



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa de Posgrado Integral en Biotecnología
Doctorado en Ciencias en Biotecnología de
Alimentos

**Identificación de compuestos con actividad
antifúngica en plantas nativas del estado de
Sinaloa y su uso potencial para inhibir
antracnosis en papaya**

T E S I S

Que presenta

MC. Jordi Gerardo López Velázquez

como requisito para
obtener el grado de

Doctor en Ciencias en
Biotecnología de Alimentos

Directores

Dr. Misael Odín Vega García
Dr. Francisco Delgado Vargas

Culiacán, Sinaloa, México

Marzo del 2023



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



Presentación

La presente investigación, titulada “Identificación de compuestos con actividad antifúngica en plantas típicas del estado de Sinaloa y su uso potencial para inhibir antracnosis en papaya” se llevó a cabo en los laboratorios de “Fisiología y Tecnología Poscosecha” y “Química de Productos Naturales” en el Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Las Dras. Silvia Bautista Baños, Gabriela López Angulo y Lidia Elena Ayón Reyna participaron como Asesores Académicos. El Dr. Misael Odín Vega García y el Dr. Francisco Delgado Vargas fungieron como Directores de Tesis. El MC Jordi Gerardo López Velázquez recibió Beca Nacional para Estudios de Posgrado (Doctorado en Ciencias) por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante la realización de estudios de doctorado (cuatro años).

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE CUADROS	VII
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
III. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	6
A. PAPAYA.....	6
1. Generalidades.....	6
2. Descripción anatómica del fruto.....	8
3. Composición química.....	8
4. Importancia económica.....	11
5. Manejo poscosecha.....	11
a. Pérdidas poscosecha.....	14
B. PROBLEMAS FITOPATOLÓGICOS EN FRUTOS DE PAPAYA.....	15
1. Antracnosis.....	15
a. Proceso de infección.....	16
1. Medidas de control.....	21
C. FUNGICIDAS DE ORIGEN NATURAL.....	24
1. Diversidad florística en México y Sinaloa.....	24
2. Plantas como fuente de compuestos bioactivos.....	24
a. Plantas y compuestos naturales con actividad antifúngica.....	25
b. Plantas del estado de Sinaloa con actividad antifúngica.....	28
IV. JUSTIFICACIÓN.....	31
V. HIPÓTESIS.....	32
VI. OBJETIVOS.....	33

A.	OBJETIVO GENERAL.....	33
B.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
A.	DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	34
B.	MATERIALES.....	35
1.	Material vegetal.....	35
2.	Microorganismos.....	35
C.	MÉTODOS	35
1.	Etapa 1: Selección de la Fracción Más Activa (FMA) de los extractos de frutos nativos de Sinaloa.....	35
a.	Extractos.....	35
i.	Elaboración de las harinas	35
ii.	Extractos metanólicos (EM).....	36
iii.	Fraccionamiento de los EM	36
iv.	Preparación de los EM y fracciones	36
b.	Ensayos <i>in vitro</i>	36
i.	Actividad antifúngica de los EM.....	36
ii.	Toxicidad <i>in vitro</i> de los EM.....	37
iii.	Actividad antifúngica y toxicidad de las fracciones	37
iv.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	38
c.	Ensayos <i>in vivo</i>	38
i.	Incidencia y severidad de antracnosis	38
ii.	Parámetros de calidad.....	38
d.	Análisis fitoquímico	39
e.	Selección de la fracción más activa (FMA)	40
f.	Diseño estadístico.....	40
2.	Etapa 2: Toxicidad y caracterización química	40
a.	Toxicidad aguda de la FMA	40
b.	Identificación de compuestos con actividad antifúngica en la FMA	41
i.	Separación en columna abierta	41
ii.	Actividad antifúngica mediante ensayo de microdilución.....	41

iii.	Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)	41
iv.	Aislamiento y evaluación antifúngica del triterpeno	42
v.	Identificación, cuantificación y actividad antifúngica del ácido caprílico (AC).....	42
c.	Diseño estadístico.....	43
3.	Etapa 3: Mecanismo.....	43
a.	Germinación de esporas	43
b.	Crecimiento micelial	43
c.	Ensayos de protección.....	44
d.	Lixiviación de contenido intracelular	44
e.	Efecto sobre la microestructura	45
i.	Microscopía de fluorescencia confocal	45
ii.	Análisis de imágenes.....	45
f.	Diseño estadístico.....	46
4.	Etapa 4: Actividad antifúngica <i>in vivo</i> de la subfracción	46
a.	Incidencia y severidad de antracnosis	46
b.	Diseño estadístico.....	47
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
A.	ETAPA 1: SELECCIÓN DE LA FMA	48
1.	Ensayos <i>in vitro</i>	48
a.	Extractos metanólicos	48
b.	Fracciones	51
c.	Determinación de la CMI.....	53
2.	Ensayos <i>in vivo</i>	53
a.	Incidencia y severidad de antracnosis	55
b.	Parámetros de calidad	58
3.	Análisis fitoquímico.....	60
4.	Selección de la FMA	62
B.	ETAPA 2: TOXICIDAD Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....	62
1.	Toxicidad aguda de la FMA.....	62
2.	Identificación de compuestos con actividad antifúngica en la FMA.....	64

a.	Separación en columna abierta	64
b.	Análisis mediante GC-MS	66
c.	Aislamiento y evaluación antifúngica del triterpeno	69
i.	Aislamiento	69
ii.	Evaluación antifúngica	69
d.	Identificación, cuantificación y evaluación antifúngica del ácido caprílico	69
i.	Identificación y cuantificación	69
ii.	Evaluación antifúngica	71
C.	ETAPA 3: MECANISMO	71
1.	Germinación de esporas	71
2.	Crecimiento micelial	73
3.	Ensayos de protección	75
4.	Lixiviación del contenido intracelular	77
5.	Efecto sobre la microestructura	79
D.	ETAPA 4: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA <i>IN VIVO</i> DE LA SUBFRACCIÓN	86
1.	Incidencia y severidad de antracnosis	86
IX.	CONCLUSIONES	90
X.	BIBLIOGRAFÍA	91
XI.	APÉNDICES	103
A.	ABREVIATURAS	103
B.	ANEXOS	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Proceso de maduración de frutos de papaya.	7
2	Microfotografías de frutos de papaya.	9
3	Sintomatología de antracnosis en frutos de papaya cv. Maradol.	17
4	Características morfológicas de <i>C. gloeosporioides</i> .	18
5	Etapas del proceso de infección de <i>Colletotrichum</i> spp. reportadas en México.	19
6	Mecanismos de colonización adoptados por las especies de <i>Colletotrichum</i> .	22
7	Imágenes representativas de frutos de papaya infectados con <i>C. gloeosporioides</i> y tratados con fracciones de pulpa de <i>V. mollis</i> (fracción hexánica, FH; fracción de acetato de etilo, FAE). Tiabendazol (TBZ) se usó como control positivo.	56
8	Efecto de la aplicación de fracciones de pulpa de <i>V. mollis</i> (fracción hexánica, FH; fracción de acetato de etilo, FAE) sobre la incidencia (A) y severidad (B) de antracnosis en frutos de papaya durante su almacenamiento a 13 °C.	57
9	Cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la subfracción FH ₃ .	67
10	Cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la subfracción FH ₃ (A), ácido caprílico (B), y subfracción FH ₃ + ácido caprílico (C).	70
11	Germinación de esporas (A) y crecimiento micelial (B) de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> tratado con hexano (control), tiabendazol (TBZ) y la subfracción FH ₃ (0.25 and 0.50 mg/mL).	72
12	Imágenes representativas de esporas germinadas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> tratadas con hexano (control), y la subfracción FH ₃ (0.50 mg/mL).	74

13	Muestras de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> observadas mediante microscopía confocal.	80
14	Muestras de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> observadas mediante microscopía de fluorescencia confocal a 558 nm de excitación y 734 nm de emisión.	81
15	Imágenes representativas de frutos de papaya infectados con <i>C. gloeosporioides</i> y tratados con la subfracción FH ₃ (0.5 y 1 mg/mL). Tiabendazol (TBZ) y Tween-80 se usaron como control positivo y negativo, respectivamente.	87
16	Efecto de la aplicación de la subfracción FH ₃ (0.5 y 1 mg/mL) sobre la incidencia (A) y severidad (B) de antracnosis en frutos de papaya durante su almacenamiento a 23 °C. Tiabendazol y Tween-80 se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente.	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Contenido nutrimental de frutos de papaya.	10
2	Principales países productores de papaya en el 2020.	12
3	Principales estados productores de papaya en 2021.	13
4	Plantas y compuestos naturales con actividad antifúngica.	27
5	Modelos vegetales del estado de Sinaloa con actividad antifúngica.	29
6	Rendimiento de extracción, actividad antifúngica contra <i>C. gloeosporioides</i> y toxicidad <i>in vitro</i> de extractos metanólicos de plantas típicas del estado de Sinaloa.	49
7	Rendimiento de extracción, actividad antifúngica contra <i>C. gloeosporioides</i> y toxicidad <i>in vitro</i> de fracciones provenientes de extractos metanólicos con actividad antifúngica.	52
8	Efecto de la concentración de extractos metanólicos y fracciones provenientes de estos sobre la inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> .	54
9	Parámetros de calidad de frutos de papaya infectados con <i>C. gloeosporioides</i> y tratados con fracciones de <i>V. mollis</i> y tiabendazol (TBZ). Los frutos fueron almacenados por 16 d a 13 °C.	59
10	Análisis fitoquímico de las fracciones hexánica y acetato de etilo de pulpa de <i>V. mollis</i> .	61
11	Ganancia de peso y peso de órganos (g) de ratones bal/c tras 30 días de la administración de la FMA a 2 g/kg.	63
12	Rendimiento, factor de retardo y actividad antifúngica contra <i>C. gloeosporioides</i> de subfracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de la FMA.	65
13	Datos cromatográficos de la subfracción FH ₃ .	68
14	Efecto de la adición de ácidos grasos (ácido linoleico y palmítico), ergosterol y sorbitol sobre la CMI de la subfracción FH ₃ .	76

15	Lixiviación de proteína, ADN y electrolitos en esporas y micelio de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> tratados con la subfracción FH ₃ (0.25 and 0.50 mg/mL) y TBZ.	78
16	Dimensiones, entropía e intensidad de fluorescencia de esporas y micelio de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> tratadas con la subfracción FH ₃ (0.5 mg/mL), ácido caprílico (0.125 mg/mL) y tiabendazol (0.5 mg/mL).	83

I. RESUMEN

Los frutos de papaya tienen gran aceptabilidad en los mercados internacionales, se cultivan durante todo el año y representan una gran fuente de divisas para países tropicales y subtropicales. La papaya es un fruto con vida de anaquel corta debido a su tasa alta de respiración, además es altamente sensible a sufrir daños mecánicos que provocan una disminución de su calidad visual, así como una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades producidas por microorganismos como bacterias y hongos. La antracnosis genera las mayores pérdidas en los cultivos de papaya en el mundo y es causada principalmente por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, el octavo patógeno más dañino para la agricultura en el mundo. En el control de la antracnosis se utilizan principalmente fungicidas sintéticos que han generado resistencia del patógeno y daños ambientales y a la salud humana. En este sentido, existen reportes de extractos de plantas que pueden ser efectivos para reducir la incidencia de hongos fitopatógenos en los frutos cosechados. Al respecto, diferentes especies vegetales nativas de México y del estado de Sinaloa presentan una importante actividad contra hongos y levaduras; sin embargo, aún se desconoce el potencial de las especies vegetales nativas de Sinaloa para inhibir el desarrollo de la antracnosis en frutos de papaya. Por lo tanto, los objetivos de la presente investigación fueron identificar los compuestos principales de plantas de Sinaloa con actividad para inhibir el desarrollo de antracnosis y evaluar su mecanismo de acción contra *C. gloeosporioides*. Se evaluó la actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* y toxicidad *in vitro* de extractos metanólicos de nueve plantas nativas del estado de Sinaloa y sus respectivas fracciones. Las plantas modelo fueron las siguientes: *Bromelia pinguin* L., *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied., *Spondias purpurea* L., *Pithecellobium dulce* Roxb. (Benth.), *Randia echinocarpa* Moc. & Sessé ex DC., *Vitex mollis* Kunth, *Echeveria subrigida* (B.L. Rob. & Seaton) Rose, *E. craigiana* Walther y *E. kimnachi* Meyrán & Vega. El extracto metanólico del fruto de *V. mollis* (VM) se seleccionó como el más activo contra *C. gloeosporioides in vitro*. El fraccionamiento biodirigido mostró que las fracciones hexánica (FH-VM) y en acetato de etilo (FAE-VM) de la pulpa de *V. mollis* presentaron las mejores propiedades antifúngicas y menor toxicidad contra *Artemia salina*. Las FH-VM y FAE-VM se aplicaron en frutos de

