppm aplicados en tinas o para almacenamiento) (Rosenstein, 2004).

5.1.2. Capsaicina

Se obtuvo el compuesto activo (natural: 65% Capsaicina, 35% dihidrocapsaicina) ya procesado de Sigma-Aldrich, No. 360376, USA.

5.1.3. *Larrea tridentata*

Se recolectaron las hojas apicales e intermedias de arbustos (Lira *et al.*, 2006) localizados en el Rancho Milpillas (29°55'00.1"N 111°28'58.7"W), Pitiquito, Sonora, México. El 26 de Junio del 2015. Se trasladaron en bolsas de telas aireadas al Laboratorio de Inocuidad Agroalimentaria del Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) y otra porción de las muestras se llevó a la Universidad de Sonora para su identificación taxonómica por el Ing. José Jesús Sánchez Escalante, encargado del Herbario de esta Universidad. Las hojas frescas se almacenaron en frascos de vidrio con sus respectivas tapas en un lugar seco a temperatura ambiente $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Aguilar *et al.*, 2014).

5.1.4. Quitosano

Se obtuvo el compuesto activo ya procesado procedente de Sigma-Aldrich, No. 417963, USA. A partir de exoesqueleto de camarones, grado práctico, solubilidad de 1% de solución en 1% de ácido acético, viscosidad >200 centipoise, forma física $\geq 75\%$ desacetilación.

5.1.5. Extracto Etanólico de *Larrea tridentata*

Las hojas frescas de *Larrea tridentata* se colocaron en un frasco de vidrio estéril con tapa en una proporción de 20 g de hojas y 140 mL de alcohol etílico absoluto (FagaLab, México). Los frascos cerrados se colocaron en un baño de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner, Branson 3510 DTH, USA) por 30 min y posteriormente se mantuvieron en agitación mediante un Shaker (Bench Top Environ Shaker, Lab-Line's 3527, USA) durante 24 h a 40 °C y 200 rpm, sometiéndolo de nuevo en un baño de ultrasonido por 30 min. Las muestras se filtraron mediante un buchner y papel Whatman número 1, se eliminó el solvente con un rotavapor (Laborota, 4010 digital; Vacuum Pump KNF Laboport, N820.3FTP; impco B-92; USA), colocando el extracto etanólico de *L. tridentata* (EELt) en cajas Petri de vidrio tapadas. La muestra se llevó a un horno de vacío (VWR Vacuum, Oven 1400E; Welch Vacuum Rotary Pump 8912; USA) durante 24 h a 44 ± 2 °C y 23 ± 2 mmHg, antes de su almacenamiento a -20 ± 2 °C. El EELt se pasó por una corriente de nitrógeno presurizado durante 3 min para eliminar posibles residuos de etanol y evitar oxidación (Aguilar *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2011).

5.2. Análisis Cualitativo de los Compuestos Volátiles Orgánicos

Para la determinación de los compuestos del EELt se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masa, tampa de iones (GC-MS) (Varian 3900, Saturno 2100T; Varian CP-8410; Holanda) utilizando la técnica de ionización de electrones (IE 70 eV) para la generación de iones positivos. La separación de los compuestos del EELt, se realizó utilizando una columna capilar: DB-5MS (30

m x 0,25 mm x 0,25 m). La temperatura del inyector fue 250°C, con un modo de inyección dividida en una relación 1:50; con un volumen de inyección de 1 µL a una concentración de 275 ppm del EELt, utilizando Helio como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La separación en la columna se realizó usando una rampa de temperatura iniciando a 50°C sostenida por 10 min, posteriormente se calentó a 290°C sosteniéndola por 10 min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250°C, se monitoreo en un intervalo de masas de 40-400 m/z, la temperatura de ionización fue de 250°C. La identificación de los picos se realizó por tiempos de retención y los espectros de masas se compararon con la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) (Ortega *et al.*, 2011).

5.3. Obtención, Aislamiento e Identificación del Patógeno

El laboratorio de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Unidad Texcoco proporcionó una cepa de *Colletotrichum musae* previamente identificada por sus características morfológicas. *Colletotrichum musae* se aisló a partir de plátanos que presentaron sintomatología de antracnosis en el mercado local de la ciudad de México. Se procedió a realizar la siembra, aislamiento y purificación del patógeno en el Laboratorio de Fitosanidad del COLPOS, sumergiendo los plátanos en una solución de 2 L de agua destilada con hipoclorito de cloro al 2% durante 10 min. Las muestras se limpiaron con agua destilada consecutivamente y llevadas a una cámara de flujo laminar estéril (Purifier Class II Biosafety Cabinet, USA) donde se procedió a realizarles cortes (2.5 mm) en las áreas infectadas con un bisturí estéril. Los cortes fueron sembradas en placas Petri con papa dextrosa agar (PDA) solidificadas (preparadas según las indicaciones del proveedor; Becton Dickinson, USA) y se incubaron (Yamato DX600, Drying Oven, USA) a 27±1°C, hasta observar que el crecimiento del micelio presentaran un desarrollo completo en las cajas Petri.

Posteriormente se tomó una muestra de las conidias raspando con asa estéril, la alícuota se colocó en un porta-objeto donde se había adicionado una gota de azul de algodón y se realizó un movimiento circular levemente para separar esporas y micelios. La muestra se cubrió con un cubre-objeto y se observó mediante un microscopio de visión plana (Zeiss Primo Star, USA) a 100X. Las colonias con mayor coincidencia morfológica a la reportada por Zakaria *et al.* (2009), SENASA (2010), Abd *et al.* (2010) y Weir *et al.* (2012) fueron sembradas para su aislamiento y posterior purificación (Moreno *et al.*, 2011). Además, se procedió a realizar los postulados de Koch para determinar si el patógeno aislado coincide con la sintomatología en un hospedero, a partir de bananos en estado de madurez comercial No.5.

5.4. Cultivo Monospórico

Para establecer una colección confiable, es necesario partir de aislamientos monospóricos que garanticen la autenticidad y pureza de los mismos y de los datos que se consigan. Los aislamientos monospóricos pueden ser por colonia o por punta de hifa (Cañedo y Ames, 2004). Utilizando la técnica de colonias se procedió a preparar una solución de Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA) al 0.1% de la formulación comercial, se hizo una dilución al 10%. Se tomó 10 mL de Tween 80 y se agregó en 90 mL de agua destilada a pH 6 ajustado por un potenciómetro (Thermo Orion 420, USA). Para la preparación del Tween al 0.1%, se tomó 1 mL de la solución al 10% y se agregó en 99 mL de agua destilada a pH 6. Esta solución se esterilizó en la autoclave (Tuttnauer, 2340M, USA) a 121°C por 15 min, luego se tomó una alícuota del hongo con siete días de cultivo y se adicionó en un eppendorf con 1 mL de la solución de Tween al 0.1 % y se agitó ligeramente para que se separen todas las esporas.

La suspensión de esporas se cargó en un hematocitómetro (Bright-Line, Sigma-Aldrich, USA) con la ayuda de una pipeta Pasteur y se procedió a contar el número de esporas bajo el microscopio de visión plana en la cámara de

Neubauer. Se hicieron las diluciones seriadas (100 μ L de la suspensión y 900 μ L de agua estéril, pH 6) necesarias, hasta obtener una suspensión a una concentración de 100-200 esporas por 1 mL con una suspensión final de 1×10^4 esporas/mL (Plascencia *et al.*, 2003). A partir de la suspensión de 1×10^4 esporas/mL se sembraron 20 μ L (200 esporas) en una placa con medio PDA y se distribuyó con una espátula de Drigalski y se le colocó un cubre-objeto estéril en la superficie del PDA dentro de la cámara de flujo laminar, luego se observó al microscopio de visión plana. Se dejó incubar a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por espacio de 24-72 h a fin de cortar con un bisturí estéril una espora en formación y transferirla a otra placa con PDA. La idea es que el crecimiento del hongo al cortarse provenga de un solo conidio a fin de conservar la pureza genética del hongo (Cañedo y Ames, 2004). La secuenciación molecular estuvo a cargo de los investigadores de la compañía Macrogen en Corea del Sur.

5.5. Patogenicidad de *Colletotrichum musae*

Para demostrar que el microorganismo aislado causa la enfermedad de la antracnosis se realizó la prueba de patogenicidad en un hospedero sano, confirmado mediante los postulados de Koch. Se desinfectaron los bananos sumergiéndolos en una solución de 2 L de agua destilada con hipoclorito de cloro al 2% durante 10 min. Las muestras se limpiaron con agua destilada consecutivamente y llevadas a una cámara de flujo laminar estéril (Purifier Class II Biosafety Cabinet, USA). Con un asa bacteriológica de punta fina estéril se realizaron tres hoyos al inicio, mitad y final de cada banano y se adicionó una suspensión de 5×10^6 esporas/mL mediante una micro pipeta, se colocaron en cajas crisper hasta observar el desarrollo de la enfermedad.

5.6. Concentración Mínima Inhibitoria

La actividad biológica de los compuestos bioactivos naturales se determinó por Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de acuerdo a la metodología descrita

por De León et al. (2013) probando 7 diferentes concentraciones (mg/L) en cultivos de PDA, utilizando como referencia la CMI (450 ppm) del Tiabendazol se prepararon las siguientes concentraciones de los compuestos: 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 ppm determinando la CMI con la ausencia del crecimiento micelial y la germinación de conidias del hongo (Moreno *et al.*, 2012); será la concentración más baja resultante en una disminución significativa en la viabilidad del inóculo (>90%) (Cosentino *et al.*, 1999). Además se determinó el efecto de los solventes: alcohol etílico absoluto (AEA) (5 mg/L), ácido acético glacial (AAG) (2.5 mg/L).

5.7. Preparación de los Compuestos Bioactivos

La evaluación de la actividad se realizó mediante la técnica dilución del extracto en agar propuesta por Moreno et al. (2011) que consiste en hacer una mezcla homogénea de los extractos. Se pesaron las diferentes proporciones del EELt y C en frascos utilizando una balanza analítica (OHAUS, AV264C, USA) consecutivamente se le adiciono AEA y se procedió a realizar ligeras agitaciones circulares hasta crear una mezcla homogénea. Posteriormente se adicionó el PDA (40-50°C) y se repartieron las diluciones en proporción de 20 mL en placas Petri. En el caso del quitosano el solvente utilizado fue una solución acuosa de AAG (50 mL de agua estéril (pH 6) y 2.5 mg de ácido acético glacial) y se colocó en una placa de agitación por 12 h a 30°C y 300 rpm (Corning, PC-620D, USA). Al transcurrir este tiempo se procedió a ajustar el pH con hidróxido de sodio al 1N mediante un potenciómetro y luego se adiciono el PDA (40-50°C) hasta repartirlas en proporción de 20 mL en placas Petri, la solidificación de las placas se realizó en una cámara de flujo laminar a 30±5°C. De igual forma se prepararon cada uno de los controles (PDA + Inoculo; PDA + Alcohol etílico absoluto + Inoculo; PDA + Ácido acético glacial + Inoculo).

5.8. Ensayo Antifúngico - Crecimiento Micelial

Para la evaluación de la actividad antifúngica del crecimiento micelial se utilizó un disco de 5.5 mm de un cultivo de 168 h en PDA y se colocó en el centro de las placas Petri con PDA que contenía los diferentes tratamientos de los compuestos bioactivos y los controles. Las placas inoculadas se incubaron (Felisa, FE-147I, México) a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, se procedió a medir el diámetro del crecimiento micelial cada 8 h con un vernier (Mitutoyo, CD6"ASX, Japón) y la ayuda de un contador de colonias (Leica, 3327, USA) hasta observar el desarrollo completo en el control del inóculo en PDA, determinando posteriormente el porcentaje de inhibición del crecimiento. Los bioensayos se realizaron por triplicado y los resultados se calcularon tomando en cuenta que la inhibición es el inverso al crecimiento, mediante la siguiente fórmula (Maqbool *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2011; Setu *et al.*, 2014):

- **% de crecimiento** = $\frac{\text{Diámetro del crecimiento del hongo en el tratamiento}}{\text{Diámetro del control negativo}} * 100$

- **% de inhibición** = $100 - \% \text{ de crecimiento}$

5.9. Ensayo Antifúngico - Germinación de Conidias

Para la evaluación de la actividad antifúngica sobre la germinación de conidias, se tomó un cultivo de 168 h y se le adicionó 10 mL de Tween 80 al 0.1%, se raspó la superficie con una asa estéril (teniendo en cuenta de no penetrar el agar). La solución se filtró utilizando papel Whatman número 1 y un embudo unido a un microtubo de 15 mL. Se procedió a realizar diluciones seriadas (100 μL del alícuota y 900 μL de agua estéril pH 6) ajustando una suspensión de 5×10^6 esporas/mL de la suspensión madre en la cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio de visión plana Zeiss. Se adicionó un volumen de 10 μL de la suspensión final en un portaobjeto cóncavo el cual ya tenía

incorporado 100 μ L de PDA con los tratamientos y los controles. Se cubrieron con un cubreobjeto y se colocaron en placas Petri dejándolas incubar por 4h a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se observó la formación del tubo germinativo en las conidias en un microscopio digital de visión plana (BARSKA, BC-376, China) con un objetivo del lente a 10X y un filtro verde. El porcentaje de germinación de conidias se determinó seleccionando 100 conidias al azar dividiendo el pocillo del portaobjeto en cuatro cuadrantes, se tomó una foto por cuadrante seleccionando 25 conidias por pocillo por triplicado, considerando la germinación de una conidia cuando la longitud de su tubo germinativo alcanzara la mitad del tamaño de la longitud de la conidia. El porcentaje de germinación de las conidias se calculó con la siguiente fórmula (Cañedo y Ames, 2004; Plascencia *et al.*, 2003; Setu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010):

- **Germinación de conidias (%)** = conidias germinadas (No.) / total de conidias (No.) x 100.