papaya, y se observó que la FH-VM redujo en mayor medida la incidencia y severidad de antracnosis en papaya, sin afectar negativamente algunas variables de calidad del fruto. Por lo tanto, la FH-VM se seleccionó como la fracción más efectiva (FMA) y utilizada en los análisis posteriores. La FH no causó toxicidad aguda en ratones BALB/c ($LD_{50} > 2$ g/kg). La separación en columna abierta de la FH-VM resultó en 7 subfracciones (FH₁-FH₇). La subfracción FH₃ mostró las mejores propiedades antifúngicas con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.5 mg/mL. La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de la subfracción FH₃ permitió identificar tres componentes principales: 4-decenoato de metilo, ácido caprílico (AC) y 24-metilencicloartanol. La actividad se asoció directamente con el AC (CMI = 0.125 mg/mL). La subfracción FH₃ inhibió en gran medida la germinación y crecimiento radial de *C. gloeosporioides*; además, los análisis revelaron que la cepa utilizada en este estudio (número de accesión HM222960.1) fue resistente al fungicida tiabendazol. Por otro lado, en las esporas tratadas se observó interacción entre el AC con ácidos grasos (ácido palmítico y linoleico) y sorbitol, lo que sugiere un mecanismo asociado al daño de pared celular y cambios en la permeabilidad de la membrana en las esporas, de igual manera se observó la lixiviación de proteína, ADN y electrolitos, mientras que, en el micelio únicamente se presentó lixiviación de electrolitos. Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal confirmaron el daño a nivel de pared celular, membrana plasmática y organelos por acción principalmente del AC. Finalmente, la subfracción FH₃ mostró un mejor efecto en la inhibición de antracnosis en papaya que el tiabendazol. Por lo tanto, la presente investigación propone la implementación de la subfracción FH₃ obtenida a partir de pulpa de *V. mollis* como agente contra la antracnosis, considerando que su principio activo (AC) no es tóxico y es biodegradable.

ABSTRACT

Papaya fruit has great acceptability in abroad markets and since this fruit is grown throughout the year, it represents a great economic advantage for the tropical and subtropical countries in which it is grown. Papaya has a short shelf life due to its high respiration rate, it is highly sensitive to mechanical damage that causes a decrease in its visual quality, and a greater susceptibility to develop phytopathologies produced by microorganisms such as bacteria, and fungi. Anthracnose is a disease that generates the greatest losses in papaya worldwide, and is caused mainly by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, which is considered the eighth most harmful pathogen for agriculture. Synthetic fungicides are mainly used to control this disease; However, its constant application has generated resistance of the pathogen and has many disadvantages to the environment, and there are some reports where its safety is questioned. In the literature, it has been previously reported that the application of plant extracts is effective to reduce the incidence of phytopathogenic fungi in harvested fruits. In addition, different native and endemic plant models from Mexico and Sinaloa have shown important antifungal properties; however, the potential of these models to inhibit the development of anthracnose in papaya is still unknown. Therefore, the present work aims to identify compounds in plants of the state of Sinaloa with activity to inhibit the development of anthracnose and to evaluate their mechanism against *C. gloeosporioides*. Among the methanolic extracts and its respective fractions from nine typical plants from Sinaloa, Mexico (*Bromelia pinguin* L., *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied., *Spondias purpurea* L., *Pithecellobium dulce* Roxb. (Benth.), *Randia echinocarpa* Moc. & Sessé ex DC., *Vitex mollis* Kunth, *Echeveria subrigida* (B.L. Rob. & Seaton) Rose, *E. craigiana* Walther y *E. kimnachi* Meyrán & Vega). The hexane (HF-VM) and ethyl acetate (EAF-VM) fractions of *Vitex mollis* (pulp) had the best antifungal properties and the lowest toxicity against *Artemia salina*. The HF-VM and EAF-VM were applied on papaya fruit, and the HF-VM was better to reduce the incidence and severity of anthracnose, and did not negatively affect any of the evaluated quality parameters, therefore, this fraction was selected as the most effective fraction, and was used in subsequent analyzes. HF-VM showed a lethal dose (LD₅₀) value greater than 2 g/kg in BALB/c mice, thus fitting into the category of lower toxicity. The silica gel separation of

HF-VM resulted in 7 subfractions (HF₁-HF₇), and the subfraction HF₃ showed the best antifungal properties with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.5 mg/mL. In this subfraction, the presence of 3 main compounds was observed by gas chromatography coupled to mass spectrometry: methyl 4-decenoate, caprylic acid (CA) and 24-methylenecycloartanol. The antifungal activity was directly associated with CA, showing a MIC value of 0.125 mg/mL. The subfraction HF₃ inhibited the germination and micelial growth of *C. gloeosporioides*. In addition, these analyzes revealed that the strain used in this study (accession number HM222960.1) is resistant to thiabendazole (TBZ). Interaction between caprylic acid and fatty acids or sorbitol was observed in the treated spores, suggesting a mechanism associated with damage on the cell wall and plasmatic membrane. It was also observed that treated spores presented leakage of protein, DNA and electrolytes; meanwhile, on treated mycelium there was only electrolyte leakage. The images obtained with a confocal fluorescence microscope confirmed the damage on the cell wall, plasmatic membrane and organelles by CA. Finally, the subfraction HF₃ had a strong effect to exhibit the development of anthracnose in papaya fruit, and showed better results compared to HF-VM. Therefore, the present study suggests the implantation of the subfraction HF₃ obtained from *V. mollis* pulp due to its high CA content, which is an innocuous and biodegradable substance.

II. INTRODUCCIÓN

Los frutos de papaya (*Carica papaya* L.) cuentan con un sabor excelente contenido nutrimental; además, se cultivan durante todas las estaciones del año tanto en regiones tropicales como subtropicales (Oliveira y Vitoria 2011). México ocupa el tercer lugar mundial en producción y en los últimos 30 años se ha duplicado (SAGARPA 2022).

Los principales problemas que se presentan durante el manejo poscosecha de los frutos de papaya son la pérdida acelerada de firmeza y la susceptibilidad a microorganismos patógenos (Ayón-Reyna y col. 2017a). Una de las mayores afecciones en frutos de papaya es una enfermedad poscosecha denominada antracnosis, y es originada por el hongo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*. Durante el desarrollo de esta enfermedad aparecen lesiones pequeñas y superficiales de coloración café o salmón que pueden crecer hasta 2.5 cm en diámetro. Con el fin de reducir la presencia de este hongo se han aplicado fungicidas sintéticos; sin embargo, su uso no ha resultado muy efectivo, ya que se reporta que cultivos tratados con fungicidas tienen una incidencia de antracnosis hasta de un 50%, además de que representan un riesgo para los consumidores y el medio ambiente (Ali y col 2015).

En atención a las desventajas de los fungicidas sintéticos, se ha optado por utilizar plantas como fuente de compuestos con actividad antifúngica; al respecto, un gran número de plantas han mostrado actividad contra hongos y levaduras (Looby y col. 2012; Martínez-Ruiz y col. 2013). Sin embargo, la actividad de extractos de plantas nativas del estado de Sinaloa, contra el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya, causada por *C. gloeosporioides*, aún no ha sido evaluada. Por ello, en la presente investigación se planteó identificar los compuestos de plantas nativas del estado de Sinaloa que inhiban el desarrollo de antracnosis y evaluar su mecanismo de acción contra *C. gloeosporioides*.

III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

A. PAPAYA

1. Generalidades

Los frutos de papaya (*Carica papaya* L.) son nativos de la región que abarca desde el suroeste de México hasta Costa Rica. Este fruto fue descrito por primera vez en 1526 y los colonizadores españoles lo llamaron “higo de mastuerzo” y “papaya de los pájaros”. Con el paso de los años, este cultivo se expandió por Sudamérica llegando a la India y a países orientales en el siglo XVIII y a Hawai a principios del siglo XIX (Semicol 2019).

El fruto de papaya se desarrolla en un árbol denominado papayo, el cual mide de 2 a 8 m de altura. El papayo cuenta con hojas grandes de pecíolo largo. La temperatura y el riego son de suma importancia para el desarrollo de este cultivo, requiere de una precipitación media de 1,800 mm³ y temperatura media entre 20 y 22 °C. El árbol puede resistir ligeras heladas; sin embargo, esto ocasiona que el fruto se desarrolle mal y no llegue a su madurez comercial (Jiménez-Díaz 2002).

Los frutos de papaya son una baya ovoide-oblonga, pesan entre 800 y 2000 g, presentan forma casi cilíndrica y son carnosos, jugosos y ranurados longitudinalmente en su parte superior. Por dentro, el fruto cuenta con numerosas semillas de coloración oscura. El pericarpio del fruto en madurez fisiológica es verde y cambia paulatinamente a amarillo o naranja cuando alcanza su madurez comercial (Figura 1) (Semicol 2019).

Actualmente se comercializan un gran número de variedades de papaya, las cuales se diferencian por sus adaptaciones climáticas. Entre las variedades de mayor importancia económica se encuentran: Bluestem, Graham, Betty, Puna, Sunrise, Sunset y Maradol, siendo esta última la que cuenta con mayor producción y venta en México. La variedad Maradol tiene forma de pera y pesa entre 1.5 y 2 kg, la cáscara es delgada y lisa, la pulpa es de color roja o amarilla y su sabor no es tan dulce como el de otras variedades (SAGARPA 2022).



Figura 1. Etapas del estado de madurez de frutos de papaya variedad Maradol. La etapa 0 representa la madurez fisiológica, mientras que la etapa 5 representa la madurez comercial.

Fuente: Semicol (2019).

2. Descripción anatómica del fruto

La papaya es una baya ovoide con un pericarpio y múltiples semillas. En la parte más externa de los frutos se encuentra la cutícula, la cual está constituida por una capa de ceras que tienen la función de disminuir la pérdida de agua desde el interior y mantener seca la superficie del fruto. Debajo de la cutícula se encuentra el tejido epidérmico, el cual se conforma de una capa de células de tamaño y forma uniforme (Figura 2A). Después de la epidermis hay varias capas de células parenquimáticas que se diferencian en tres regiones: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio o exocarpio es el estrato más periférico junto a la epidermis, está formado por células pequeñas, se caracteriza por su contenido de cloroplastos y carece de espacios intercelulares grandes; el epicarpio y la epidermis dan soporte al fruto. El mesocarpio es la zona media y está compuesto de células grandes e isodiamétricas con espacios intercelulares. La región más interna se llama endocarpio y está formado por células que son estrechas tangencialmente y desarrollan brazos grandes que se unen con las células adyacentes (Figura 2B) (Casarrubias-Carrillo y col. 2002; Ayón-Reyna y col. 2017a).

3. Composición química

De acuerdo a Low y Marezki (1982) los principales componentes de los frutos de papaya son agua (90%), carbohidratos (6%) y proteínas (0.8%) (Cuadro 1). Estos frutos destacan por su contenido alto de vitaminas A y C (1047 equivalentes de retinol y 84 mg de ácido ascórbico en 100 gramos de fruto fresco, respectivamente), siendo la papaya uno de los frutos que aporta más vitamina A, por lo tanto, con su consumo se pueden prevenir problemas de salud relacionados con la vista.

La composición nutrimental de la papaya depende del cultivar, calidad del suelo y la maduración del fruto. Los principales azúcares que la componen son glucosa, sacarosa y fructosa; la glucosa predomina durante los primeros estados de desarrollo del fruto y la sacarosa y fructosa en los estados finales de maduración. Los frutos maduros contienen cientos de compuestos volátiles, incluyendo numerosos ésteres que son los responsables del olor peculiar de los frutos de papaya (Oliveira y Vitoria 2011).