5.10. Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) donde se analizó el efecto de compuestos bioactivos naturales individualmente y combinado contra *Colletotrichum musae*. Las variables independientes fueron las concentraciones de los compuestos bioactivos naturales y los controles y las variables dependientes fueron el crecimiento micelial y la germinación de conidias. Se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kurtosis y Omnibus, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una sola vía. Al detectar diferencias significativas se comparó mediante el método de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer, se correlacionaron los datos utilizando una pendiente lineal para las curvas de crecimiento y sus respectivos coeficientes de determinación. El análisis se realizó por triplicado, con una confiabilidad del 95%, utilizando el paquete estadístico de NCSS 2007/GESS 2006.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracto Etanólico de *Larrea tridentata*

Se obtuvo y estandarizó el extracto etanólico de *Larrea tridentata* siguiendo diferentes técnicas como lo mencionan Lira *et al.* (2006). Moreno *et al.* (2011). Jasso *et al.* (2007) y Osorio *et al.* (2010), con algunas modificaciones. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento del hongo al utilizar el extracto etanólico preparado de distintas formas, utilizando la hoja en su estado natural o deshidratada, triturada o entera, ultrasónica, agitada o la cantidad de días en contacto con el solvente. En la figura 4 se presenta una imagen de la planta de *Larrea tridentata*, así como información relativa a la identificación taxonómica del arbusto.

6.2. Análisis Cualitativo de los Compuestos Volátiles Orgánicos

Se identificaron 96 compuestos termoestables, de los cuales se presentan 42 para fines de estudio; de estos, 9 presentaron las mayores áreas de pico en los tiempos de retención de: 32.0, 35.0, 44.2, 45.1, 51.3, 52.6, 54.5, 56.2, 57.9 min (Cuadro 3). Tal y como es el caso del Etilparabeno identificado en el tiempo de retención 32.0 min, es un antifúngico y aditivo alimentario ya reportado por Moscoso *et al.* (2013). En el tiempo de retención 44.2 min se identificó el Fitol, utilizado en la industria farmacéutica y obtenido por García *et al.* (2010a) entre los metabolitos secundarios de *Larrea tridentata* y el compuesto que presentó el pico de mayor altura fue el 4-Metilcumarina en el tiempo de retención 52.6 min, se le reconoce por su alta selectividad para los tioles de proteínas (SCBT, 2016), además que Domingo y López (2003) mencionan que el mecanismo de acción de las cumarinas es mediante la interacción con el ADN reconociéndolos



HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD DE SONORA (USON)

22657

ZYGOPHYLLACEAE

***Larrea tridentata* (Sessé & Moc. ex DC.) Coville**

Determinado por: J.J. Sánchez Escalante, 2015

Arbusto, pocas flores, frutos.

Municipio de Pitiquito, Sonora. Rancho Milpillas, a 8.5 Km (línea recta) al norte del poblado de Félix Gómez 29°55'0.1 N, 111°28'58.7 W; 755 m.s.n.m.

15 Noviembre 2015

SN Alberto González León

Figura 4. Identificación Taxonómica del Arbusto de *Larrea tridentata*.

Cuadro 3. Compuestos Volátiles Orgánicos Identificados en el Extracto Etanólico de *Larrea tridentata* por Cromatografía GC-MS.

No.	Tiempo de Retención	Nombre del Compuesto	CAS	Ion molecular m/z	Iones Principales			
1	4.146	Benzoyl bromide	618-32-6	184	105	77	51	
2	4.352	1-Butanol, 2-methyl	1565-80-6	88	41	57	56	
3	5.01	Diethylcyanamide	617-83-4	98	55	83	98	
4	5.628	Butanoic acid, ethyl éster	105-54-4	116	71	43	29	
5	15.359	Pentanoic acid, ethyl éster	25415-67-2	144	88	43	101	
6	15.862	Benzene, 1,3-dichloro	541-73-1	146	146	148	111	
7	21.946	Bornyl chloride	464-41-5	172	95	93	121	
8	24.189	Benzeneacetic acid, ethyl éster	101-97-3	164	91	164	92	
9	25.465	Acetic acid, éster	92618-89-8	196	95	93	43	
10	25.703	Ketone, methyl nonyl	112-12-9	170	43	58	71	
11	26.219	2-Methoxy-4-vinylphenol	7786-61-0	150	135	150	107	
12	30.191	2-Butylphenol	3180-09-4	150	107	150	108	
13	31.161	2-Tridecanone	593-08-8	198	58	43	59	
14	32.018	Ethylparaben	120-47-8	166	121	166	138	
15	33.45	1,4-Benzenediol	1948-33-0	166	151	123	166	
16	34.095	Agarospírol	1460-73-7	222	161	59	204	
17	34.934	Tyramide, N-formyl	13062-78-7	165	120	107	77	
18	35.064	2-Naphthalenemethanol	473-15-4	222	59	149	43	
19	35.269	1H-Benzocyclohepten-7-ol	6892-80-4	222	151	95	41	
20	37.106	Hexanoic acid, allyl éster	123-68-2	156	99	43	71	
21	37.426	2,6-Dimethylbenzaldehyde	1123-56-4	134	133	134	105	
22	37.507	Benzyl Benzoate	120-51-4	212	105	91	77	
23	38.021	Myristic acid, ethyl éster	124-06-1	256	88	101	41	
24	41.301	Dibutyl phthalate	84-74-2	278	149	150	41	
25	42.096	Hexadecanoic acid, ethyl éster	628-97-7	284	88	101	55	
26	43.665	2-Propenoic acid	537-98-4	194	194	179	133	
27	44.262	Phytol	150-86-7	296	71	57	43	
28	45.192	Linoleic acid ethyl éster	544-35-4	308	67	81	41	
29	45.934	2-Propenoic acid	1135-24-6	194	194	179	133	
30	47.024	4-methoxycinnamic acid	537-73-5	194	194	179	133	
31	49.353	Octadecyl vinyl ether	930-02-9	296	57	43	83	
32	51.389	1,2-Benzenedicarboxylic acid, éster	27554-26-3	390	149	167	57	
33	51.807	Ethylmorphine	76-58-4	313	313	162	284	
34	52.212	Dicarboxylic acid	4968-37-0	376	91	41	283	
35	52.683	7-Dimethylamino-4-methylcoumarin-3	55145-14-7	298	298	270	299	
36	52.921	3-propoxyphenyl	294892-50-5	341	341	121	299	
37	53.033	6-Methoxy-3-methylbenzofuran	29040-52-6	162	147	162	91	
38	53.287	3,7-dimethyl-6-nitro-9-phenylimino	349498-52-8	329	329	330	282	
39	54.532	3,4-dimethoxybenzylidene	328282-41-3	329	329	330	314	
40	54.833	Dibenzylbutyrolactone	34444-37-6	374	137	138	122	
41	56.241	Androstane-3,17-dione	3091-35-8	346	315	316	260	
42	57.999	Orthobenzoic acid, triethyl éster	1663-61-2	224	179	123	105	

como antivirales. Para fines de este estudio se muestran compuestos más termoestables utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y agroquímica con actividad fungicida, bactericida y biocida, debido a que otros compuestos como son: el ácido nordihidroguaiarético y el ácido metil-nordihidroguaiarético se obtienen mediante cromatografía líquida de alta eficacia por tener mayor afinidad a soluciones acuosas.

6.3. Identificación y Patogenicidad del Fitopatógeno

Se determinaron las características macro y microscópica del micro-cultivo donde se observa la morfología del hongo fitopatógeno coincidiendo el color del cultivo (anaranjado), crecimiento uniforme, hifas septadas y esporas conidiales unicelulares (15x5 μm), reportadas por Zakaria *et al.* (2009), SENASA (2010), Abd *et al.* (2010) y Weir *et al.* (2012) tal y como se observa en la Figura 5. Estas características corresponden al hongo *Colletotrichum musae*. Asimismo se demostró la patogenicidad del hongo en un huésped sano (banano) cumpliendo los postulados de Koch. Los síntomas de la infección se muestran en la Figura 6, estos síntomas coinciden con lo reportado por Anccota *et al.* (2015). En cuanto a la secuenciación molecular del hongo fitopatógeno, se confirmó con un 99% de identidad que el organismo secuenciado es *Colletotrichum musae* tal y como lo describen Faedda *et al.* (2011) y registrado en el GenBank con el código JN121212.1.

6.4. Actividad Antifúngica de los Compuestos Naturales sobre el Crecimiento

Micelial

Durante el ensayo antifúngico del crecimiento micelial se observó que el alcohol etílico absoluto (AEA) utilizado para disolver e incorporar la capsaicina al medio de cultivo no presentó diferencias significativas con el crecimiento del hongo en ausencia del solvente ($p < 0.05$), por lo que al correlacionar los puntos de crecimiento del hongo con los del solvente utilizado no ejerció efecto sobre la

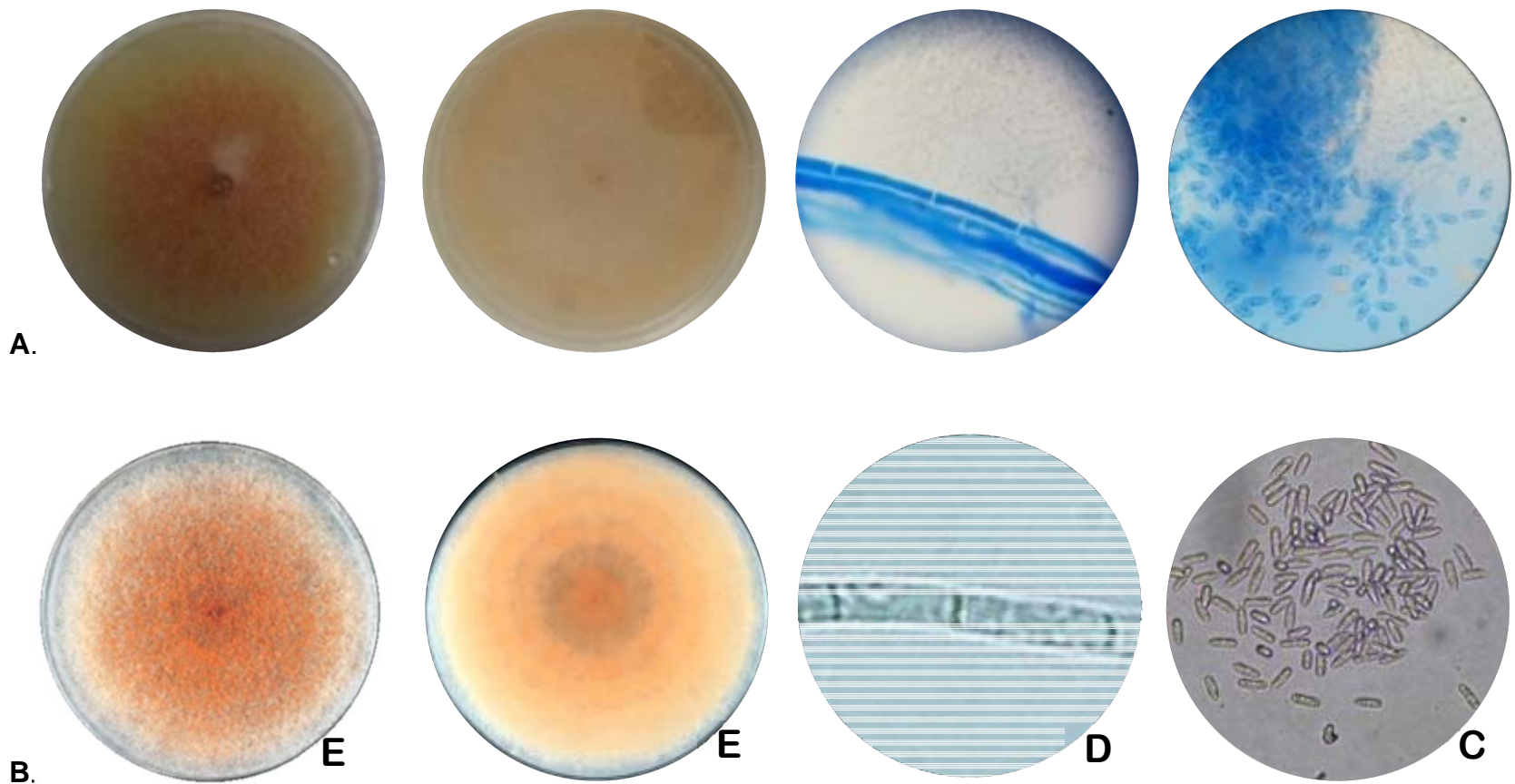


Figura 5. Observación Macro y Microscópica (Objetivo 100X) de *Colletotrichum musae*. A. Imágenes reportadas del presente estudio. B. Imágenes y características reportadas por: Zakaria *et al.* (2009) (C), Abd *et al.* (2010) (D) y Weir *et al.* (2012) (E).