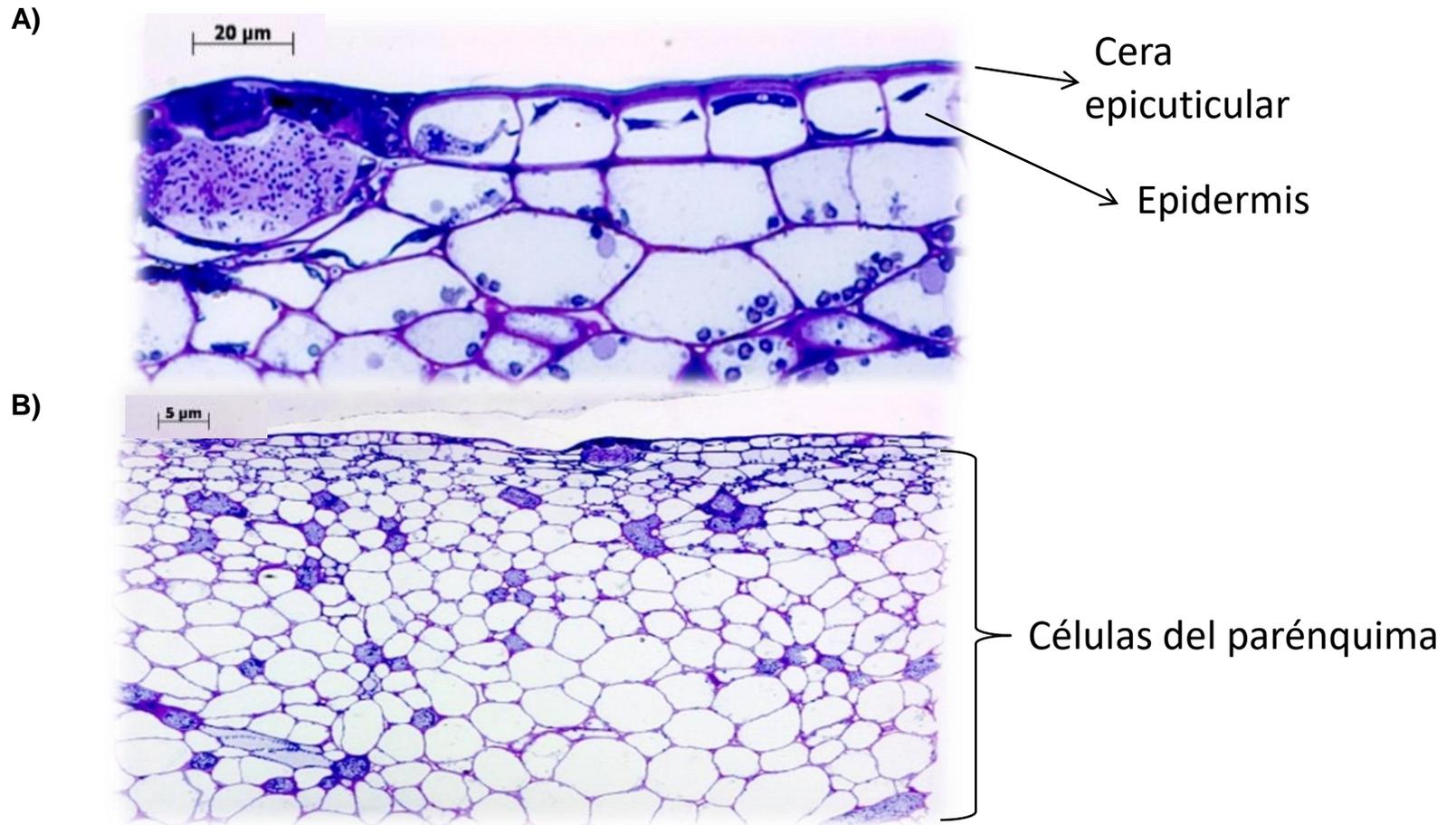


Figura 2. Microfotografías de la microscopía óptica de capas externas de frutos de papaya mostrando (A) cutícula y células epidérmicas y (B) células de parénquima.

Fuente: Ayón-Reyna y col (2017a).

Cuadro 1. Contenido nutrimental de frutos de papaya.

Componente	Contenido en 100 g de porción comestible
Proteínas (g)	0.80
Lípidos totales (g)	0.10
Hidratos de carbono (g)	6.32
Agua (g)	90.75
Cenizas (g)	0.94
Calcio (mg)	29
Fósforo (mg)	11
Hierro (mg)	0.2
Vitamina C (mg)	84
Vitamina A (eq. retinol)	1047
Vitamina B1 (mg)	0.03
Vitamina B3 (mg)	0.3

Fuente: Low y Maretzki (1982).

4. Importancia económica

Los principales países productores de papaya se encuentran en regiones tropicales y subtropicales, con posibilidades de cultivo durante todo el año, lo cual ofrece muchas ventajas económicas (Oliveira y Vitoria 2011). El aumento de la producción de papaya en México refleja su importancia comercial. La FAOSTAT (2022) registró un aumento de 121% durante los últimos 30 años, aunque el área de cultivo se redujo en un 10%. La mayor producción es explicada por la aplicación de mejores técnicas de sanidad, incrementando el rendimiento en 46%.

En el 2020, México ocupó el cuarto lugar en producción mundial de papaya superando el millón de ton (FAOSTAT 2022) (Cuadro 2). Esta producción satisface el consumo nacional anual, dejando un buen margen para su venta a mercados internacionales. Al respecto, México ocupó el primer lugar en exportación y sus principales destinos fueron Estados Unidos y Canadá, lo que generó ingresos de aproximadamente 78 millones de dólares.

En 2021, los principales estados productores de papaya en México fueron Oaxaca, Veracruz y Chiapas, aportando el 61% del volumen nacional (Cuadro 3). Sinaloa produjo 5,100 ton y el municipio de Mazatlán contribuyó con el 70% de la producción (SAGARPA 2022). A pesar de la baja producción en Sinaloa, el estado cuenta con un gran potencial para el cultivo de papaya debido a su localización, temperatura promedio y precipitaciones (Chávez-Sánchez y col 2013).

5. Manejo poscosecha

Los frutos de papaya pueden cosecharse una vez que alcanzan el estado verde-maduro (madurez fisiológica). La cosecha se realiza manualmente y por lo general se utilizan cuchillos para cortar el pedúnculo, los cuales deben de estar desinfectados para evitar la proliferación de enfermedades. El transporte hacia la agrícola debe realizarse lo más rápido posible, protegiendo a los frutos de las condiciones ambientales; asimismo, deben evitarse los movimientos bruscos que ocasionen lesiones e incrementan su velocidad de respiración y sensibilidad a infecciones por patógenos. A la llegada al empaque, la papaya debe seleccionarse con respecto a sus

Cuadro 2. Principales países productores de papaya en el 2020.

País	Producción (ton)
India	6,011,000
República Dominicana	1,271,303
Brasil	1,235,003
México	1,117,437
Indonesia	1,016,306
Nigeria	837,738
República del Congo	214,836
Cuba	189.086
Colombia	179,976
Venezuela	178,740

Fuente: FAOSTAT (2022).

Cuadro 3. Principales estados productores de papaya en el 2021.

Estado	Producción (ton)
Oaxaca	328,084
Colima	193,764
Chiapas	151,297
Veracruz	113,763
Michoacán	79,318
Guerrero	42,116
Campeche	30,320
Jalisco	23,670
Quintana Roo	15,898
Sinaloa	5,100

Fuente: SAGARPA (2022).

características de calidad básicas: toda aquella fruta que se encuentre podrida, deforme, sobre madura o que tenga daños y defectos en la cáscara será descartada para su comercialización en fresco. Con la selección se garantiza que únicamente los productos de buena calidad sean los que continúen con las siguientes operaciones, logrando así un ahorro al reducir las pérdidas poscosecha (Kader 2007).

Una vez seleccionados los frutos, para el control de plagas se han utilizado fungicidas a base de benzimidazoles, principalmente tiabendazol (no más de 500 partes por millón de ingrediente activo), ya sea solo o en combinación con agua caliente; sin embargo, la efectividad del tratamiento resulta limitada debido a la existencia de microorganismos resistentes. Este proceso se utiliza para la fruta que será exportada a países como Estados Unidos y Japón y tiene como objetivo eliminar la presencia de cualquier organismo que interfiera con el desarrollo normal del fruto y afecte su calidad sensorial y nutrimental (Gutiérrez-Alonso y col 2003; Basulto y col 2011).

Todo el material de empaque de los frutos deberá ser nuevo, limpio y estar diseñado para evitar daños externos e internos al producto. Los empaques deberán cumplir las exigencias de ventilación, calidad y resistencia para garantizar la integridad de las papayas en todo momento (Kader 2007). Para fines de exportación, las papayas se empaquetan en cajas de cartón corrugado y cada caja puede contener de 6 a 12 frutos. Además, cada fruta se envuelve en una malla de espuma para proteger su cáscara. El almacenamiento y transporte se realizan con temperatura y humedad relativa controlada, para alargar la vida útil de los frutos. Previo al almacenamiento, las cajas con papayas se enfrían hasta aproximadamente 10 °C empleando aire forzado. La temperatura de almacenamiento dependerá del estado de madurez de la papaya, debido a que los frutos tienden a ser más sensibles a las bajas temperaturas en las primeras etapas de maduración, la fruta madura puede conservarse una semana a 7 °C y en estado verde-maduro aproximadamente 3 semanas a 13 °C (FAO 2017).

a. Pérdidas poscosecha

Los productos hortofrutícolas son altamente perecederos debido a sus características fisiológicas, así como al ataque de plagas e infecciones. La

manipulación de las condiciones ambientales y de almacenamiento son clave para reducir las pérdidas poscosecha (Ventura y col 2004).

La pérdida de firmeza es el parámetro limitante de la vida poscosecha de los frutos de papaya y está asociada principalmente al catabolismo de diferentes polímeros de la pared celular como celulosa, pectina y hemicelulosa (Mercado-Silva y Aquino-Bolaños 2005). Este proceso aumenta la susceptibilidad al daño mecánico, ataque de insectos y enfermedades, impactando seriamente en la aceptación del consumidor (Natalini y col 2010). Se estima que las pérdidas poscosecha de papaya pueden ascender hasta un 50% y se deben principalmente a la incidencia de enfermedades ocasionadas por microorganismos (López-Navarrete y col 2009).

B. PROBLEMAS FITOPATOLÓGICOS EN FRUTOS DE PAPAYA

Las enfermedades poscosecha de productos hortofrutícolas se originan mayormente por hongos. Las bacterias son patógenos frecuentes de hortalizas, pero rara vez causan daño en frutos. La presencia de virus puede afectar a ciertos productos como raíces y tubérculos, pero no afectan a los frutos una vez cosechados (Kader 2007).

Los hongos son agentes fitopatógenos muy exitosos debido a su capacidad para generar esporas y a su fácil transporte por el viento. Los principales hongos que afectan a los cultivos de papaya son: *Phoma caricae-papayae*, *Phomopsis caricae-papayae*, *Phytophthora nicotianae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Alternaria alternata*. Sin embargo, las pérdidas en poscosecha asociada a estos patógenos es baja, debido a su limitada capacidad para penetrar la cáscara ilesa del fruto. La incidencia de estos hongos se da principalmente en frutos cosechados con herramientas contaminadas, frutos con daños mecánicos visibles o expuestos a temperaturas de daño por frío (Kader 2007). Por otro lado, especies de *Colletotrichum* spp. generan la enfermedad llamada antracnosis, la cual se presenta en gran incidencia en los frutos aún sin presentar daños físicos (Dean y col 2012).

1. Antracnosis

Colletotrichum es uno de los géneros más comunes e importantes de hongos fitopatógenos alrededor del mundo, prácticamente todos los cultivos son susceptibles a una o más especies del mismo. Este género es especialmente exitoso debido a que

ocasiona infecciones latentes que inician antes de la cosecha, desencadenando la aparición de síntomas de antracnosis hasta que el fruto ha sido almacenado o ya que se encuentre a la venta (Prusky, 1996). *Colletotrichum* puede crecer a partir de los 9 °C y su temperatura óptima está entre 26 y 29 °C (Kader 2007).

Colletotrichum gloeosporioides es el hongo causal de antracnosis en papaya. Los síntomas de antracnosis en este fruto aparecen como lesiones pequeñas y superficiales de una coloración café o color salmón con diámetro de hasta 2.5 cm (Figura 3). Las lesiones se hunden, pero usualmente no profundizan dentro de la pulpa del fruto y en etapas avanzadas de la infección se tornan de color café oscuro o negro (Rojo-Báez y col 2017a).