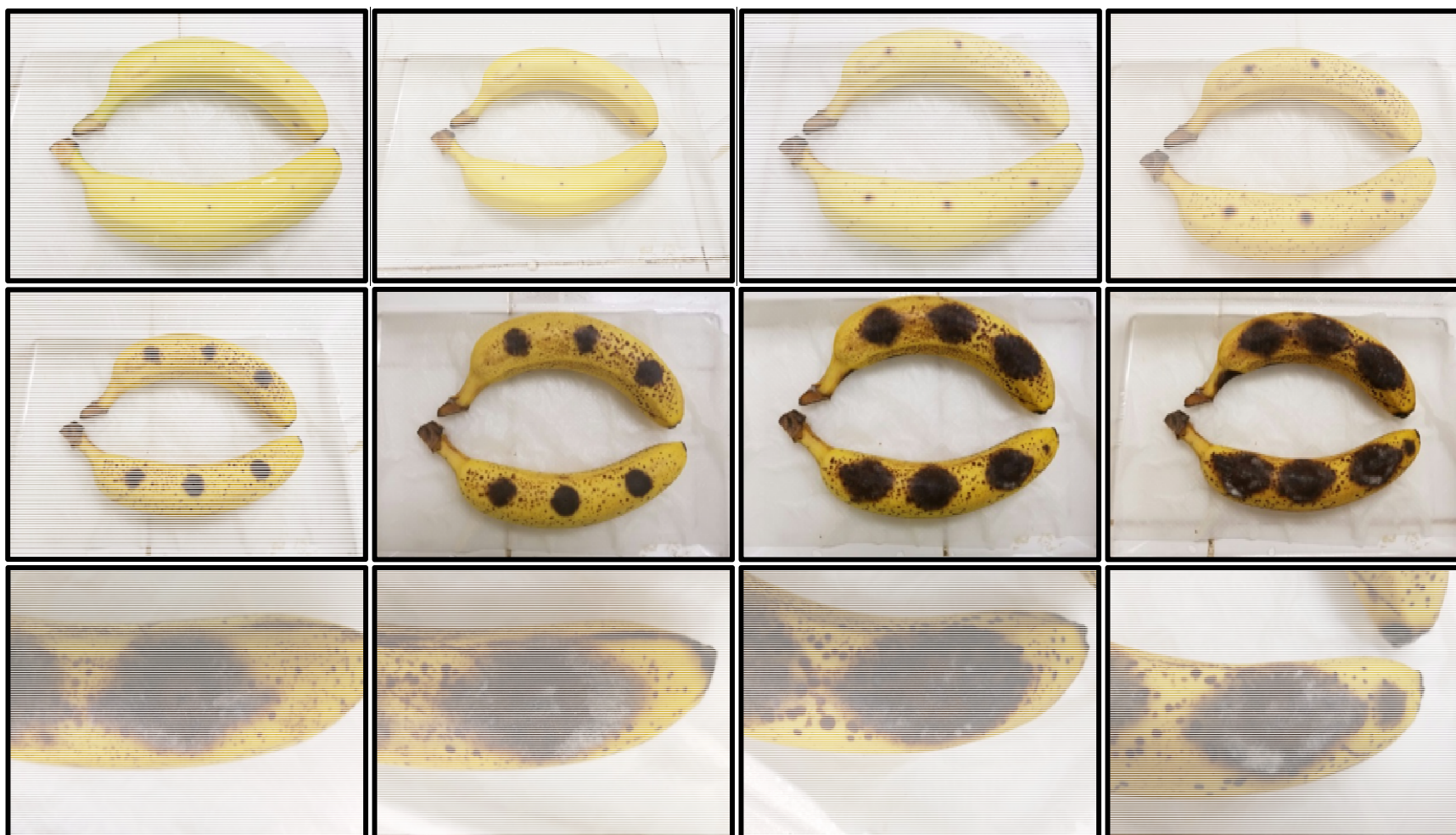
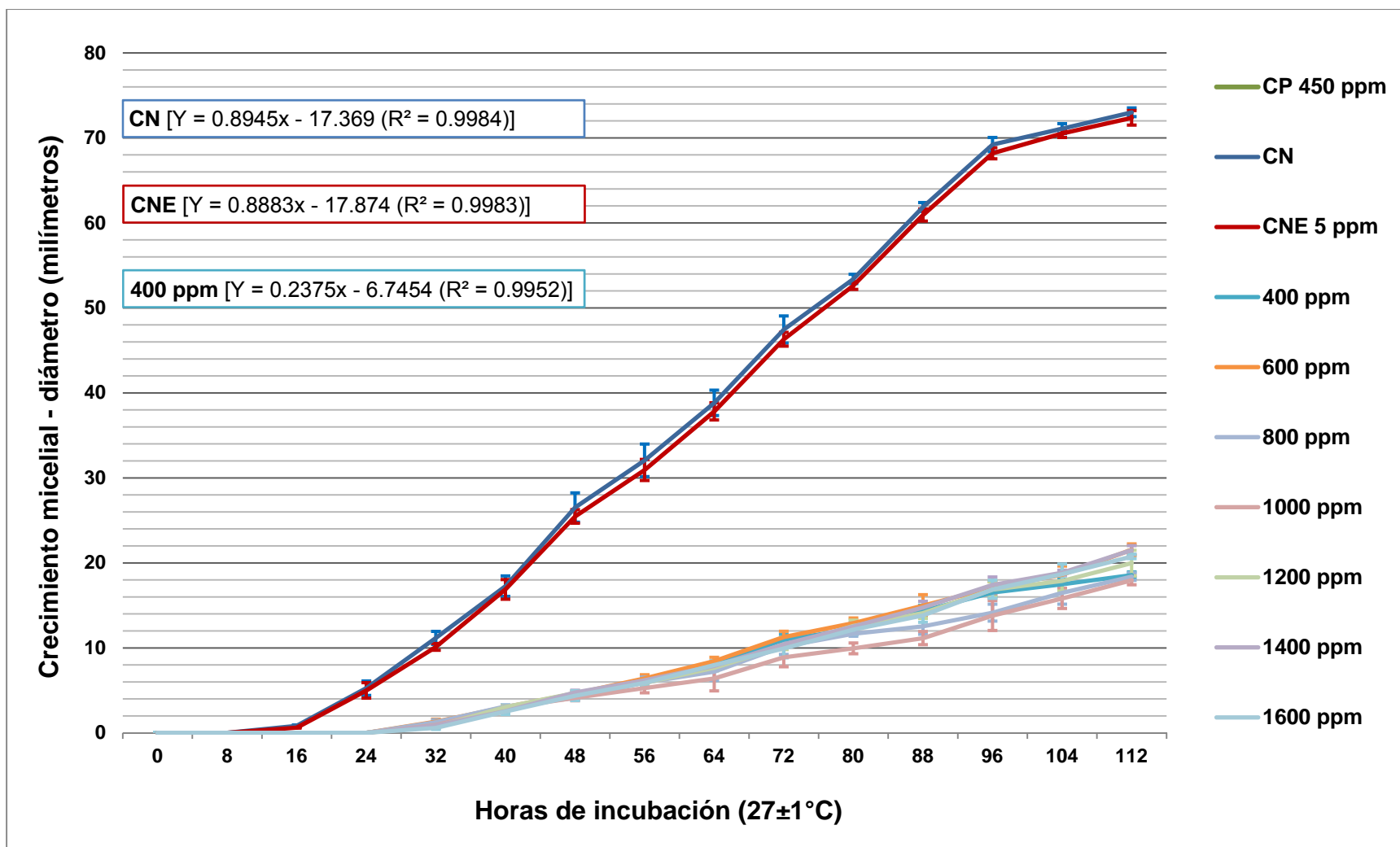


Figura 6. Desarrollo de *Colletotrichum musae* en Banano Durante 192 h de incubación.

velocidad de crecimiento del hongo. Esto debido a que se traslapa con la curva de crecimiento del hongo en ausencia del etanol, mostrando ambos una velocidad de crecimiento sin diferencias significativas de 0.88 y 0.89 mm/h respectivamente (Figura 7). El tratamiento de 400ppm de capsaicina retardó la velocidad de crecimiento del hongo a 0.23 mm/h (pendiente lineal de la curva de crecimiento $Y=0.2375x - 6.7454$ mm/h; $R^2=0.9952$), lo que representa una inhibición del 74% del crecimiento del hongo (Cuadro 4). También se observa un retraso de 32 h del inicio en la fase lag (Figura 7 y 8). Nuestro ensayo muestra que se requiere menor concentración para obtener este porcentaje de inhibición (resaltando que a los datos presentados se les restó el efecto del solvente utilizado en los tratamientos) al comparado con otros estudios, como el reportado por Moreno *et al.* (2012) quienes evaluaron concentraciones de hasta 2,000 ppm de capsaicina para inhibir 70.81% del crecimiento micelial de *Aspergillus flavus*.

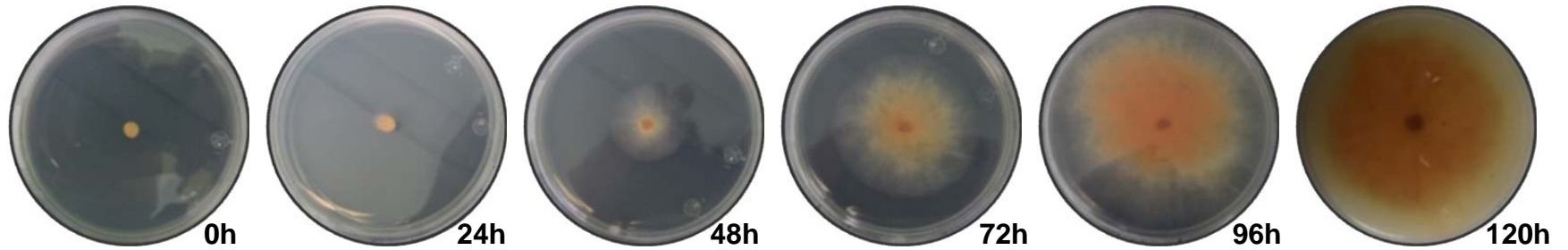
Este efecto puede estar relacionado con la inhibición enzimática, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas que alteran la actividad o estructura proteica; además que los lugares y el número de grupos hidroxilo en el anillo de la capsaicina parecen que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad, por lo que la capsaicina puede estar retardando la actividad de la peroxidasa e incrementando la oxidación de los ácidos grasos que son esenciales para el desarrollo microbiano (Waizel y Morfín, 2011). Así como también concluye Singh *et al.* (2001) que los efectos de la capsaicina pueden inducir al daño del ADN. Waizel y Morfín (2011) y Domingo y López (2003) reportaron que la capsaicina produce irritabilidad a las membranas mucosas, provocando daños irreversibles en sus paredes y organelos celulares, polarizando el potencial de membrana y alterando la doble capa lipídica provocando un mayor flujo de electrones y alterando su homeóstasis.



CN = Control Negativo (agar papa dextrosa y agua estéril). CP = Control Positivo (Tiabendazol). CNE = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol). = Tratamientos con diferentes concentraciones. Los valores son medias de tres repeticiones de cada diez cajas Petri. Las barras verticales representan \pm desviaciones estándar.

Figura 7. Efecto de la Capsaicina sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae*.

Control Negativo: agar papa dextrosa y agua estéril.



400 ppm de Capsaicina en agar papa dextrosa

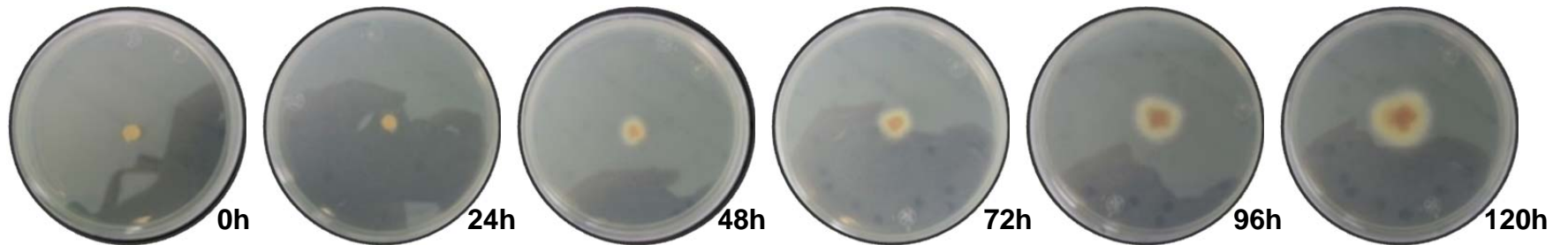


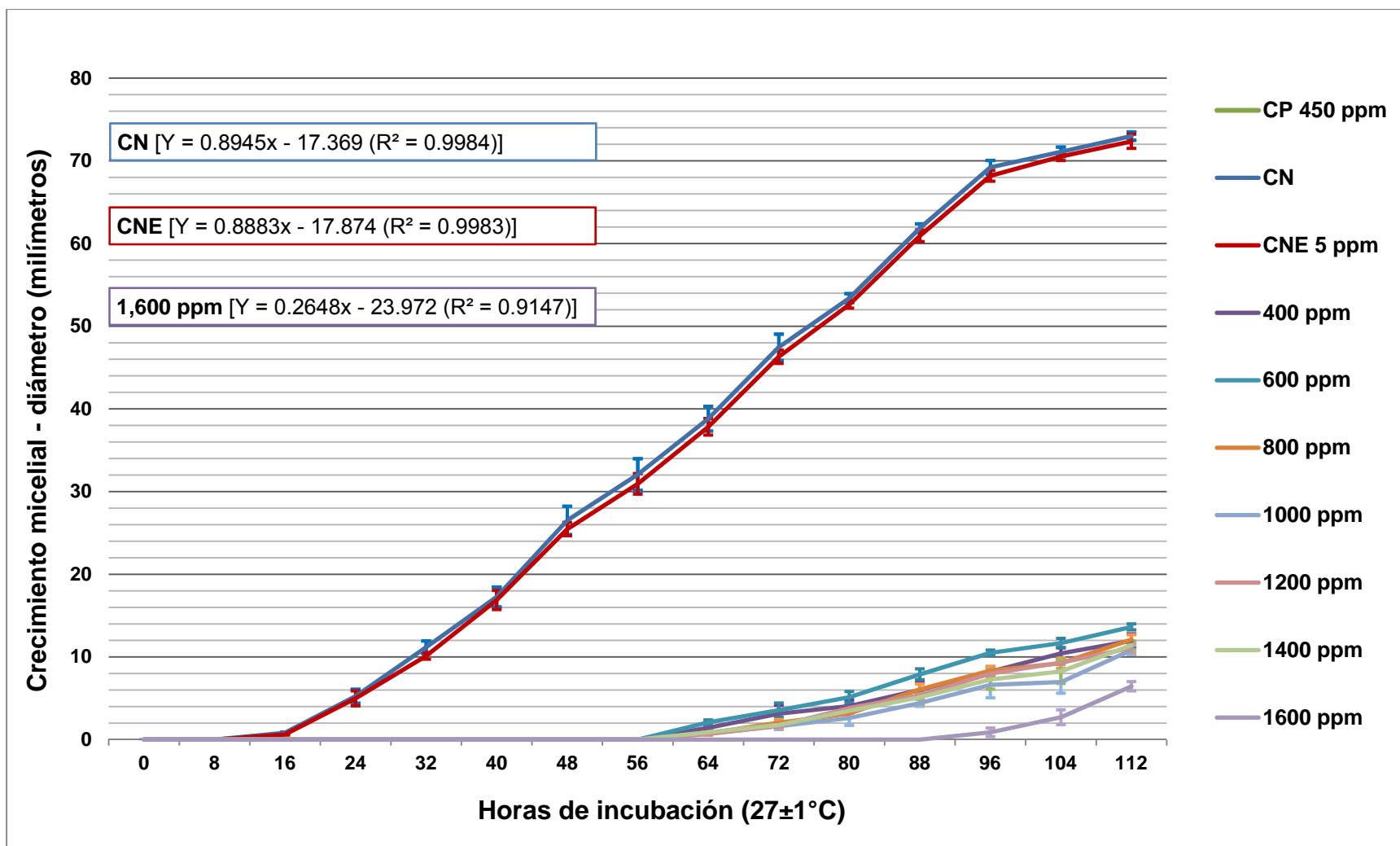
Figura 8. Efecto de 400ppm de Capsaicina sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* Durante 120 h de Incubación.

Cuadro 4. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* en Presencia de Capsaicina Durante 112 h de Incubación.

Tratamientos (ppm)	CNE	400	600	800	1000	1200	1400	1600	CP
	5								450
Inhibición * (%)	1 ^a	74 ^b	70 ^c	74 ^b	75 ^b	72 ^{bc}	70 ^c	71 ^c	100 ^d

* = Letras distintas presentan diferencias significativas (P<0.05). CP = Control Positivo (Tiabendazol). CNE = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol).

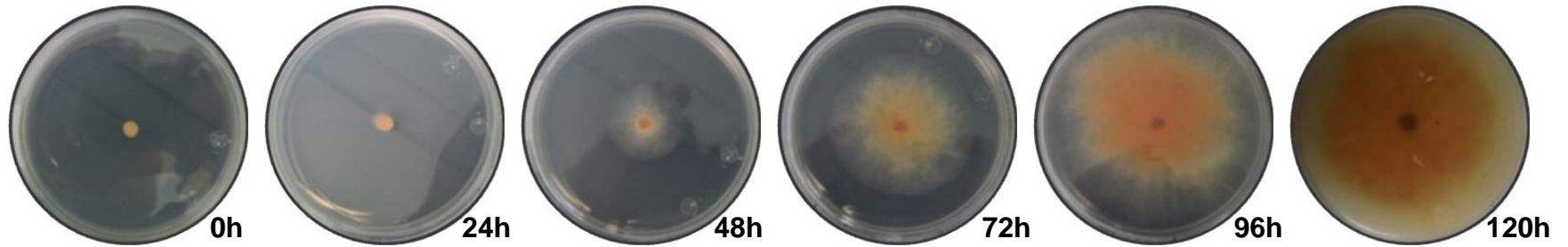
En cuanto al EELt se observó que el AEA utilizado para disolverlo e incorporarlo al medio de cultivo no presentó diferencias significativas con el crecimiento del hongo en ausencia del solvente ($p < 0.05$), por lo que al correlacionar los puntos de crecimiento del hongo con los del solvente utilizado no ejerció efecto sobre la velocidad de crecimiento del hongo. Esto debido a que se traslapa con la curva de crecimiento del hongo en ausencia del etanol, mostrando ambos una velocidad de crecimiento sin diferencias significativas de 0.88 y 0.89 mm/h respectivamente (Figura 9). El tratamiento de 1,600ppm del EELt retardó la velocidad de crecimiento del hongo a 0.26 mm/h (pendiente lineal de la curva de crecimiento $Y = 0.2648x - 23.972$ mm/h; $R^2 = 0.9147$), lo que representa una inhibición del 90% del crecimiento del hongo (Cuadro 5). También se observó un retraso de 96 h del inicio en la fase lag (Figura 9 y 10). Cabe señalar que concentraciones bajas de 400ppm de EELt inhiben en un 83% el crecimiento del hongo. Nuestro ensayo muestra que se requiere menor concentración para obtener este porcentaje de inhibición (resaltando que a los datos presentados se les restó el efecto del solvente utilizado en los tratamientos) al compararlos con otros estudios, como el reportado por Lira *et al.* (2003) quienes reportaron concentraciones mayores de 8,000ppm para inhibir el crecimiento micelial de *Altenaria solani* en un 100%. En otro estudio Lira *et al.* (2006) utilizaron 4,000ppm para inhibir en 64.5% a *C. coccodes*, 99.5% a *B. cinerea* y 41.8% a *F. oxysporum*. Jasso *et al.* (2007) también reportan que utilizaron concentraciones mayores de este extracto (4,000ppm) para inhibir en un 100% a *C. gloesporoides*. Lo mismo que Moreno *et al.* (2011), quienes utilizaron 7,000ppm y 5,000ppm para inhibir en 100% a *A. flavus* y *Penicillium spp.*



CN = Control Negativo (agar papa dextrosa y agua estéril). **CP** = Control Positivo (Tiabendazol). **CNE** = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol). = Tratamientos con diferentes concentraciones. Los valores son medias de tres repeticiones de cada diez cajas Petri. Las barras verticales representan \pm desviaciones estándar.

Figura 9. Efecto del Extracto Etanólico de *Larrea tridentata* sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae*.

Control Negativo: agar papa dextrosa y agua estéril.



1,600 ppm de EELt en agar papa dextrosa

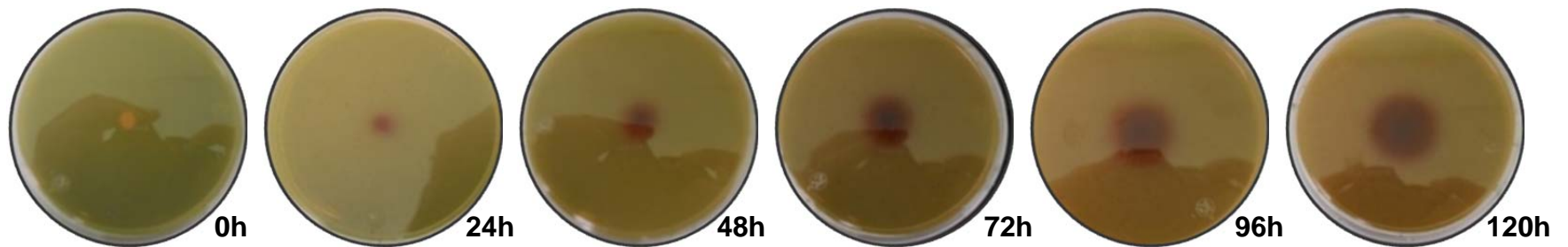


Figura 10. Efecto de 1,600ppm de EELt sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* Durante 120 h de Incubación.

Cuadro 5. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* en Presencia de EELt Durante 112 h de Incubación.