La identificación morfológica de *C. gloeosporioides* se realiza normalmente observando el tamaño y forma de conidios y apresorios, presencia o ausencia de setas y acérvulos, estado teleomorfo y características del cultivo (color de la colonia, textura y tasa de crecimiento) (Hyde y col 2009). *Colletotrichum gloeosporioides* presenta conidios en forma de bastón y de tamaño característico (13.56-14.24 × 4-4.02 μm) (Figura 4A), forma colonias de crecimiento micelial radial, con margen entero u ondulado y generalmente de coloración blanco con masas conidiales de color anaranjado en el centro de la colonia (Figura 4B) (Rojo-Báez y col 2017b).

a. Proceso de infección

Durante el proceso de infección por especies de *Colletotrichum* se presentan la siguiente secuencia de eventos: adhesión y germinación de la espora, penetración (formación de apresorios e inicio de infección latente), colonización (formación de hifas inter- e intra-celulares) y reproducción (producción de esporas). La duración de cada etapa en la infección varía con la especie de *Colletotrichum* y con la identidad del fruto (e.g., papaya, aguacate y chirimoya) (Kader, 2007); en frutos de papaya infectados con *C. gloeosporioides*, la adhesión y germinación ocurren a las 48 h después de la inoculación (hdi), la penetración a las 72 hdi, colonización a las 120 hdi y finalmente la reproducción a las 192 hdi (Casarrubias-Carrillo y col 2002) (Figura 5).

Aun cuando esta enfermedad se transmite principalmente mediante esporas, la mayoría de las partes vivas del hongo son capaces de crecer e inducir enfermedades



Figura 3. Síntomas de antracnosis en frutos de papaya cv. Maradol.

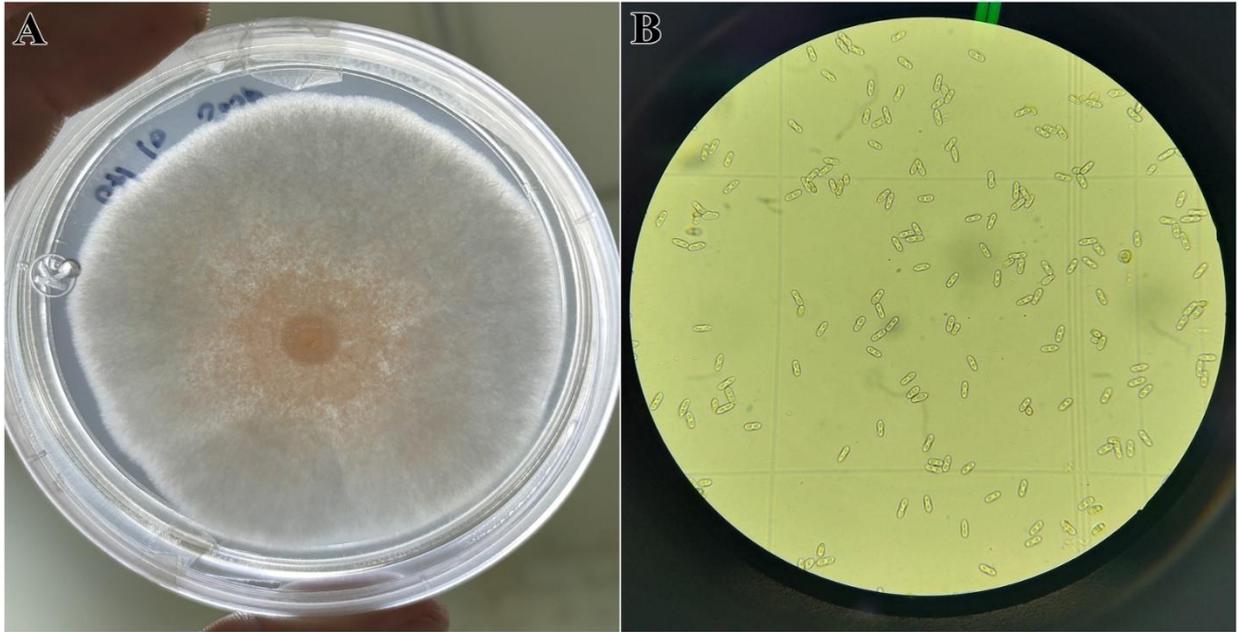
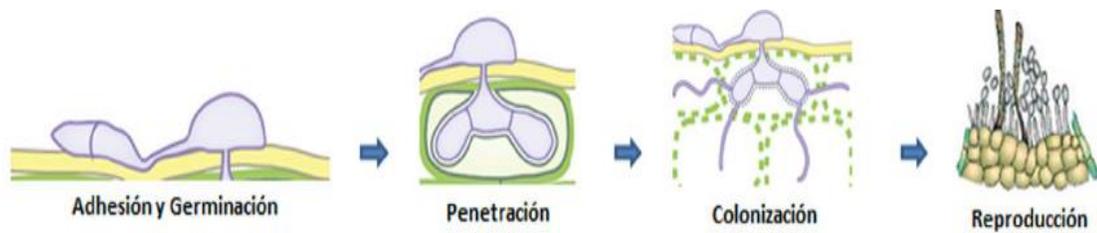


Figura 4. Características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides*.
A) Morfología colonial en agar papa dextrosa (PDA). B) Conidios asexuales.



<i>C. gloeosporioides</i>							
	Adhesión	Necrotrofia	Colonización	Reproducción			
Aguacate	48 hdi	72 hdi	120 hdi	144 hdi	192 hdi	216 hdi	288 hdi
Papaya	Germinación	Penetración	Colonización	Reproducción			
<i>C. fragarie</i>							
Chirimoya			6 - 9 hdi	24 hdi	72 hdi	Colonización	
			Germinación	Penetración	Reproducción		
<i>C. truncatum</i>							
Hoja papaya		Penetración		Colonización	Reproducción		
		20 hdi	30 hdi	72 hdi	120 hdi	148 hdi	
Fruto papaya			Penetración	Colonización	Reproducción		

Figura 5. Etapas del proceso de infección de *Colletotrichum* spp. reportadas en México. Fuente: Casarrubias-Carrillo y col (2002).

bajo condiciones favorables. Si una espora se deposita en un fruto, ésta germinará inmediatamente si las condiciones son favorables (Rojo-Báez y col 2017b). Además del agua, otras sustancias requeridas para la germinación son oxígeno, dióxido de carbono y compuestos orgánicos metabolizables. Al iniciar la germinación, la espora se hincha al absorber una gran cantidad de agua e incrementa rápidamente la cantidad de retículo endoplasmático, número de mitocondrias y síntesis de ARN, ADN y proteínas. Después del hinchamiento, un tubo germinativo sobresale a través de la cubierta de la espora. La germinación de la espora es un período riesgoso en la vida de un hongo, ya que las esporas son susceptibles a los efectos letales de los rayos ultravioleta, temperaturas bajas y altas, ausencia de oxígeno y exposición a productos químicos tóxicos (Kader 2007).

Los patógenos pueden penetrar al fruto por diferentes vías. Un grupo de hongos provocan la pudrición a través de magulladuras, picaduras, cortaduras, abrasiones y piquetes de insectos. El otro grupo, al cual pertenece *C. gloeosporioides*, forma apresorios melanizados que se adhieren al fruto con ayuda de una sustancia mucilaginosa. El apresorio cuenta con paredes gruesas a excepción de un poro en la parte inferior junto a la superficie del fruto, por donde se excretan enzimas como cutinasa, poligalacturonasa, xilanasa y celulasa; enzimas clave para el proceso de infección y alta patogenicidad de las especies de *Colletotrichum*. Una vez debilitada el área, la penetración se lleva a cabo por la presión ejercida por un tubo germinativo especializado denominado “estaquilla de infección”, este proceso representa el inicio de la infección en estado latente (Perfect y col 1999). En el caso de que la estaquilla de infección no supere la resistencia del fruto, la infección permanecerá latente hasta que la resistencia del fruto se reduzca. Cabe mencionar que el proceso de penetración antes mencionado ocurre normalmente cuando el fruto se encuentra en desarrollo en el huerto (Kader 2007).

El género *Colletotrichum* emplean dos mecanismos para colonizar tejido vegetal: mecanismo hemibiotrófico intracelular o intramural subcuticular. En el primero, el hongo penetra las células epidérmicas del hospedero, el micelio incrementa su tamaño, formando vesículas de infección y el micelio primario coloniza progresivamente nuevas células epidérmicas y mesófilas. Durante las primeras etapas

de la colonización, las células del hospedero se mantienen vivas; sin embargo, las hifas primarias forman hifas necrotróficas secundarias delgadas, las cuales se expanden, liberan enzimas hidrolíticas y degradan la pared celular y la membrana plasmática, ocasionando lesiones necróticas (Figura 6A). En el mecanismo intramural subcuticular, después del ingreso del micelio o hifa al tejido, el hongo se desarrolla bajo la cutícula formando el micelio intramural. En la siguiente etapa de infección, el micelio inter e intracelular penetra a las células epidérmicas y mesófilas, lo que ocasiona la necrosis de tejido infectado (Figura 6B) (Perfect y col 1999; Wharton y Dieguez-Uribeondo 2004). El mecanismo de penetración no solo varía con la especie de *Colletotrichum*, ya que se ha observado que una misma especie usa diferentes mecanismos dependiendo del fruto que esté infectando. Al respecto, en frutos de papaya se ha reportado que *C. gloeosporioides* usa un mecanismo intramural subcuticular (Rojo-Báez y col 2017a).

Una vez que las células epidérmicas y mesofílicas mueren, el contenido celular es liberado y degradado por el hongo con ayuda de amilasas, lipasas y proteasas. Los productos de la degradación son utilizados para generar la energía necesaria para llevar a cabo todos los procesos metabólicos y como precursores para la síntesis de sustancias requeridas para el desarrollo de *Colletotrichum* (Dean y col 2012). En esta etapa el hongo está en un estado óptimo para reproducirse. El proceso de reproducción se caracteriza por la aparición de acérvulos, los cuales crecen desde dentro del fruto y rompen su cutícula originando lesiones circulares de color marrón con textura acuosa. Los acérvulos son un tipo de estructura reproductiva la cual está formada por conidióforos, los cuales a su vez contienen una gran cantidad de esporas. Con la formación de los acérvulos, las esporas pueden ser transportadas por el viento a otros frutos y cerrar el ciclo de infección (Zavala-León y Alejo 2012).

1. Medidas de control

La antracnosis debe ser controlada desde la precosecha y entre las principales acciones de prevención se encuentran: uso de semillas libres de esporas, rotación de cultivos, uso de variedades resistentes y remoción de ramas muertas y frutos infectados. En poscosecha, las principales acciones de prevención incluyen tratamiento físico (refrigeración), control químico (fungicidas

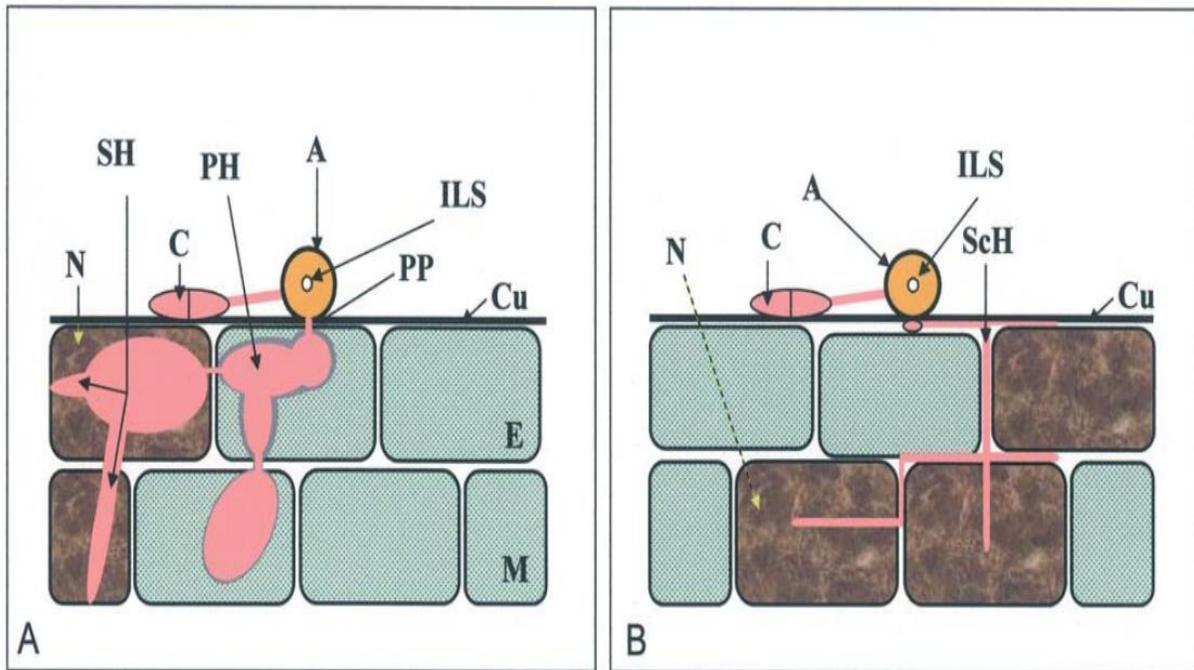


Figura 6. Mecanismos de colonización adoptados por las especies de *Colletotrichum*. Colonización hemibiotrófica intracelular (A) y colonización intramural subcuticular (B). C= Conidio, A= apresorio, PP= estaquilla de infección, Cu= cutícula del hospedero, ILS= punto de luz interno, PH= micelio primario, E= células epidérmicas, M= células mesófilas, N= interacción necrotrófica (representada en marrón), SH= micelio secundario delgado y ScH= ruta subcuticular.