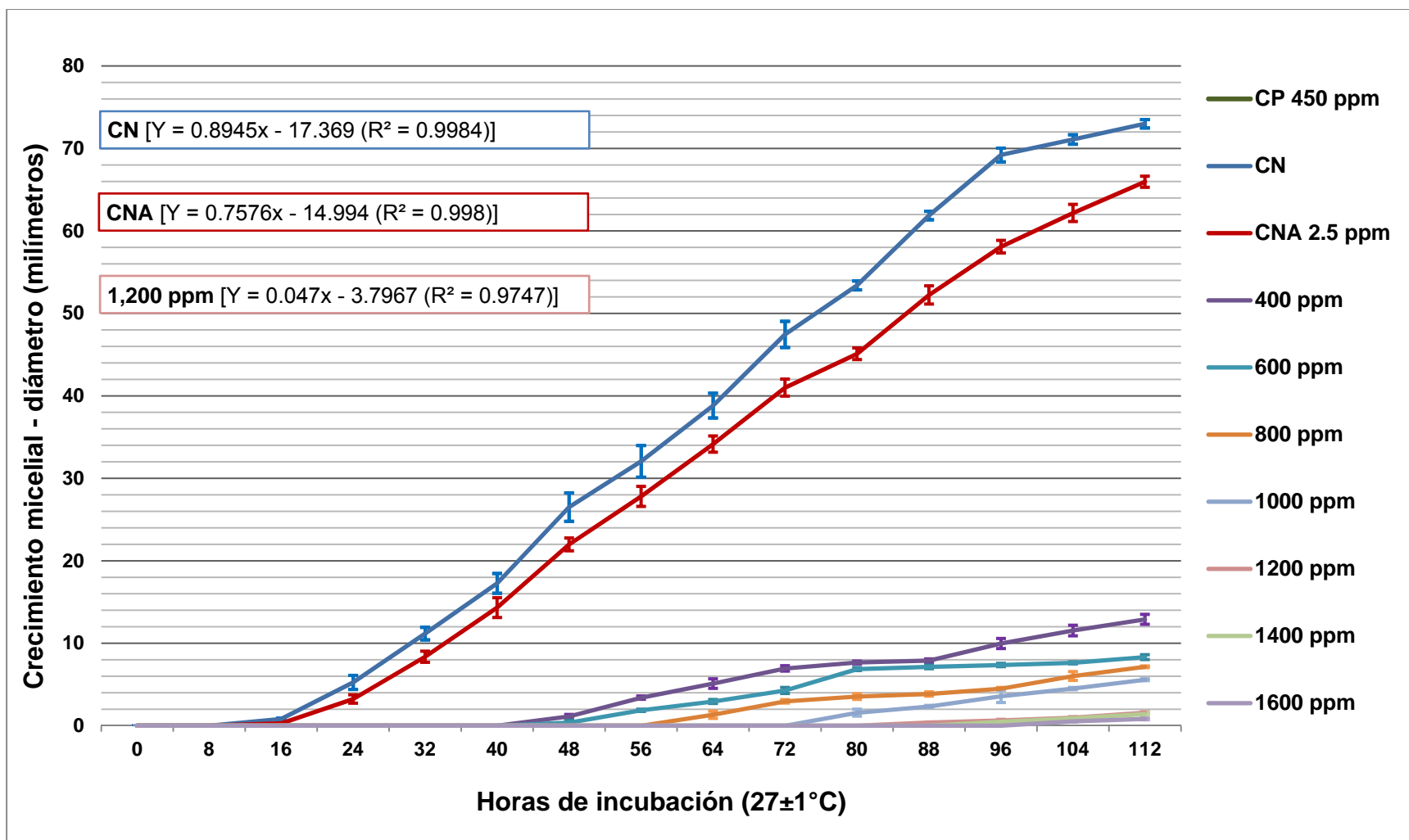
Tratamientos (ppm)	CNE 5	400	600	800	1000	1200	1400	1600	CP 450
Inhibición* (%)	1 ^a	83 ^b	80 ^{bc}	83 ^b	84 ^{bd}	84 ^{bd}	83 ^{bd}	90 ^e	100 ^f

* = Letras distintas presentan diferencias significativas (P<0.05). CP = Control Positivo (Tiabendazol). CNE = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol).

respectivamente y Peñuelas *et al.* (2015) utilizaron hasta 3,000ppm para inhibir en 100% a *Aspergillus niger*. Este efecto según lo reportado por Ultee *et al.* (2002) y Burt (2004) coincide con el carácter hidrofóbico de los aceites esenciales que les permite incorporarse en los lípidos de las membranas bacterianas perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a las fugas de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte de la célula. Aunque este reporte es determinante en bacterias en nuestro estudio se observó una lisis cuando se aplicó el tratamiento sobre la germinación de conidias, por lo que elucidamos que este comportamiento es similar en hongos. En la investigación de Moscoso *et al.* (2013) se observó que el Etilparabeno tiene un efecto inhibitor sobre el transporte de membrana y los procesos mitocondrial. Los aceites esenciales también podrían actuar sobre las proteínas de la membrana citoplasmática alterando la interacción lípido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular. Por otra parte se le atribuye el efecto de los extractos de *Larrea tridentata* a los lignanos: ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y el ácido metil-nordihidroguaiarético (metil-NDGA), estos exhiben una amplia gama de propiedades biológicas que incluyen antimicrobianos, actividades antivirales, antitumoral y la inhibición de muchos sistemas enzimáticos (Biswal *et al.*, 2000; Gnabre *et al.*, 1996), se han dilucidado que NDGA actúa como un inhibidor de la lipoxigenasa (LOX), al interferir con la acción de algunas enzimas (Whitman *et al.*, 2002). Se ha demostrado que metil-NDGA es un potente agente que inhibe la replicación del virus VIH al afectar la transcripción del VIH, el virus del

papiloma humano y el herpes simplex (Clark, 1999; Chen *et al.*, 1998; Hwu *et al.*, 1998). Sin embargo, los mecanismos antifúngicos de estos lignanos no han sido demostrados claramente. Vargas *et al.* (2009) sugiere que la estructura del NDGA tiene un gran potencial para inhibir la enzima β - (1-3) glucanasa, los grupos hidroxilo presentes en NDGA, pueden unirse al sitio catalítico de β - (1-3) glucanasa, y de ese modo inhibir la actividad de la enzima como un resultado de dicha interacción. Además, coincide con lo reportado por Agarwal *et al.* (1991) quienes observaron que NDGA inhibe las enzimas monooxigenasa mediante la unión de su grupo hidroxilo en el sitio catalítico. En hongos la enzima β -(1,3)-glucanasa parece tener diferentes funciones en los procesos morfogénicos, la movilización de β -glucano, separación de células y germinación de esporas (Baladrón *et al.*, 2002; Liu y Balasubramanian, 2001).

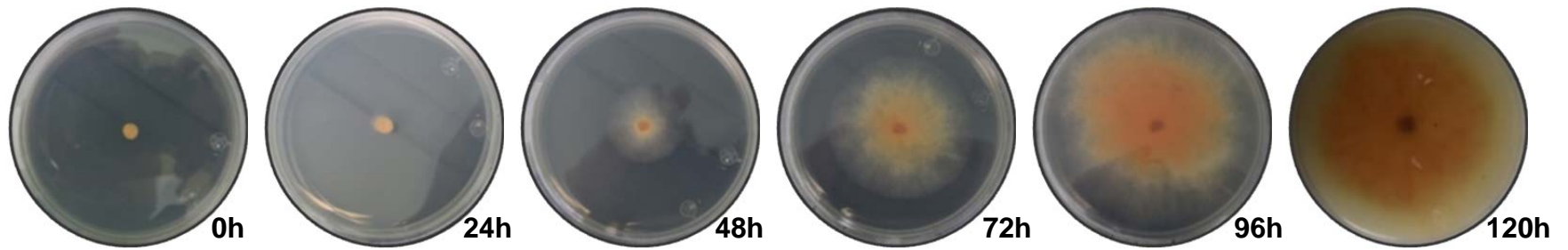
Al utilizar quitosano se observó que el ácido acético glacial utilizado para disolver e incorporar la solución acuosa de quitosano al medio de cultivo presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), por lo que al correlacionar los puntos de crecimiento del hongo con los del solvente utilizado ejerció un ligero efecto sobre la velocidad de crecimiento del hongo en presencia del ácido, reduciendo la velocidad de crecimiento con diferencias significativas de 0.88 a 0.76 mm/h (Figura 11). El tratamiento de 1,200ppm de quitosano retardó la velocidad de crecimiento del hongo a 0.05 mm/h (pendiente lineal de la curva de crecimiento $Y = 0.047x - 3.7967$ mm/h; $R^2 = 0.9747$), lo que representa una inhibición del 89% del crecimiento del hongo (Cuadro 6). También se observa un retraso de 104 h del inicio en la fase lag (Figura 11 y 12). Cabe señalar que concentraciones bajas de 800ppm de Q inhiben en un 83% el crecimiento del hongo. Nuestro ensayo muestra que se requiere menor concentración de quitosano para obtener porcentajes de inhibición altos (resaltando que a los datos presentados se les restó el efecto del solvente utilizado en los tratamientos) al compararlos con otros estudios, como el realizado por Gutiérrez *et al.* (2012), quienes utilizaron concentraciones de hasta 10,000ppm para inhibir en un 80% el crecimiento micelial de *Colletotrichum spp.* Por otra parte



CN = Control Negativo (agar papa dextrosa y agua estéril). CP = Control Positivo (Tiabendazol). CNA = Control Negativo Ácido (agar papa dextrosa, agua estéril y ácido acético glacial). ■ = Tratamientos con diferentes concentraciones. Los valores son medias de tres repeticiones de cada diez cajas Petri. Las barras verticales representan ± desviaciones estándar.

Figura 11. Efecto del Quitosano sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae*.

Control Negativo: agar papa dextrosa y agua estéril.



1,200 ppm de Quitosano en agar papa dextrosa

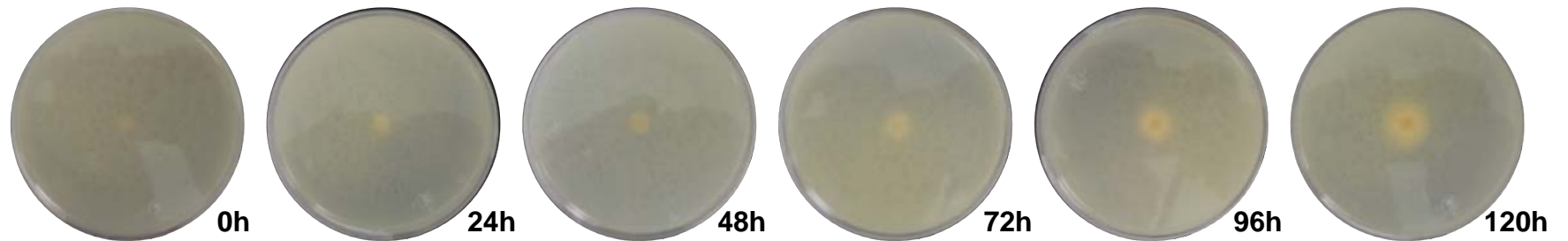


Figura 12. Efecto de 1,200 ppm de Quitosano sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* Durante 120 h de Incubación.

Cuadro 6. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* en Presencia de Quitosano Durante 112 h de Incubación.

Tratamientos (ppm)	CNA 2.5	400	600	800	1000	1200	1400	1600	CP 450
Inhibición* (%)	9 ^a	73 ^b	79 ^c	81 ^d	83 ^e	88 ^f	88 ^f	89 ^f	100 ^e

* = Letras distintas presentan diferencias significativas (P<0.05). CP = Control Positivo (Tiabendazol). CNA = Control Negativo Ácido (agar papa dextrosa, agua estéril y ácido acético glacial).

Velázquez *et al.* (2012) utilizaron 10,500ppm para inhibir en un 56.16% el crecimiento micelial de *C. gloesporoides* y López *et al.* (2012) utilizaron 10,000ppm para inhibir en un 70% a *Alternaria alternata*. Se ha demostrado desde hace mucho tiempo que la base de la actividad fungicida del quitosano se ha asociado al carácter catiónico del biopolímero y del peso molecular; La interacción entre los grupos amino libres cargados positivamente en medio ácido, con los fosfolípidos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambian la permeabilidad de la membrana plasmática (es mayor en las membranas que contienen lípidos poliinsaturados), con la consecuente alteración de sus principales funciones, además de alterar su homeostasis inhibiendo la síntesis de algunas enzimas que se encuentran en la membrana como lo mencionan Jeihanipour *et al.* (2007); Palma *et al.* (2010); Velázquez *et al.* (2012). En otros estudios se demostró que el quitosano influye la salida de potasio, el pH del medio y la actividad de la ATPasa en la membrana celular del hongo *R. stolonifer* (García *et al.*, 2010b). Por lo que es posible que el quitosano que proviene del exoesqueleto de camarones tenga un mayor carácter catiónico y por esta razón presente mayor poder de inhibición.

6.4.1. Efecto de la Combinación de los Compuestos Naturales sobre el Crecimiento Micelial

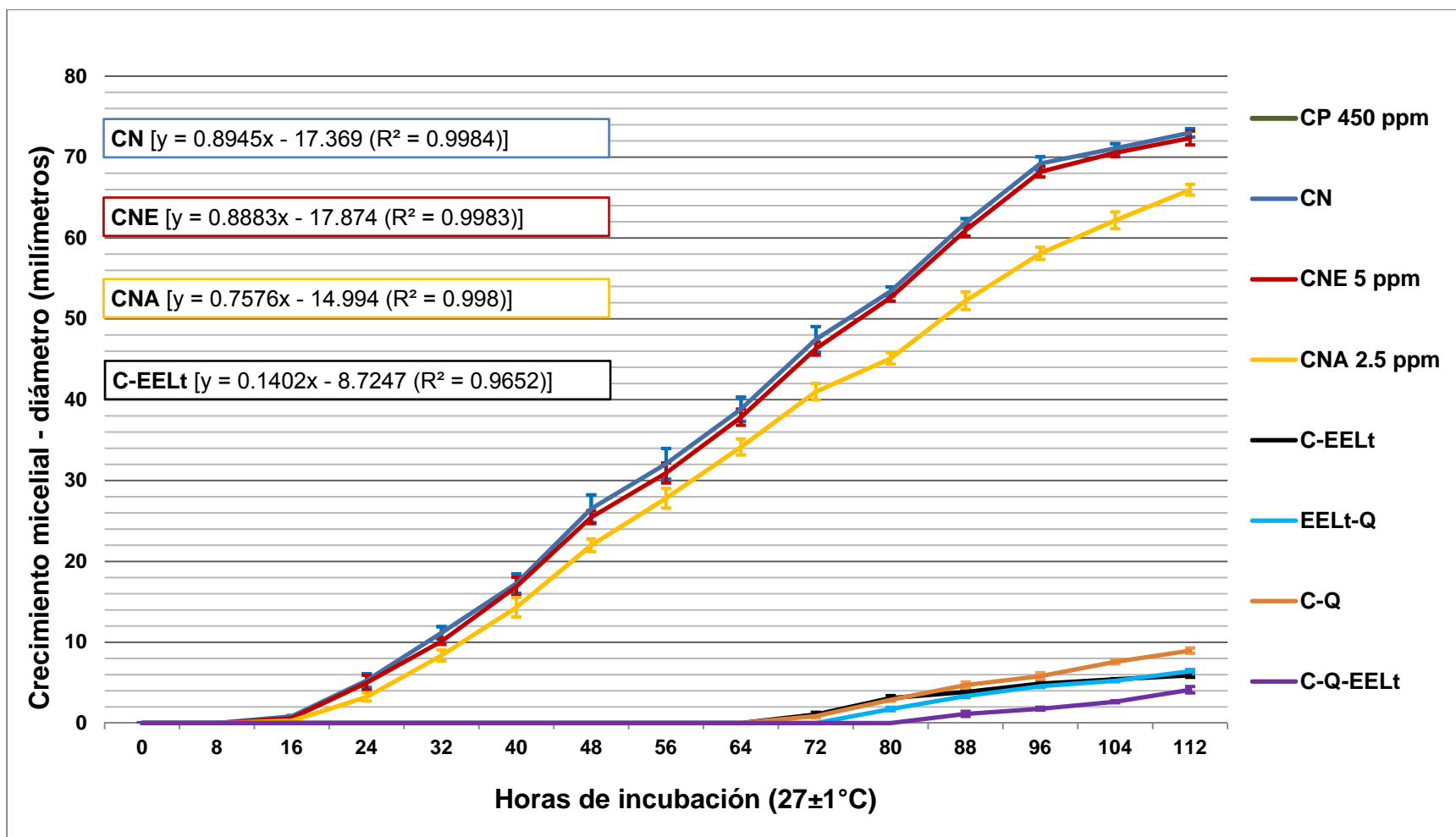
Los tratamientos de 400ppm de capsaicina más 400ppm de EELt retardaron la velocidad de crecimiento del hongo a 0.14 mm/h (pendiente lineal de la curva de crecimiento $Y=0.1402x - 8.7247$ mm/h; $R^2=0.9652$), lo que representa una inhibición del 91% del crecimiento del hongo, ver Cuadro 7.

Cuadro 7. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* en Presencia del Efecto Combinado de 400ppm de Capsaicina, EELt y Quitosano Durante 112 h de Incubación.

Tratamientos (ppm)	CNE 5	CNA 2.5	EELt - C 400-400	EELt - Q 400-400	C - Q 400-400	EELt - C - Q 400-400-400	CP 450
Inhibición* (%)	1 ^a	9 ^b	91 ^c	82 ^d	78 ^e	84 ^f	100 ^g

* = Letras distintas presentan diferencias significativas (P<0.05). CP = Control Positivo (Tiabendazol). CNA = Control Negativo Ácido (agar papa dextrosa, agua estéril y ácido acético glacial). CNE = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol). C = Capsaicina. Q = Quitosano. Extracto Etanólico de *Larrea tridentata* = EELt.

También se observó un retraso de 72 h del inicio en la fase lag (Figura 13 y 14). Cuando se combinaron estos compuestos se determinó que tienen un efecto aditivo sobre la velocidad de crecimiento del hongo (Cuadro 8), por lo que determinamos que es más confiable reportar datos sobre la velocidad de crecimiento para evaluar los efectos aditivos o sinérgicos. La triple combinación de los compuestos bioactivos naturales (C-EELt-Q) retardó el inicio de la fase lag en 88 h, además de inhibir en un 84% el crecimiento del hongo. En cuanto a la combinación de C-Q y EELt-Q retardaron el inicio de la fase lag en 72 y 80 h, además de inhibir en un 78 y 82% el crecimiento del hongo respectivamente. Sangeetha *et al.* (2013) afirman que la mayoría de extractos derivados de plantas contienen una alta concentración de compuestos fenólicos que son capaces de reducir la velocidad de crecimiento del patógeno afectando a los sitios activos de las enzimas y el metabolismo celular. Se reporta que existe sinergia entre extracto metanólico de Lt (EMLt) y Q en la investigaciones de Lira *et al.* (2006), quienes utilizaron concentraciones de hasta 1,000ppm de EMLt y 2,000ppm de Q para inhibir en un 100% el crecimiento micelial de *C. coccodes*, *B cinerea* y *F. oxysporum*. En los demás casos sería el primer uso combinado de estos compuestos bioactivos naturales, resaltando que a los datos presentados se les restó el efecto del solvente utilizado en los tratamientos.



CN = Control Negativo (agar papa dextrosa y agua estéril). CP = Control Positivo (Tiabendazol). CNE = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol). CNA = Control Negativo Ácido (agar papa dextrosa, agua estéril y ácido acético glacial). = Tratamientos con diferentes concentraciones. Los valores son medias de tres repeticiones de cada diez cajas Petri. Las barras verticales representan \pm desviaciones estándar. C = Capsaicina. Q = Quitosano. Extracto Etanólico de *Larrea tridentata* = EELt.

Figura 13. Efecto de 400ppm de Capsaicina, Extracto Etanólico de *Larrea tridentata* y Quitosano Combinados sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae*.

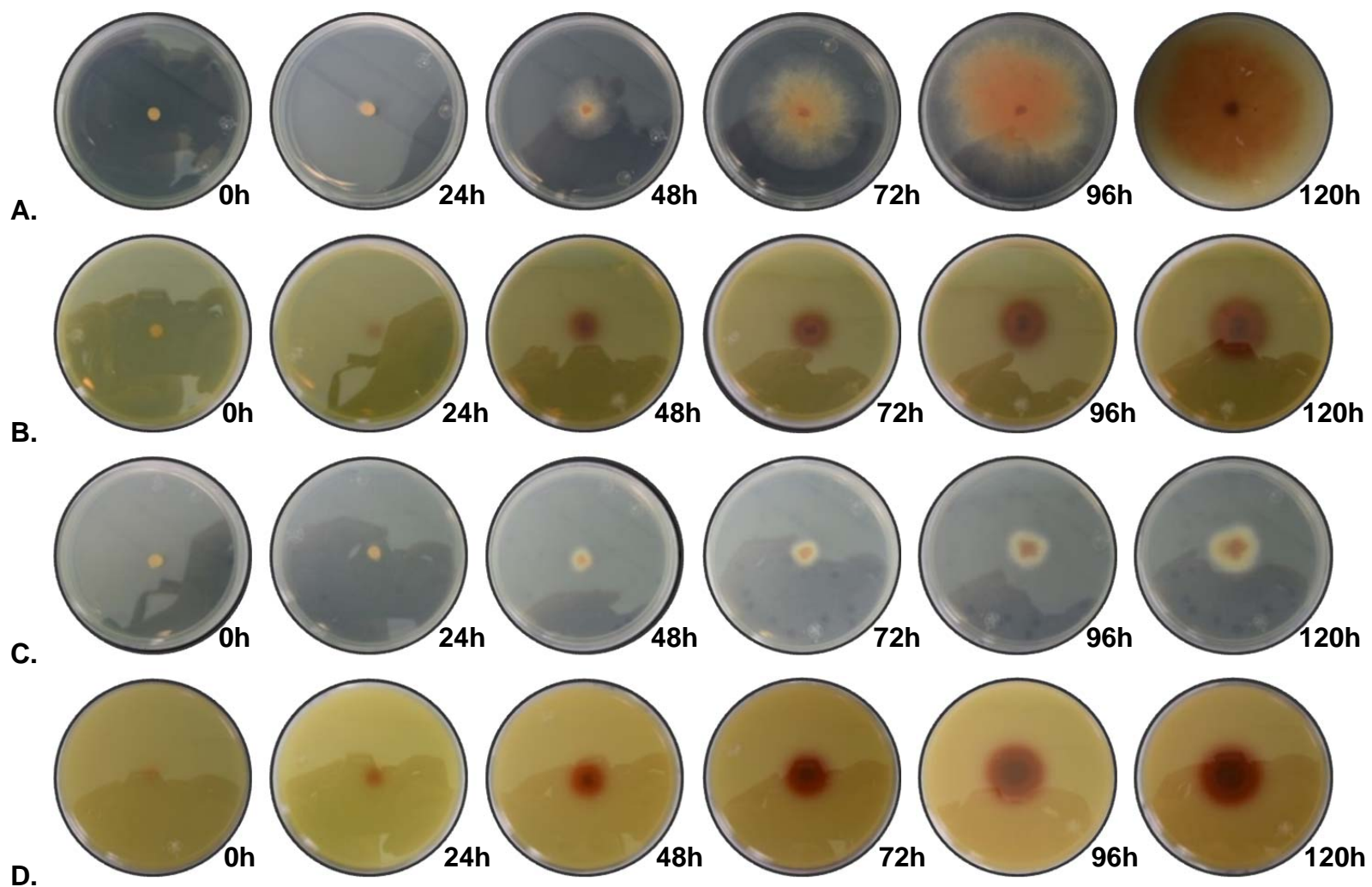


Figura 14. Efecto de 400ppm de Extracto Etanólico de *Larrea tridentata* (B), 400ppm de Capsaicina (C) y la Combinación de Ambos (D) sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum musae* (A) Durante 120 h de Incubación.

Cuadro 8. Velocidad de Crecimiento de *Colletotrichum musae* en mm/h.

	0	400	600	800	1,000	1,200	1,400	1,600
	PPM	PPM	PPM	PPM	PPM	PPM	PPM	PPM
CN	0.895	-	-	-	-	-	-	-
CNE	0.889	-	-	-	-	-	-	-
CNA	0.758	-	-	-	-	-	-	-
CP	-	0.0	-	-	-	-	-	-
C	-	0.238	0.247	0.209	0.201	0.236	0.251	0.245
EELt	-	0.217	0.248	0.221	0.184	0.210	0.200	0.265
Q	-	0.175	0.127	0.117	0.135	0.047	0.058	0.051
C-EELt	-	0.140	-	-	-	-	-	-
C-Q	-	0.193	-	-	-	-	-	-
EELt-Q	-	0.156	-	-	-	-	-	-
C-EELt-Q	-	0.121	-	-	-	-	-	-

CP = Control Positivo (Tiabendazol) 450ppm. **CNA** = Control Negativo Ácido (agar papa dextrosa, agua estéril y ácido acético glacial). **CNE** = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol). **C** = Capsaicina. **Q** = Quitosano. **Extracto Etanólico de *Larrea tridentata*** = EELt. Los valores son medias de tres repeticiones de cada diez cajas Petri.

6.5. Actividad Antifúngica de los Compuestos Naturales sobre la Germinación de Conidias

Durante el ensayo antifúngico sobre la germinación de conidias se obtuvo el porcentaje de germinación que se presentan en el Cuadro 9. El inicio de la germinación de conidias ocurrió durante las primeras 2 h, sin embargo se demuestra en la Figura 15 que se cumple la toma de decisión de germinación de conidias a las 4 h donde la longitud del tubo germinativo de una conidia alcanza la mitad del tamaño de su longitud. Esta germinación fue afectada por la aplicación de los compuestos naturales, observándose un 5.2 y 1.67% de germinación al aplicarse capsaicina, EELt y quitosano respectivamente. El efecto combinado de los compuestos naturales no permitió la germinación de conidias. Lira *et al.* (2006) mostraron que utilizando 4,000 ppm de extracto metanólico de *Larrea tridentata* (EMLt) germinaron 2.8% conidias de *C. coccodes*, con 1,000 ppm de quitosano de exoesqueleto de camarones germinaron 1.7% de conidias de *C. coccodes* y una combinación de 1,000ppm de EMLt y 1,000ppm de quitosano germinaron 0.8%. Se demuestra que los

tratamientos combinados ejercen un efecto sinérgico, inhibiendo en un 100% la germinación de conidias (cuadro 9). Sin embargo, en otros experimentos realizados en el laboratorio de inocuidad agroalimentaria se observó que a partir del ensayo antifúngico de crecimiento micelial se evaluó la producción de conidias y se determinó que la capsaicina aumenta considerablemente la producción de conidias (esporulación) y tanto el EELt como el quitosano reducen la producción de conidias considerablemente (Cuadro 10).