Fuente: Rojo-Báez y col. (2017a).

sintéticos) y control biológico (extractos de plantas y microorganismos antagonistas) (Kader 2007).

El uso de fungicidas es de suma importancia para resguardar la calidad de los alimentos como frutas y hortalizas. Sin los fungicidas muchos productos hortofrutícolas nunca llegarían al consumidor. La aplicación de fungicidas modifica la superficie del fruto al remover el inóculo (desinfección) o inhibe el desarrollo de los patógenos con el fin de combatir infecciones antes o después del proceso de infección. Los fungicidas pueden prevenir e incluso detener y curar infecciones establecidas, lo que convierte a estas sustancias en potentes herramientas para el control de plagas. Uno de los fungicidas más utilizados para el control de antracnosis en papaya son tiabendazol, procloraz, propiconazol y benomil (Kader 2007; Basulfo y col 2011).

El mecanismo de acción del tiabendazol (TBZ) no está centrado en la inhibición de la germinación de esporas; ya que es más activo después de este proceso generando malformación de los tubos germinativos. El TBZ se absorbe fácilmente por las esporas, se distribuye por los orgánulos y se encuentra en mayor cantidad en el fluido citoplasmático. Anteriormente, el efecto de TBZ se atribuía a la inhibición de la síntesis de aminoácidos, al bloquear la transaminación catalizada por piridoxina y biotina. Sin embargo, el efecto principal del TBZ reside en alteraciones de la cadena transportadora de electrones a nivel de NADH y succinato oxidasa (Allen y Gottlieb 1970).

Por su parte, el fungicida procloraz actúa principalmente inhibiendo la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa, la cual es necesaria para la producción de ergosterol, un componente esencial de la membrana plasmática del hongo. Procloraz es un agente protector y curativo de amplio espectro, pudiéndose usar para combatir otros hongos como *Alternaria* spp. y *Botrytis* spp. (Gutiérrez-Alonso y col 2003).

El TBZ y procloraz han probado tener gran eficacia para inhibir el desarrollo de antracnosis en papaya; sin embargo, su aplicación en concentraciones altas por periodos largos ha generado la resistencia del patógeno y una gran contaminación ambiental, además pueden causar problemas en la salud del consumidor (López-Navarrete y col 2009; Ali y col 2015).

C. FUNGICIDAS DE ORIGEN NATURAL

Un gran número de fungicidas y pesticidas sintéticos se encuentran prohibidos o regulados debido a las posibles repercusiones sobre la salud humana o el medio ambiente (Toledo 1994). A consecuencia de la creciente preocupación de la población sobre el uso de estos fungicidas, un gran número de investigaciones relacionadas con el tratamiento de enfermedades poscosecha se han enfocado al uso de productos derivados de plantas, los cuales pueden representar una opción natural, inocua y amigable con el medio ambiente (Bautista-Baños y col 2003; Camacho-Hernández y col 2002; Looby y col 2012).

1. Diversidad florística en México y Sinaloa

En México se estima que existen aproximadamente 23,314 especies de plantas distribuidas en 297 familias y 2,854 géneros. Esta biodiversidad florística representa entre 10 y 12% del total mundial. Del total de especies, 11,600 son endémicas del país y 69 endémicas estrictas del estado de Sinaloa (Villaseñor 2016). Sinaloa presenta una gran variedad de ecosistemas debido a su gran variación altitudinal y a que el trópico de cáncer atraviesa el sur del estado, lo que propicia temperaturas elevadas y lluvias abundantes en verano. El estado puede dividirse en tres regiones: el sur es subtropical, el centro es semidesértico y al norte llegando con los límites de Sonora se vuelve desértico. Esta variabilidad de climas propicia que en Sinaloa se desarrolle un gran número de especies nativas, endémicas e introducidas (Toledo 1994).

Esta diversidad florística es un recurso que puede ser utilizado sustentablemente. Desde el inicio de la historia del hombre las plantas han jugado un papel clave en su desarrollo, diferentes partes de plantas han constituido materiales para la construcción, combustible, alimento e incluso medicinas. Al respecto, miles de especies silvestres en el mundo son fuentes potenciales de compuestos bioactivos con alguna utilidad para el ser humanos. Tan sólo en México, existen más de 5,000 especies de plantas que tienen algún uso conocido (Toledo 1994).

2. Plantas como fuente de compuestos bioactivos

El reino Plantae se caracteriza por su amplia producción de metabolitos. Esto debido a que, a diferencia de otros organismos las plantas cuentan con un arsenal extra de compuestos producidos a partir del metabolismo secundario. En todo

organismo vivo el metabolismo primario se enfoca principalmente en el transporte de solutos, producción de energía y biosíntesis de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Por otro lado, el metabolismo secundario cumple con funciones que no están relacionadas directamente con la viabilidad de la planta (Crozier 2006). Entre las principales funciones de los metabolitos secundarios se encuentra atraer y repeler animales. Muchos de los compuestos proporcionan cualidades sensoriales a flores y frutos con el fin de atraer insectos polinizadores y animales que utilizan a los frutos como alimento y ayudan a dispersar la semilla. Por otro lado, otras familias de metabolitos secundarios actúan para repeler depredadores, esto se logra gracias a que estos compuestos otorgan a las plantas un sabor amargo o inclusive en algunos haciéndolas venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009).

Entre los principales grupos de metabolitos secundarios se encuentran los terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados o alcaloides. Otros grupos de metabolitos menos comunes son betalainas, glucosinolatos, glucósidos cianogénicos y policetilenos. Estos metabolitos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todas las especies de plantas, éstos se sintetizan en pequeñas cantidades, estando a menudo en un determinado género, familia, o incluso en solo algunas especies (Crozier 2006).

Los metabolitos secundarios se extraen con gran éxito a partir de plantas, y estos se utilizan directamente como fármacos o como precursores para otras moléculas. Se estima que aproximadamente el 25% de los fármacos contienen al menos un componente derivado de algún modelo vegetal. Entre las actividades biológicas más sobresalientes de estos compuestos se encuentran: antitumoral, antiinflamatorio, antihipertensivo, hipoglucemiante, antibacteriano y antifúngico (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009).

a. Plantas y compuestos naturales con actividad antifúngica

Con respecto al uso de recursos florísticos para generar fungicidas naturales, diferentes estudios han identificado plantas y compuestos con importante actividad

para inhibir la germinación y crecimiento de una gran gama de hongos y levaduras (Cuadro 4).

Se ha reportado previamente el uso de aceites esenciales de plantas para combatir el desarrollo de hongos fitopatógenos. Estos aceites contienen metabolitos secundarios que se han estudiado por su actividad antimicrobiana y toxicidad baja; su composición incluye mezclas de aldehídos, terpenoides y alcoholes que suelen sintetizarse en respuesta a condiciones de estrés (Ávalos-García y Pérez-Urria 2009).

Previamente se han empleado aceites esenciales de menta y canela para combatir el desarrollo de antracnosis en papaya y chile, encontrándose un retraso importante en la severidad e incidencia de la enfermedad. Adicionalmente, se observó mayor retención de parámetros de calidad en los frutos tratados con los aceites (Ali y col 2014). En otro estudio se aisló del aceite esencial de cítricos el monoterpeno citral, este compuesto resultó muy efectivo para reducir totalmente la severidad de la antracnosis en frutos de papaya, observando mediante microscopía electrónica que este compuesto afecta en gran medida la microestructura del hongo (García y col 2008). A pesar de los resultados obtenidos con este tipo de materiales, el uso de aceites esenciales en la preservación de los alimentos está limitado frecuentemente por su costo alto y por su sabor y aroma intenso (Latifa y col 2012).

Otro compuesto con actividad antifúngica importante es la camptotecina (CPT-1), que es extraída de la corteza del árbol chino *Camptotheca acuminata*. La CPT-1 afecta a un variado grupo de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* y *Fusarium avenaceum*. Con respecto a su mecanismo de acción, la CPT-1 daña la morfología micelial y ultraestructural de *B. cinerea*, aumenta la fuga de electrolitos en el micelio y la actividad de la enzima peroxidasa. Por su parte, el compuesto 9-metoxicamptotecina (CPT-11), obtenido de igual manera de la corteza

Cuadro 4. Plantas y compuestos naturales con actividad antifúngica.

Compuesto (clasificación)	Especie vegetal (nombre común)	Actividad antifúngica	Referencia
8-gingerol (fenólico)	<i>Zingiber officinale</i> (gengibre)	<i>Alternaria alternata</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>	Ficker y col (2003)
Carvacrol (terpenoide)	<i>Origanum vulgare</i> (orégano)	<i>Candida albicans</i>	Latifa y col (2012)
Timol (terpenoide)	<i>Thymus vulgaris</i> (tomillo)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Latifa y col (2012)
6-(Fidroxibenzil) taxifolín-7-O-glucósido (fenólico)	<i>Mangifera indica</i> (mango)	<i>Alternaria alternata</i>	Kanwal y col (2010)
Pinocebrín-7-O-D-glucósido (fenólico)	<i>Ficus hirta</i> (higuera)	<i>Penicillium italicum</i>	Chen y col (2015)
Camptotecina (alcaloide)	<i>Camptotheca acuminata</i> (árbol feliz)	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Alternaria alternata</i>	Dong y col (2016)
9-metoxicamptotecina (alcaloide)	<i>Camptotheca acuminata</i> (árbol feliz)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Feng y col (2019)

del árbol *C. acuminata* presenta una importante inhibición de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en frutos de mango. Mediante microscópica óptica y electrónica se pudo observar que CPT-11 tiene un efecto importante sobre la formación de apresorios y la microestructura del micelio. Es relevante mencionar que la CPT-11 ha sido usada para el tratamiento contra el cáncer, observándose que únicamente entre el 11 y 29% de los pacientes presentan efectos secundarios (Feng y col 2019).

Los compuestos fenólicos han sido asociados con la capacidad para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides* debido a que se pueden difundir a través de la membrana celular de los hongos, e ingresar al citosol donde pueden interferir con diferentes rutas metabólicas. En este sentido, se ha encontrado que compuestos como los ácidos caféico, clorogénico y salicílico pueden interferir con la ruta de síntesis del ergosterol, el cual es un componente indispensable de la membrana celular en los hongos (Moiz y col 2013). Al respecto se ha encontrado que fenólicos presentes en la cáscara de granada como rutina, catequina y punicalagina son capaces de reducir la incidencia de mohos y levaduras en frutos de chile, además de alargar la vida de anaquel del fruto al mezclarse con quitosano (Nair y col 2018).

b. Plantas del estado de Sinaloa con actividad antifúngica

Estudios previos han demostrado que numerosas plantas nativas de Sinaloa presentan actividad antifúngica (Cuadro 5), algunos de los cuales se realizaron con frutos. Al respecto, la pulpa de los frutos de aguama, arrayán y papache presentaron actividad *in vitro* contra diferentes especies de hongos y levaduras patógenas (*Trichophyton* spp. y *Candida albicans*) para el ser humano (Camacho-Hernández 2002 y 2004).

El extracto clorofórmico del fruto de ciruela mexicana ha sido efectivo para inhibir hongos fitopatógenos como *Monoliophora pernicioso*, induciendo un severo estrés oxidativo observado mediante microscopía de fluorescencia. La actividad de este fruto fue atribuida a la presencia de ácidos grasos y terpenos como ácido linoleico, espatulenol, *trans*-cariofileno y α -muuroleno (Marisco y col 2017). Por su parte Bautista-Baños y col (2003) y Valencia-Botín y col (2018) encontraron que diferentes órganos como hojas, semillas y corteza de guamúchil y uvalama, respectivamente,

Cuadro 5. Modelos vegetales del estado de Sinaloa con actividad antifúngica.

Modelo vegetal (nombre común)	Órgano	Actividad antifúngica contra:	Referencia
<i>Bromelia pinguin</i> (Aguama)	Pulpa	<i>Trichophyton</i> spp.	Camacho-Hernández y col (2002)
<i>Psidium sartorianum</i> (Arrayán)	Pulpa	<i>Trichophyton</i> spp.	Camacho-Hernández y col (2004)
<i>Spondias purpurea</i> (Ciruela mexicana)	Pulpa	<i>Microsporum canis</i>	Marisco y col (2017)
<i>Echeveria leocotricha</i> (Suculenta)	Hoja	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Martínez-Ruiz y col (2013)
<i>Pithecellobium dulce</i> (Guamúchil)	Semilla	<i>Botrytris cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	Bautista-Baños y col (2003), Jayaraman y Arumugam (2012)
<i>Randia echinocarpa</i> (Papache)	Pulpa	<i>Candida albicans</i>	Salinas-Sánchez y col (2009)
<i>Vitex mollis</i> (Uvalama)	Hoja y corteza	<i>Fusarium</i> spp.	Valencia-Botin y col (2018)

inhibieron el crecimiento micelial de diferentes hongos de importancia agrícola (*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium* spp.).

A partir del conocimiento del posible potencial de estos frutos para inhibir hongos y levaduras, es importante incluir otras especies botánicas presentes en la región. En el estado de Sinaloa se ha encontrado que diferentes especies del género *Echeveria* exhiben un gran número de actividades biológicas (López-Angulo y col 2014 y 2016). Aunado a esto, Martínez-Ruiz y col (2013) observaron que la especie botánica *E. leucotricha* presentó una importante actividad antifúngica contra varios hongos patógenos para el ser humano y pertenecientes al género *Trichophyton*.

A pesar de la información existente sobre plantas nativas de Sinaloa, aún se desconoce cuál es el efecto de extractos de diferentes órganos de estas plantas sobre el desarrollo de la antracnosis en frutos de papaya, así como los compuestos asociados con dicha actividad y el probable mecanismo por el cual pudieran inhibir el proceso de infección de *C. gloeosporioides*.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los frutos de papaya tienen gran aceptación alrededor del mundo gracias a su sabor inigualable y elevado contenido nutrimental. Actualmente, México es uno de los mayores productores de papaya en el mundo, reportando grandes ganancias debido a que en el 2020 obtuvo el primer lugar en exportación. Sin embargo, el potencial económico de este fruto se encuentra afectado por problemas fitopatológicos, reportándose pérdidas poscosecha de hasta un 50%. La antracnosis es la principal enfermedad que afecta la producción y comercialización de los frutos de papaya; enfermedad ocasionada por el hongo *C. gloeosporioides*, que es considerado el octavo microorganismo más peligroso para la agricultura. En la actualidad se usan principalmente fungicidas sintéticos para contrarrestar la incidencia de hongos en frutos; sin embargo, su uso por tiempos prolongados no es recomendable debido a que se puede desarrollar resistencia en los microorganismos, además de que representan un riesgo para el medio ambiente y el consumidor. Como alternativas se han empleado fuentes naturales de compuestos con actividad antifúngica. Al respecto, México es un país megadiverso, ocupa el quinto lugar en biodiversidad florística y un gran número de ellas son endémicas; Sinaloa comparte esta característica y cuenta con más del 10% de la flora de México. En la literatura existen reportes de actividad antifúngica de flora de México y Sinaloa; en este contexto, resulta pertinente indagar el potencial antifúngico de plantas del estado de Sinaloa contra el hongo *C. gloeosporioides* como una posible estrategia para disminuir la incidencia de antracnosis en frutos de papaya.

V. HIPÓTESIS

Los compuestos presentes en plantas nativas del estado de Sinaloa (*Bromelia pinguin*, *Psidium sartorianum*, *Spondias purpurea*, *Pithecellobium dulce*, *Randia echinocarpa*, *Vitex mollis*, *Echeveria subrigida*, *Echeveria craigiana* y *Echeveria kimnachi*) representan una alternativa de baja toxicidad para inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya debido a una reducción en la patogenicidad de *C. gloeosporioides*.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Identificar los compuestos con actividad antifúngica de las siguientes plantas nativas del estado de Sinaloa: *Bromelia pinguin*, *Psidium sartorianum*, *Spondias purpurea*, *Pithecellobium dulce*, *Randia echinocarpa*, *Vitex mollis*, *Echeveria subrigida*, *E. craigiana* y *E. kimnachii*. Evaluar su toxicidad aguda, potencial como fungicida (*in vitro* e *in vivo*) y conocer el mecanismo de acción contra *C. gloeosporioides*.

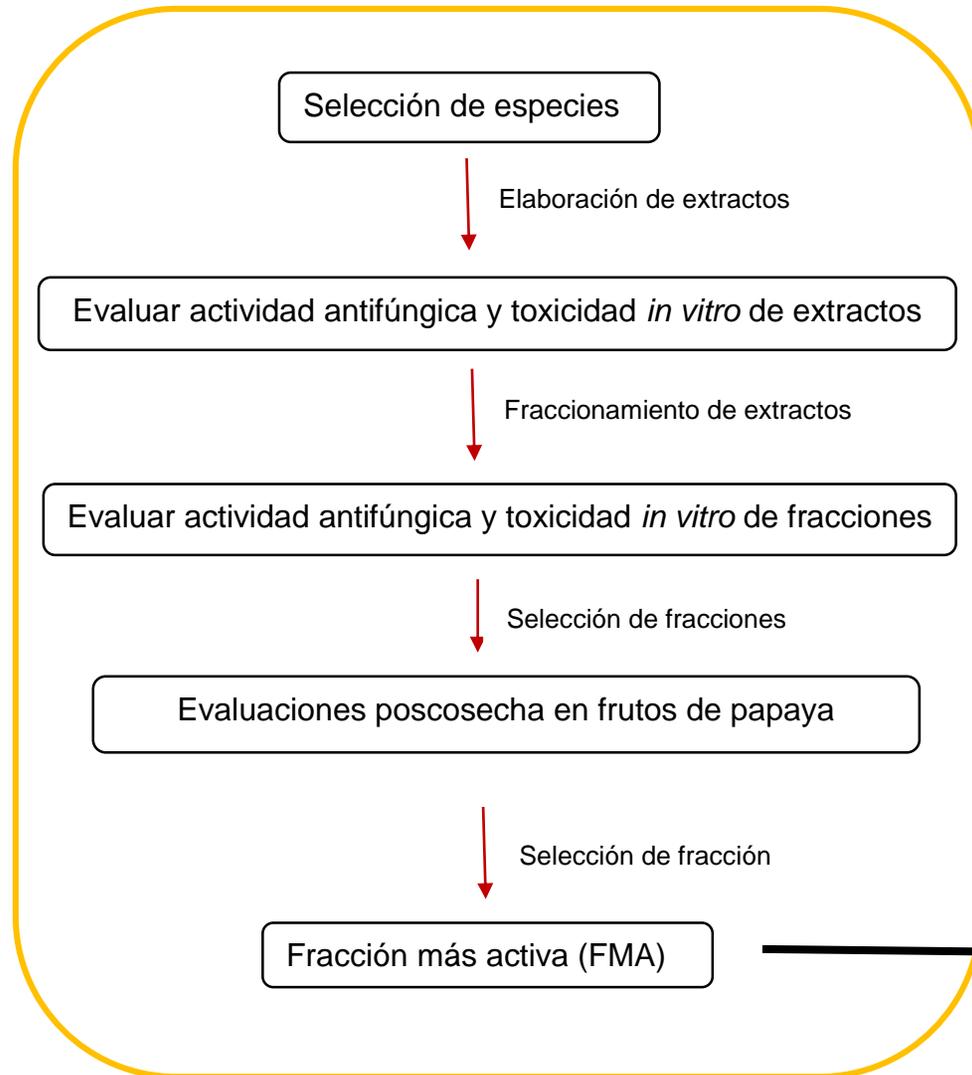
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la actividad *in vitro* contra *C. gloeosporioides* y toxicidad de extractos de 9 plantas del estado de Sinaloa.
2. Fraccionar los extractos más efectivos mediante fraccionamiento líquido-líquido y evaluar su actividad antifúngica y toxicidad *in vitro*.
3. Seleccionar la fracción más activa (FMA) con base en su efecto sobre el desarrollo de antracnosis y proceso de maduración en frutos de papaya.
4. Evaluar la toxicidad aguda de la FMA en un modelo murino.
5. Identificar los compuestos responsables de la actividad antifúngica.
6. Analizar el mecanismo de acción de los compuestos activos.
7. Evaluar el efecto antifúngico *in vivo* de la subfracción enriquecida en ácido caprílico obtenida a partir de la FMA.

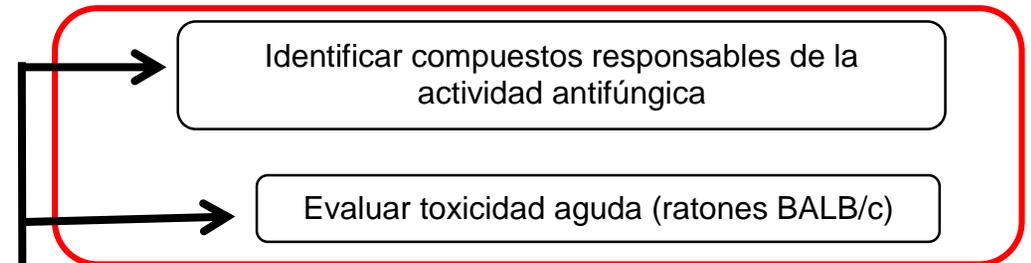
VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

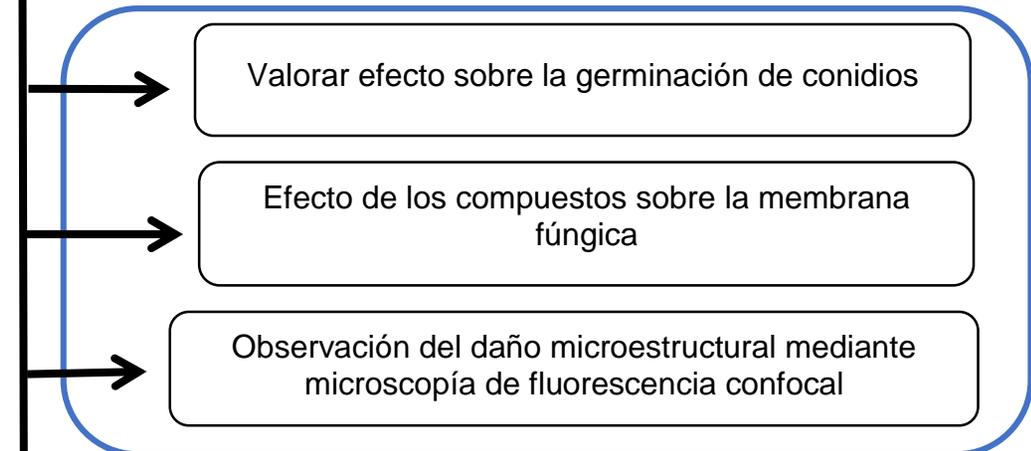
ETAPA 1: Selección de la FMA



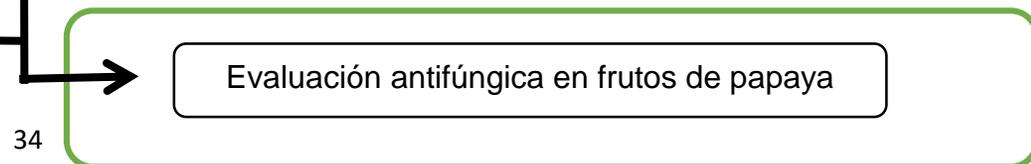
ETAPA 2: Toxicidad y caracterización química



ETAPA 3: Mecanismo



ETAPA 4: Actividad antifúngica *in vivo* de la subfracción



B. MATERIALES

1. Material vegetal

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron los siguientes modelos vegetales: pulpa, cáscara y semilla de aguama (*Bromelia pinguin*), pulpa y semilla de arrayán (*Psidium sartorianum*), pulpa y cáscara de ciruela mexicana (*Spondias purpurea*), pulpa, semilla y cáscara de guamúchil (*Pithecellobium dulce*), pulpa y semilla de papache (*Randia echinocarpa*), pulpa y semilla de uvalama (*Vitex mollis*) y hoja de tres especies de suculentas provenientes al género *Echeveria* (*E. subrigida*, *E. craigiana* y *E. kimnachi*).