Estudios como los de Palma *et al.* (2008) mostraron que el quitosano es más efectivo sobre las conidias que sobre las hifas de algunos hongos fitopatógenos. Durante el conteo (Figura 16) se observaron dos primicias que nos permite elucidar lo siguiente: en la Figura 17 se observa como una de las conidias sufre una ruptura por el efecto de los tratamientos aplicados. Se especula que hay una hidrólisis de la pared celular provocando una perturbación en su estructura, así como alteraciones en su permeabilidad provocando daños irreversibles en sus paredes y organelos celulares, dando lugar a la fuga de los constituyentes citoplasmáticos de la conidias lo cual es soportado por Burt (2004); Ultee *et al.* (2002) y Waizel y Morfín (2011). En la Figura 18 se muestra el efecto de la aplicación de los compuestos naturales combinados, observándose que la conidia con los tratamientos es más oscura, carente de organelos (Barka *et al.*, 2004) y con características morfológicas diferentes a las que no recibieron el tratamiento, por lo que se especula que los tratamientos pueden estar cambiando la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones, además de alterar su homeostasis inhibiendo la síntesis de algunas enzimas que se encuentran en la membrana o alteraciones citológicas y morfogénicas, así como el ergosterol, peroxidasa, β -(1-3) glucanasa, quitinasa, poligalacturonasa, pectato liasa, phenylalanina ammonia-liasa (Biswal *et al.*, 2000; Palma *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2009), Además de interferir con gran variedad de procesos metabólicos esenciales en la célula (Rodríguez, 2011).

Cuadro 9. Efecto de los Compuestos Naturales sobre la Germinación de Conidias en PDA.

Tratamientos	PPM	Germinación (%)*
CN	--	91.67 ^a
CNE (AEA)	5	90.33 ^{ab}
CNA (AAG)	2.5	87.00 ^b
CP (Tiabendazol)	450	0.00 ^d
C	400	5.00 ^c
EELt	400	2.00 ^{cd}
Q	400	1.67 ^{cd}
C - EELt	400-400	0.00 ^d
C - Q	400-400	0.00 ^d
EELt - Q	400-400	0.00 ^d
C - EELt - Q	400-400-400	0.00 ^d

* = Letras distintas presentan diferencias significativas (P<0.05). **CN** = Control negativo (agar papa dextrosa y agua estéril). **CNE** = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol). **CNA** = Control Negativo Ácido (agar papa dextrosa, agua estéril y ácido acético glacial). **CP** = Control Positivo (Tiabendazol). **AEA** = Alcohol etílico absoluto. **AAG** = Ácido acético glacial. Los valores son medias de tres repeticiones de cada diez cajas Petri.

Cuadro 10. Efecto de la Capsaicina, EELt y Quitosano sobre la Producción de Conidias.

PRODUCCIÓN DE CONIDIAS x 10 ⁶ (esporulación)						
PPM	CN	CNE	CNA	C	EELt	Q
0	4.5	4.5	4	-	-	-
400	-	-	-	3.5	1	1
600	-	-	-	3.5	1	1
800	-	-	-	4.5	1	1
1000	-	-	-	5.5	1.5	2
1200	-	-	-	5.5	2.5	0
1400	-	-	-	6	2.5	0
1600	-	-	-	6	2.5	0

CN = Control negativo (agar papa dextrosa y agua estéril). **CNE** = Control Negativo Etanólico (agar papa dextrosa, agua estéril y etanol). **CNA** = Control Negativo Ácido (agar papa dextrosa, agua estéril y ácido acético glacial). **CP** = Control Positivo (Tiabendazol). Los valores son medias de tres repeticiones de cada diez cajas Petri.



Figura 15. Germinación de Conidias Durante 4 h de Incubación (Objetivo 40x).



Figura 16. Observación Microscópica de las Conidias de *Colletotrichum musae* sin tratamientos (objetivo 10X).



Figura 17. Ruptura de Conidias y Fuga de los Constituyentes Citoplasmáticos por Efecto de los Tratamientos (Objetivo 40x).

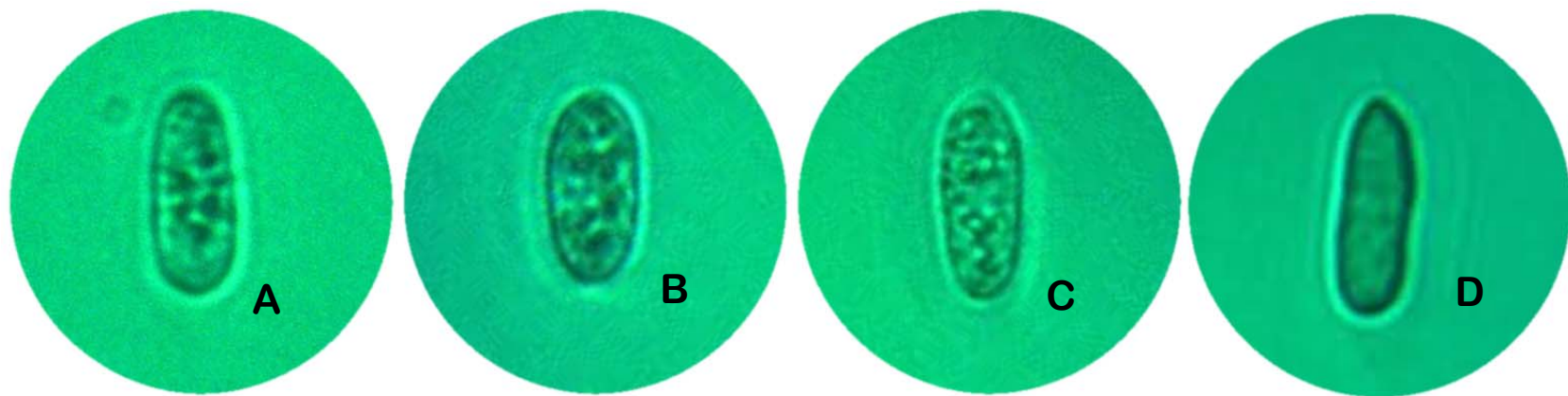


Figura 18. Efecto de los Tratamientos sobre las Conidias de *Colletotrichum musae*. A, B, C (sin Tratamiento) y D (con Tratamientos Combinados) (Objetivo 40x).

VII. CONCLUSIÓN

Los compuestos bioactivos naturales individuales demostraron inhibición (mayor de 70%) del crecimiento micelial de *Colletotrichum musae* a concentraciones más bajas que la reportadas por estudios anteriores; demostrando un efecto fungistático. Al analizar el efecto combinado no se demostró sinergismo entre los compuestos bioactivos, pero si se observó que existe un efecto aditivo al combinar la capsaicina y el extracto etanólico de *Larrea tridentata* sobre la velocidad de crecimiento micelial. Las combinaciones de los compuestos demostraron tener un efecto fungicida sobre la germinación de conidias. Por ende, pueden ser considerados como agroquímicos potenciales de bajo impacto ambiental para ser usados como fungicidas orgánicos, pero se requiere más trabajo de investigación antes de que estos compuestos tengan una aplicación comercial *in vivo*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Aplicar los compuestos bioactivos naturales *in vivo* para demostrar los efectos tan prometedores que manifestaron en este trabajo.
- Realizar pruebas toxicológicas.
- Evaluar si los compuestos bioactivos naturales utilizados en este estudio potencian el efecto de los compuestos sintéticos y que de este modo se utilicen a una menor dosis, así reducir los costos de producción y el impacto ambiental.

IX. REFERENCIAS

- Abd, K., Roshdy, S., Amin, O., y Rabani, M. 2010. First morphogenetic identification of the fungal pathogen *Colletotrichum musae* (Phyllachoraceae) from imported bananas in Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 9(4): 2335-2342.
- Agarwal, R., Wang, Z., Bik, D., y Mukhtar, H. 1991. Nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of lipoxygenase, also inhibits cytochrome P-450-mediated monooxygenase activity in rat epidermal and hepatic microsomes. *Drug metabolism and disposition*, 19(3): 620-624.
- Agrios, G. 2005. Plant diseases caused by fungi. *Plant Pathology*, 1(1): 385-614.
- Aguilar, P., Navarro, A., Sánchez, A., Ávila, R., y De La Cruz, M. 2014. Efecto antifúngico de extractos de plantas originarias del estado de Puebla sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *CienciaUAT*, 7(2): 6-11.
- Alvindhia, D., Kobayashi, T., Natsuaki, K., y Tanda, S. 2004. Inhibitory influence of inorganics salts on banana postharvest pathogens and preliminary application to control crow rot. *Journal of General Plant Pathology*, 70(1): 61-65.
- Alzate, D., Gonzalo, I., Afanador, M., y Durango, R. 2009. Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y sus componentes mayoritarios. *SCIELO, Vitae*, 16(1): 116-125.
- Ancocota, R., Raymundo, R., Bejarano, J., y Duque, E. 2015. Hongos asociados a la pudrición de la corona en frutos de banano orgánico (*Musa spp.* L.) en Piura, Perú. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)*, 4(1): 81-88.
- Arias, P. 2004. La economía mundial del banano 1985-2002. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1(1): 96.
- Avedaño, B., Schwentesius, R., y Lugo, S. 2007. El impacto de la iniciativa de inocuidad alimentaria de Estados Unidos en la exportaciones de hortalizas frescas del noroeste de México. *Región y Sociedad*, 36(1): 7-36.

- Baladrón, V., Ufano, S., Dueñas, E., Martín, A., Del Rey, F., y De Aldana, C. 2002. Eng1p, an endo-1, 3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 1(5): 774-786.
- Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., y Vernet, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22(8): 608-614.
- Bautista, S., Hernández, A., Del Valle, M., Bosquez, E., y Sánchez, D. 2005. Quitosano: Una Alternativa Natural para Reducir Microorganismos Postcosecha y Mantener la Vida de Anaquel de Productos Hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 7(1): 1-6.
- Beltrán, M., Manzo, G., Orozco, M., y Ogura, T. 2009. Sigatoka negra: el cáncer de la producción de banano. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 35(232): 58-63.
- Biswal, S., Datta, K., Shaw, S., Feng, X., Robertson, J., y Kehrer, J. 2000. Glutathione oxidation and mitochondrial depolarization as mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis in lipoxygenase-deficient FL5. 12 cells. *Toxicological Sciences*, 53(1): 77-83.
- Bobbarala, V., Katikala, P., Duggirala, V., y Penumajji, S. 2009. Control of phytopathogenic fungi *Colletotrichum graminicola* using medicinal plant methanolic extracts. *Drug Invention Today*, 1(1): 3-6.
- Bosquez, M., Ronquillo, J., Bautista, S., Verde, C., y L., M. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57(1): 132-137.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253.
- Canto, B. 2012. Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka negra en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., 1(1).
- Cañedo, V., y Ames, T. 2004. Medios de cultivo de laboratorio. Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. International Potato Center, Peru, 1(1): 18-22.

- Castillo, L., Jiménez, J., y Delgado, M. 2012. Actividad biológica *in vitro* del extracto de *Capsicum chinense* Jacq contra *Bemisia tabaci* Genn. Revista Chapingo. Serie horticultura, 18(3): 345-356.
- Cázares, E., Ramírez, F., Castillo, M., Soto, M., Rodríguez, M., y Chavez, J. 2005. Capsaicinoides y Preferencias de Uso en Diferentes Mosfotipos de Chile (*Capsicum annum* L.) del Centro oriente Yucatán. Agrociencia, 39(1): 627-638.
- Cedron, J. 2013. La capsaicina. Revista de Química, 27(1-2): 7.
- Clark, D. 1999. Treating Herpes Naturally with *Larrea tridentate*. Published by US Botanicals. Tempe, Arizona, USA.
- Cosentino, S., Tuberoso, C., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., y Palmas, F. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29(2): 130-135.
- COVECA. 2010. Monografía del plátano: Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Gobierno del Estado de Veracruz, México, 1(1): 2-6.
- Chen, H., Teng, L., Li, J., Park, R., Mold, D., Gnabre, J., Hwu, J., Tseng, W., y Huang, R. 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. Journal of medicinal chemistry, 41(16): 3001-3007.
- De León, I., Vargas, R., Muñoz, E., Muñoz, L., y Castellanos, L. 2013. Actividad Antifúngica *in vitro* de Extractos Acuosa de Especies. Fitopatología, 31(2): 105-112.
- Delaquis, P., Stanich, K., Girard, B., y Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology, 74(1): 101-109.
- Domingo, D., y López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia, 16(4): 385-393.
- Dorman, H., y Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied microbiology, 88(2): 308-316.