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron frutos de papaya variedad Maradol, los cuales se obtuvieron del mercado de la localidad. Los frutos se seleccionaron de acuerdo a uniformidad de tamaño y color; así como a la ausencia de daños físicos y pesticidas.

2. Microorganismos

En el presente estudio se utilizó el hongo *C. gloeosporioides* aislado y caracterizado previamente en el laboratorio de Fisiológica y Tecnología Poscosecha de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Dicho hongo fue aislado de frutos de papaya 'Maradol' con síntomas de antracnosis. El hongo se identificó con base en sus características macro y microscópicas (tinción con azul de lactofenol) y moleculares (Ayón-Reyna y col 2017b).

C. MÉTODOS

1. Etapa 1: Selección de la Fracción Más Activa (FMA) de los extractos de frutos nativos de Sinaloa

a. Extractos

i. Elaboración de las harinas

Los materiales vegetales de esta investigación se colectaron de diferentes localidades del estado de Sinaloa, se transportaron a los laboratorios de la FCQB-UAS, se lavaron, desinfectaron, se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se liofilizaron (Liofilizadora VirTis 25EL, VirTis Co. E.U.A.). Las muestras liofilizadas se molieron, tamizaron, (malla no. 40) y almacenaron protegidas de la luz a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

ii. Extractos metanólicos (EM)

Los EM se obtuvieron según lo reportado por López-Angulo y col (2014). Las harinas se maceraron con metanol (1:10 p/v, 30 min/extracción, tres veces) bajo sonicación. El sobrenadante de las tres extracciones se mezcló y evaporó en un rotavapor a 37 °C. El residuo se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

iii. Fraccionamiento de los EM

Los EM se fraccionaron por cromatografía de partición líquido-líquido según lo descrito por López-Angulo y col (2016) con algunas modificaciones. El EM (10 g) se suspendió en 20 mL de metanol al 90 % (v/v). La solución se fraccionó tres veces con hexano (3 × 50 mL) y la fase hexánica se recuperó. La solución desengrasada se concentró y mezcló con 50 mL de agua destilada y posteriormente se fraccionó con acetato de etilo (3 × 50 mL), recuperando la fase acuosa y de acetato de etilo. Las fracciones de acetato de etilo y hexánica se concentraron en un rotavapor (38 °C) mientras que la fase acuosa se concentró mediante liofilización, finalmente las fracciones se almacenaron a -20 °C.

iv. Preparación de los EM y fracciones

Los EM y fracciones se re-suspendieron en su respectivo solvente y ajustó su concentración a 400 mg/mL. La solución se esterilizó pasando a través de un filtro estéril (PTFE, 33 mm × 0.45 µm).

b. Ensayos *in vitro*

i. Actividad antifúngica de los EM

La inhibición *in vitro* del crecimiento micelial se determinó utilizando la técnica reportada por Feng y col (2019) con algunas modificaciones. Se preparó agar dextrosa papa (PDA) y posteriormente se esterilizó a 121 °C por 15 min. El PDA líquido se vertió en cajas Petri (9 cm de diámetro) y se solidificó a temperatura ambiente durante 30 min. Las cajas se incubaron a 27 °C durante 2 días, y a continuación se adicionaron aseptícamente 100 µL de extracto previamente esterilizado y se esparció por la caja con ayuda de un asa estéril, dejando evaporar el solvente en una campana de flujo laminar y finalmente a las cajas se les depositó en el centro 1 µL de la suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (1×10⁶ conidios/mL). Las cajas Petri se incubaron a 27

°C durante 6 días. Las cajas únicamente con el solvente (metanol) se utilizaron como el control negativo y las cajas con tiabendazol (0.5 mg/mL) se consideraron como el control positivo. Se realizaron tres ensayos independientes y tres réplicas por ensayo. El efecto de los extractos se reportó en términos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial:

$$\% \text{ de inhibición de crecimiento micelial} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Dónde:

C= Es la medida del crecimiento radial del hongo en el control.

T= Es la medida del crecimiento radial del hongo en presencia de cada extracto.

ii. Toxicidad *in vitro* de los EM

El ensayo de toxicidad de los extractos sobre el crustáceo *Artemia salina* se llevó a cabo según lo reportado por Solis y col (1993) con algunas modificaciones. Para obtener los nauplios del crustáceo, huevos de *A. salina* (600 mg/L) se colocaron en un recipiente con medio de mar artificial (MMA), preparado con sal artificial y agua destilada (38 g/L), provisto de un sistema de oxigenación y bajo un régimen continuo de luz. Después de 48 h a una temperatura de 22-29 °C, los nauplios fototrópicos eclosionados se colocaron en MMA fresco. Los extractos a evaluar se prepararon a 20 mg/mL. La evaluación se realizó en tubos de ensayo, en cada tubo se colocaron 10 nauplios de *A. salina*, 200 µL de extracto y la mezcla se aforó a 2 mL con MMA. El control positivo y negativo se preparó adicionando 200 µL de tiabendazol (2 mg/mL) y Tween (3%, v/v), respectivamente. Los tubos se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente con luz continua. Después de este tiempo, se contó el número de larvas vivas en cada tubo. Los porcentajes de muerte de cada extracto y el control positivo se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$\% M = \frac{r}{s'} \times 100$$

Donde:

M = Mortalidad (%)

r = Larvas muertas en el extracto

s' = Larvas vivas en el blanco

iii. Actividad antifúngica y toxicidad de las fracciones

Los EM con la mayor actividad antifúngica y la menor toxicidad se seleccionaron y separaron por cromatografía líquido-líquido para obtener diferentes fracciones. La

actividad antifúngica y toxicidad de las fracciones se evaluó con las metodologías previamente descritas.

iv. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las fracciones seleccionadas se prepararon a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 y 400 mg/mL) para determinar su CMI, la cual se define como la concentración mínima para obtener el 100% de inhibición en el crecimiento radial. Posteriormente, los valores de CMI se utilizaron en los ensayos *in vivo*.

c. Ensayos *in vivo*

i. Incidencia y severidad de antracnosis

Para la evaluación de incidencia y severidad de la antracnosis, frutos de papaya 'Mardaol' en estado de desarrollo 4 (cáscara naranja, con rayas verdes) se inocularon mediante inmersión por 5 min en una suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (1×10^6 conidios/mL). Después, las fracciones de mayor actividad y menor toxicidad previamente seleccionadas, se añadieron a la superficie de la fruta (2 mL/fruto) y se frotaron manualmente, posteriormente se almacenaron a 13 °C durante 16 días. Los frutos control se sumergieron en agua purificada (control negativo) o en solución de tiabendazol (0.5 mg/mL) (control positivo).

La incidencia de antracnosis se evaluó diariamente de acuerdo con la metodología reportada por Ayón-Reyna y col (2017a), la cual se basa en la aparición de los síntomas de antracnosis en la superficie del fruto. Los resultados se expresaron como el número de frutas que muestran síntomas de antracnosis del total de frutas en cada tratamiento. La severidad de la antracnosis se evaluó de manera visual en intervalos de 4 días, reportando los resultados como porcentaje de la superficie de los frutos con síntomas de la enfermedad.

ii. Parámetros de calidad

Para todas las mediciones de calidad se utilizaron 12 frutos por tratamiento. La pérdida de peso se determinó según lo reportado por Singh y col (2017). Se pesaron 12 frutos por tratamiento empleando una balanza Sartorius (TE 4101, Alemania). Los valores se expresaron como porcentaje de pérdida de peso en relación con el peso inicial del mismo:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Para la medición de firmeza se tomaron cortes de la región ecuatorial de cada fruto, obteniéndose un total de 9 mediciones por fruto. Se utilizó un penetrómetro chatillón DFE 100 (DFE AMETEK, E.U.A.) con una punta plana de 11 mm de diámetro a una velocidad de penetración constante (50 mm/min – 5 mm de penetración) (Marangoni y col, 1995)

Para la evaluación del contenido de sólidos solubles totales (SST) se utilizó un refractómetro manual (Atago Fisher Scientific, E.U.A.) de acuerdo con el método oficial 22.014 de la AOAC (2012). La medición se llevó a cabo colocando una muestra del fruto picado en un trozo de tela organza, la muestra se exprimió y una gota de jugo se colocó sobre el refractómetro. El contenido de SST se reportó como ° Brix.

El pH se determinó de acuerdo al método 981.12 de la AOAC (2012), que consistió en homogenizar 10 g de muestra con agua destilada (pH = 7), posteriormente se filtró en tela de organza y se aforó a 100 mL. El pH se evaluó en un potenciómetro Orion (Orion research Inc., E.U.A.). Los resultados se expresaron como concentración de iones hidrógeno. De igual manera se evaluó la acidez titulable (AT) de acuerdo al método oficial 942.15 de la AOAC (2012). A partir de la solución anterior se tomó una alícuota de 20 mL y se tituló con NaOH (0.1 N) hasta alcanzar un pH de 8.1 ± 0.1 . La AT se reportó como porcentaje de ácido cítrico.

d. Análisis fitoquímico

La presencia o ausencia de fitoquímicos en las fracciones usadas en las evaluaciones *in vivo* se determinó mediante ensayos en tubo o cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) como se describe a continuación: la reacción de Salkowski para terpenos/esteroides; la prueba de Shinoda para flavonoides; reacción con solución de gelatina al 1 % y solución de sulfato de quinina con FeCl₃ para taninos; formación de espuma para saponinas; fluorescencia amarilla por reacción con NaOH para cumarinas y los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner para alcaloides (Harborne, 1973).

e. Selección de la fracción más activa (FMA)

La fracción con mayor efecto en la reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad, así como, la mayor retención de sus variables de calidad se seleccionó para los estudios posteriores y se le denominó como la fracción más activa (FMA).

f. Diseño estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con al menos 3 réplicas y 3 repeticiones. En los ensayos *in vitro* se utilizó un ANOVA unifactorial, donde el factor fue el modelo vegetal empleado. Para los ensayos *in vivo* se utilizó un ANOVA bifactorial, donde los factores fueron los tratamientos aplicados en los frutos y los días de almacenamiento a 13 °C. Las medias se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (*Least Significant Difference*, LSD) de Fisher ($p < 0.05$) con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion v. 16.1 (Statgraphics Technologies, Inc., U.S.A.).