- Eich, E. 2008. Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany, 1(1): 637.
- Faedda, R., Agosteo, G., Schena, L., Mosca, S., Frisullo, S., Di San Lio, G., y Cacciola, S. 2011. *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(2): 283-302.
- FAOSTAT. 2015. Food And Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division, Country/Territorial Notes, Recuperado el 23 de abril del 2015 de: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- García, C., Martínez, A., Ortega, J., y Castro, F. 2010a. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2): 86-96.
- García, J., Vega, J., Guerra, M., Hernandez, A., Peña, A., y Velazquez, M. 2010b. Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Pesticide biochemistry and physiology*, 97(3): 275-278.
- García, R., González, M., García, R., Mora, J., González, A., y Martínez, M. 2013. El mercado del plátano (*Musa paradisiaca*) en México, 1971-2017. *Agrociencia*, 47(4): 399-410.
- Gill, A., y Holley, R. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1): 1-9.
- Gnabre, J., Ito, Y., Ma, Y., y Huang, R. 1996. Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 719(2): 353-364.
- González, A., y Valenzuela, A. 2007. The postharvest use of synthetic fungicides, implications on human health. In: *Recent Advances in Alternative Postharvest Technologies to Control Fungal Diseases in Fruits and Vegetables*. Troncoso, R. Tiznado, M. y González, A. (Eds), Transworld Research Network. India, 1(1): 1-20.
- Govindarajan, V., y Sathyanarayana, M. 1991. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on Physiology, Pharmacology, Nutrition, and Metabolism; Structure, Pungency, Pain, and Desensitization Sequences. *Food Science Nutrition*, 29(6): 435-473.

- Gutiérrez, P., Bautista, S., y Barrera, L. 2012. Uso Potencial de Extractos Vegetales, aceites esenciales y Quitosano para Reducir el Daño Causado por Hongos Postcosecha en Productos Hortofrutícolas. Avances en ciencia y tecnología alimentaria en México: 485-495.
- Gutiérrez, P., Lopez, A., Beltran, H., Jimenez, M., y Baños, S. 2014. Tecnologías Para la Sanidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Vegetal. Análisis, Calidad y Procesamiento de los Alimentos en México, 1(1): 17.
- Helal, G., Sarhan, M., Abu Shala, A., y El-Khair, E. 2007. Effect of *Cymbopogon citratos* L. essential oil on the growth morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strains. Journal of Basic Microbiology, 47(1): 5-15.
- Hernández, R. 2009. Sensibilidad a fungicidas poscosecha e identificación molecular del hongo *Colletotrichum spp.*, agente causal de la antracnosis en frutos de banano en Costa Rica. Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica, 1: 96.
- Huerta, G., Holguín, F., Benítez, F., y Toledo, J. 2009. Epidemiología de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 27(2): 93-105.
- Hwu, J., Tseng, W., Gnabre, J., Giza, P., y Huang, R. 1998. Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 1. Synthesis, structure identification, and inhibition of tat-regulated HIV transactivation. Journal of medicinal chemistry, 41(16): 2994-3000.
- Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y., y Panbangred, W. 2011. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum spp.*, the causative agent of anthracnose disease. BMC Research Notes, 4(1): 98-107.
- Jacometti, M., Wratten, S., y Walter, M. 2010. Review: alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. Australian Journal of Grape y Wine Research, 16(1): 154-172.
- Jasso, D., Rodríguez, R., Hernández, F., Villarreal, J., y Galván, A. 2007. Antifungal effects *in vitro* of semiarid plant extracts against postharvest fungi. Annual Meeting: Bringing Industrial Crops into the Future (AAIC), 1(1): 7-10.

- Jeihanipour, A., Karimi, K., y Taherzadeh, M. 2007. Antimicrobial Properties of Fungal Chitosan. *Research Journal of Biological Sciences*, 2(3): 239-243.
- Ledezma, E., Maniscalchi, M., y Espinoza, D. 2008. Sinergismo entre ajoeno y ketoconazol en aislamientos de *Microsporium canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF). *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(3): 157-162.
- Lira, R. 2003. "Estado Actual del Conocimiento Sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]". *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1): 214-222.
- Lira, R., Hernández, M., y Hernández, F. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (DC) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2): 211-216.
- Lira, R., Sanchez, M., Gamboa, R., Jasso, D., y Rodríguez, R. 2003. Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the Chihuahua and Sonora deserts on *Alternaria solani*. *Agrochimica*, 47(1): 50-60.
- Liu, J., y Balasubramanian, M. 2001. 1, 3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 1(2): 159-169.
- López, A., Alzamora, S., y Palou, E. 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 99(1): 119-128.
- López, L., Gutiérrez, P., Bautista, S., Jiménez, L., y Zavaleta, H. 2012. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad de mango cv. 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. *Revista Chapingo, serie Horticultura.*, 13(3): 315-331.
- Maqbool, M., Ali, A., y Alderson, P. 2010a. Effect of Cinnamon Oil on Incidence of Anthracnose Disease and Postharvest Quality of Bananas During Storage. *Journal Agriculture Biology*, 12: 516-520.
- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P., y Broga, J. 2010b. A combination of gum arabic and chitosan can control anthracnose caused by *Colletotrichum musae* and enhance the shelf-life of banana fruit. *The journal of horticultural science & biotechnology*, 85(5): 432.

- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P., Mohamed, M., Siddiqui, Y., y Zahid, N. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1): 71-76.
- Marangon, J., Newandram, C., Dev, D., y Moreira, M. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Chemical Ecology*, 34(1): 1213-1218.
- Marino, M., Bersani, C., y Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3): 187-195.
- Martínez, A., Cortez, M., Ezquerro, J., Graciano, A., Rodríguez, F., Castillo, M., Plascencia, M., y Yépez, Y. 2010. Chitosan composite lms: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 305-315.
- Maruris, A. 2008. Síntomas Ocasionados por Plaguicidas en Trabajadores Agrícolas. *Revista Medica, Institución Mexicana, Seguro Social*, 46(1): 145-152.
- Montoro, Y., Moreno, R., y Gomero, L. 2009. Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. *Revista Perú, Salud Pública*, 26(1): 466-472.
- Moreno, S., González, L., Salcedo, S., Cárdenas, M., y Perales, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium spp.* *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Sistema de Información Científica. Polibotánica*, 32(1): 193-205.
- Moreno, S., Salcedo, S., Cárdenas, M., Hernández, J., y Núñez, M. 2012. Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var *aviculare*) sobre el crecimiento in vitro de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica*, 34(1): 191-204.
- Moscoso, P., Montesinos, C., y Palou, L. 2013. Control of citrus postharvest *Penicillium* molds with sodium ethylparaben. *Crop protection*, 46: 44-51.
- Mourey, A., y Canillac, N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13(4): 289-292.

- Munir, A., Hensel, O., Scheffler, W., Hoedt, H., Amjad, W., y Ghafoor, A. 2014. Design, development and experimental results of a solar distillery for the essential oils extraction from medicinal and aromatic plants. *Solar Energy*, 108: 548-559.
- Muñoz, Z., Moret, A., y Garcés, S. 2009. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum spp.* on tomatoes and grapes. *Crop protection*, 28(1): 36-40.
- Nuangmek, W., Mckenzie, E., y Lumyong, S. 2008. Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Journal Microbiology*, 3(1): 368-374.
- Ortega, M., Robles, M., Acedo, E., González, A., Morales, A., y Vázquez, L. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. WATS) essential oil. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(1): 11-17.
- Osorio, E., Flores, M., Hernández, D., Ventura, J., Rodríguez, R., y Aguilar, C. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial crops and products*, 31(1): 153-157.
- Pacheco, H. 2010. Evaluación del Repelente Botánico Capsialil 9.37 EC (Aceite de Capsaicina y Alil Isotiosianato) Para Control de Cochinilla Harinosa (*Dsymiscoccus Brevipes*) en el Cultivo de Piña (*Ananas Comosus*) [L.] Merr. Hibrido Md-2, Costa Rica. *Quimiagro S.A.*, 1(1): 1-18.
- Palma, J., Huang, I., Jansson, H., Salinas, J., Llorca, L., y Read, N. 2009. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*, 46(1): 585-594.
- Palma, J., Jansson, H., Salinas, J., y Lopez, L. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of applied microbiology*, 104(2): 541-553.
- Palma, J., Lopez, J., Pérez, A., Huang, I., Jansson, H., Salinas, J., Villalaín, J., Read, N., y Lopez, L. 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular microbiology*, 75(4): 1021-1032.

- Peñuelas, O., Arellano, M., Vargas, I., Lares, F., Cantú, E., Hernández, S., Gutiérrez, M., y Mungarro, C. 2015. Bioactividad in vitro de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*. *Polibotánica*(40): 183-198.
- Plascencia, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo, M., y Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10): 582-586.
- Rodríguez, E. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1): 153-170.
- Rodríguez, E., González, J., y Mayek, N. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1): 53-63.
- Rosenstein, E. 2004. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES AGROQUIMICAS. Ster. THOMSON PLM, S.A. DE C.V., 14(1): 388.
- Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A., y Gómez, L. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum spp.*, aislado de banano (*Musa spp.*) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agronomía Costarricense: Revista de Ciencias Agrícolas*, 36(1): 53-68.
- Sangeetha, G., Thangavelu, R., Rani, S. U., y Muthukumar, A. 2013. Antimicrobial activity of medicinal plants and induction of defense related compounds in banana fruits cv. Robusta against crown rot pathogens. *Biological Control*, 64(1): 16-25.
- SCBT. 2016. Santa Cruz Biotechnology Inc. Recuperado el 7 de Julio del 2016 de: <http://www.scbt.com/es/datasheet-358396.html>.
- SE. 2012. Monografía Del Sector Plátano En México: Situación Actual Y Oportunidades De Mercado. Dirección General De Industrias Básicas, Secretaría de Economía (SE): 19.
- SENASA. 2010. *Colletotrichum musae*. Servicio Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas - SENASA. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias.*, 243.

- Setu, B., Kebede, W., y Amare, A. 2014. Antifungal Activity of Some Plant Extracts against (*Colletotrichum Musae*) the Cause of Postharvest Banana Anthracnose. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 05(02). doi: 10.4172/2157-7471.1000226
- Singh, S., Asad, A., Ahmad, A., Khan, N., y Hadi, S. 2001. Oxidative DNA damage by capsaicin and dihydrocapsaicin in the presence of Cu(II). *Cancer Letters*, 169(1): 139-146.
- Su, Y., Noireung, P., Liu, F., Hyde, K., Moslem, M., Bahkali, A., Abdelsalam, K., y Cai, L. 2011. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. *Mycoscience*, 52(1): 376-382.
- Surh, Y., y Lee, S. 1995. Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Science*, 56(22): 1845-1855.
- Suzuki, T., Tanaka, C., Ebihara, Y., Ito, Y., y Uematsu, S. 2010. Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry (*Fragaria X ananassa Duchesne*). *Journal of Genetic Plant Pathology*, 76(1): 247-253.
- Taborda, L., Sánchez, M., Bonilla, C., y Huertas, C. 2015. Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. *Open Journal Systems. Acta Agronómica*, 64(1): 93-99.
- Thines, E., Anke, H., y Weber, R. 2004. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycological Research*, 108(01): 14-25.
- Ultee, A., Bennik, M., y Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4): 1561-1568.
- Umaña, G., y García, J. 2009. Efficacy of Plant Extracts on Growth Reduction of *Colletotrichum musae* and *Fusarium proliferatum*, Causal Agents of Crown Rot of Bananas. *International Conference on Postharvest and Quality Management of Horticultural Products of Interest for Tropical Regions 906*: 205-210.
- Vargas, I., Contreras, A., y Martínez, M. 2009. Lignans from *Larrea tridentate* (creosote bush) as fungal β -1, 3-glucanase inhibitors. *Pesticide biochemistry and physiology*, 94(2): 60-63.

- Velásquez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1): 1-22.
- Velázquez, M., Hernández, A., Guerra, M., y Mariaca, G. 2012. Chitosan as an alternative to control phytopathogenic fungi on fruits and vegetables in Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37): 6606-6611.
- Waizel, J., y Morfín, R. 2011. El género *Capsicum spp.* ("chile"). Una versión panorámica. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica*, 60(16): 67.
- Wang, C., Zhang, J., Chen, H., Fan, Y., y Shi, Z. 2010. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Tropical Plant Pathology*, 35(3): 137-143.
- Weir, B., Johnston, P., y Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73: 115-180.
- Whitman, S., Gezginci, M., Timmermann, B., y Holman, T. 2002. Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12): 2659-2661.
- Zakaria, L., Sahak, S., Zakaria, M., y Salleh, B. 2009. Characterisation of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose of Banana. *Tropical Life Sciences Research*, 20(2): 119-125.