2. Etapa 2: Toxicidad y caracterización química

a. Toxicidad aguda de la FMA

El ensayo de toxicidad aguda se realizó de acuerdo a los lineamientos de la Norma Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se utilizaron ratones BALB/c machos de 50 días de nacidos con un peso promedio entre 25-30 g. La FMA seleccionada en la etapa 1 fue la fracción hexánica de *Vitex mollis* (FH-VM) y se evaluó a 2 g/kg de peso. A dos grupos de seis ratones cada uno se le suministró agua a libre demanda y se mantuvieron en ayuno 6 h previo al experimento. A uno de los grupos se les administró la FMA disuelta en tween-80 (20% v/v) por vía intragástrica, mientras que al grupo control se les administró únicamente una solución de Tween-80. La mortalidad se registró a las 24 h después de administrar la dosis. Tras 30 días de la administración de la FMA, el peso corporal y de diferentes órganos (bazo, corazón, hígado, pulmones y riñones) de los ratones se registró y los resultados se reportaron como el peso relativo de los órganos empleando la siguiente fórmula (Lorke 1983).

$$\text{Relación órgano y peso total} = \left(\frac{\text{Peso órgano}}{\text{Peso total del ratón}} \right) \times 100$$

b. Identificación de compuestos con actividad antifúngica en la FMA

i. Separación en columna abierta

La FMA (9 g) se separó mediante cromatografía en columna (55 × 9 cm) usando gel de sílice 60 (35-70 μm de diámetro). Los compuestos se eluyeron utilizando las siguientes mezclas de disolventes y proporciones (v/v): hexano + acetato de etilo 9.75:0.25 (400 mL), 9.5:0.5 (200 mL), 9.25:0.75 (200 mL), 9:1 (300 mL), 8.5:1.5 (100 mL), 8:2 (300 mL), 7.5:2.5 (100 mL), 7:3 (100 mL), 6:4 (100 mL) y 1:1 (100 mL), acetato de etilo (100 mL) y acetato de etilo + metanol 9:1 (300 mL). Alícuotas de 10 mL fueron colectadas y analizadas mediante TLC, utilizando hexano + acetato de etilo (8:2 v/v) como fase móvil. Las manchas en las placas de TLC se visualizaron con el reactivo de Lieberman-Burchard (solución de ácido sulfúrico y anhídrido acético) para la detección de triterpenos (coloración púrpura). Se agruparon las alícuotas en siete subfracciones (FH₁-FH₇) en función de sus factores de retención de TLC (R_f). El R_f se calculó de la siguiente manera:

$$R_f = \left(\frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \right)$$

ii. Actividad antifúngica mediante ensayo de microdilución

Para la realización de estos ensayos se depositaron 200 μL de PDA estéril en microplacas previamente desinfectadas con etanol (96% v/v). Las subfracciones se disolvieron en hexano a diferentes concentraciones (0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 5 y 10 mg/mL), se esterilizaron por filtración (PTFE, 0.22 μm de apertura), se añadieron a cada pocillo (13 μL) y se dejó evaporar el solvente en una campana de flujo laminar. Para la inoculación, en cada pocillo se añadieron 2 μL de una suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (2×10⁵ esporas/mL) y se incubó por dos días a 27 °C. Se utilizó hexano y TBZ como control negativo y positivo, respectivamente. Los resultados se expresaron como la CMI en mg/mL. La subfracción con las mejores propiedades antifúngicas se seleccionó para los análisis posteriores (Mirón y col 2014).

iii. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

La subfracción FH₃ se preparó a 4 mg/mL en hexano y se filtró previo a su análisis por GC-MS (Agilent Technologies, E.U.A.). La separación se realizó en una columna capilar de sílice fundida (QUADREX 007 CARBOWAX 20M 30 m × 0.25 mm). El flujo

fue de 0.9 mL/min utilizando helio como fase móvil. Las condiciones de temperatura fueron: inyector a 250 °C; horno a 60 °C durante 1 min, gradiente de 5 °C/min hasta 200 °C, gradiente de 10 °C/min hasta 275 °C y 275 °C hasta el término de la corrida; fuente de iones a 245 °C; y cuadrupolo a 150 °C. El espectrómetro de masas se operó en el modo de ionización por impacto electrónico con energía electrónica de 70 eV. La identificación de los componentes se llevó a cabo con la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca de masa espectral (NIST08.LIB) y el porcentaje relativo de cada componente se calculó comparando su área de pico promedio con las áreas totales (López-Angulo y col 2016).

iv. Aislamiento y evaluación antifúngica del triterpeno

La subfracción FH₃ (1.5 g) se separó mediante cromatografía en columna (45 × 4 cm). Los compuestos se eluyeron con hexano y acetato de etilo (v/v) en diferentes proporciones: hexano (100 mL), hexano + acetato de etilo [9.75:0.25 (150 mL), 9.5:0.5 (150 mL), 9.25:0.75 (100 mL), 9:1 (100 mL), 8.5:1.5 (150 mL), 8:2 (100 mL) y 1:1 (100 mL)] y acetato de etilo (100 mL). Alícuotas de 5 mL se colectaron y analizaron por TLC como se describió previamente. Las alícuotas con la mayor presencia del triterpeno se agruparon y se evaporaron en un rotavapor. El residuo se re-suspendió en hexano frío y se cristalizó en refrigeración. Los cristales se lavaron 3 veces con hexano y se secaron a 50 °C durante 1 h. El punto de fusión de los cristales se determinó con un aparato de punto de fusión (Fisher Scientific Inc., E.U.A.) y se utilizó como criterio de pureza; además, la muestra se disolvió en hexano (1 mg/mL), se analizó por TLC empleando hexano + acetato de etilo (8:2, 6:4 y 1:1) como fase móvil, y se visualizó con el reactivo de Lieberman-Burchard. La actividad antifúngica del triterpeno (0.062, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/mL) se evaluó en microplaca según lo descrito previamente.

v. Identificación, cuantificación y actividad antifúngica del ácido caprílico (AC)

Para confirmar la presencia de ácido caprílico en la subfracción FH₃, se preparó una solución de AC (Sigma-Aldrich) (4 mg/mL) y se agregó a la subfracción FH₃ (4 mg/mL) a una concentración final de 1 mg/mL. Las 3 muestras (FH₃, AC y FH₃ + AC) se analizaron mediante GC-MS según lo descrito previamente. La cuantificación de

AC se llevó a cabo con una curva de calibración de este compuesto (0-4 mg/mL) y la concentración se expresó como mg de ácido caprílico por 100 g de fruto fresco (mg/100 gff). La actividad antifúngica del AC se realizó con el estándar comercial puro (Sigma-Aldrich) y se evaluó en microplacas (0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 0.125, 0.250 y 0.500 mg/mL) según lo descrito previamente.

c. Diseño estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con al menos 3 réplicas y 3 repeticiones. Para el ensayo de toxicidad aguda se empleó una comparación de medias con la prueba t-student y un nivel de significancia del 5% con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion v. 16.1. Para la identificación de los compuestos activos se utilizó un análisis descriptivo.

3. Etapa 3: Mecanismo

a. Germinación de esporas

La subfracción hexánica 3 (FH₃) estéril (0.25 y 0.50 mg/mL) o TBZ (13 µL) fue colocada en 3 puntos equidistantes en una caja Petri (5 cm) con PDA y se dejó secar el solvente en una campana de flujo laminar. Enseguida, cada punto se inoculó con 2 µL de una suspensión de esporas (2×10^5 conidios/mL). Las cajas Petri se incubaron durante 8, 16, 24 y 32 h a 27 °C. La germinación de los conidios se observó con un microscopio óptico (Axiophot Carl Zeiss, Alemania) con un aumento de 40x y las imágenes se capturaron con una cámara digital (Reflex D3400, Nikon Inc., Japón). Se observaron cien conidios y cada conidio se consideró germinado cuando la longitud de su tubo germinativo excedía la mitad de la longitud del mismo. Los resultados se expresaron como porcentaje de conidios germinados (%) (Ayón-Reyna y col 2017b).

b. Crecimiento micelial

La subfracción FH₃ se preparó a 0.25 y 0.50 mg/mL. La FH₃ se esparció en una caja Petri (5 cm) (50 µL) con PDA y el solvente se dejó secar en una campana de flujo laminar. Cada caja Petri se inoculó en el centro con 1 µL de una suspensión de esporas (1×10^6 conidios/mL) y se incubó a 27 °C durante 4 días. El diámetro del micelio se midió y se reportó en cm. Los controles fueron los siguientes: placas con hexano como control negativo (López-Velázquez y col 2021) y con 0.5 mg/mL de tiabendazol como control positivo.

c. Ensayos de protección

La interacción de la subfracción FH₃ con ergosterol, sorbitol, ácido palmítico y ácido linoleico se llevó a cabo según lo descrito por Haraguchi y col (1999) y Miron y col (2014) con algunas modificaciones. La subfracción FH₃ se preparó a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg/mL). Cada concentración se agregó (13 µL) en 3 puntos equidistantes de una caja Petri (5 cm) con PDA y se dejó secar. A continuación, se agregaron 13 µL de ergosterol (2.5 mg/mL) en cada punto y se dejó secar nuevamente. Finalmente, se inoculó cada punto con 2 µL de una suspensión de esporas (2×10⁵ esporas/mL). Se empleó el mismo procedimiento con sorbitol (145 mg/mL), ácido palmítico (100 µg/mL) y ácido linoleico (100 µg/mL). La presencia de estos compuestos se espera que protejan las esporas, incrementando la CMI de la FH₃. La CMI se registró a las 24 y 48 h (27 °C) después de la inoculación.

d. Lixiviación de contenido intracelular

Caldo de dextrosa papa (PDB) se inoculó con una suspensión de esporas (1×10⁶/mL) (1:10 v/v) e incubado a 27 °C durante 3 días. El micelio producido se filtró y lavó con agua destilada. Para evaluar el efecto de la FH₃ sobre el micelio, 300 mg de micelio se mezclaron con 10 mL de la subfracción a 0.25 o 0.5 mg/mL (Tween-80 0.5 % v/v). Para evaluar el efecto sobre las esporas, una suspensión de esporas (2×10⁶/mL) se mezcló (1:1 v/v) con una solución de FH₃ (0.5 o 1 mg/mL) en Tween-80 (1% v/v). Las muestras se incubaron en un agitador a 25 °C durante 4 h. Las esporas y los micelios se filtraron (Nylon, 0.22 µm de apertura) y las soluciones acuosas se utilizaron para el análisis de proteínas y ADN. Se utilizó Tween-80 como control negativo. El ensayo de Bradford se llevó a cabo para determinar la proteína lixiviada (µg/mL) en las soluciones filtradas (Bradford, 1976), mientras que el ADN lixiviado se evaluó y se reportó como la absorbancia de la solución a 260 nm (Wu y col 2014). El lector de microplacas (Synergy 2 SL, BioTek Instruments, E.U.A.) se ajustó a cero con una solución de TBZ o FH₃.

La lixiviación de electrolitos se determinó con un conductímetro manual (Hanna Instruments, República de Mauricio). La fuga total de electrolitos se determinó midiendo la conductividad de las muestras sin filtrar antes (conductividad inicial) y después (conductividad final) de hervir la mezcla durante 10 min (Yang y col 2016).

Los resultados se expresaron como porcentaje de electrolitos filtrados de la siguiente manera:

$$\text{Lixiviación (\%)} = \frac{\text{Conductividad inicial}}{\text{Conductividad final}} \times 100$$

e. Efecto sobre la microestructura

i. Microscopía de fluorescencia confocal

Muestras de esporas y micelio se mezclaron con la subfracción FH₃ (0.5 mg/mL), AC (0.125 mg/mL) y TBZ (0.4 mg/mL); los compuestos y FH₃ se prepararon en Tween-80 al 0.5% v/v. Para estos análisis, las muestras se ajustaron a una concentración final de 3×10⁶ esporas/mL y 5 mg de micelio/mL. Las muestras se incubaron durante 4 h a 27 °C. Media hora antes de culminar este periodo se agregó una solución acuosa del fluoróforo lipofílico FM4-64® (ThermoScientific, Waltham., E.U.A.) (1 mg/mL) hasta obtener una concentración final de 5 µg/mL. Las esporas tratadas fueron depositadas en PDA y posteriormente una capa fina del medio con esporas se montaron sobre un portaobjetos. Para el micelio, pequeñas partículas de éste se montaron en un portaobjetos. A las muestras se les colocó un cubreobjetos y fueron selladas con esmalte de uñas. Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS SP5X (KEYENCE, Itasca, E.U.A.) con un objetivo de inmersión a 40X. La excitación del fluoróforo se llevó a cabo a 558 nm y la emisión a 734 nm (Trejo-Raya y col 2021).

ii. Análisis de imágenes

Las imágenes de microscopía fueron analizadas con la ayuda del programa ImageJ. Para todos los parámetros fueron analizadas 30 esporas y células fúngicas en el micelio. Las dimensiones de las esporas (ancho y largo) y de las células fúngicas en el micelio (ancho) fueron medidas y reportadas en µm.

Los cambios de textura en las imágenes fueron evaluados con un análisis de correlación de nivel de grises (GLCM, por sus siglas en inglés). El desorden o aleatoriedad de la escala de grises en la imagen (entropía) es un parámetro que describe la textura de una imagen, este parámetro se calcula mediante un análisis de la distribución de los píxeles en un plano tridimensional, siendo el tercer plano la intensidad de gris en la imagen (Malegori y col 2016). El procesamiento de la imagen

consistió en seleccionar el área de interés (13 x 4 µm), ajustar el contraste automáticamente y transformar la imagen a un formato 8-bit (escala de gris). Finalmente se calculó el valor de entropía con ayuda del aditamento para ImageJ “GLCM TEXTURE”.

Para la evaluación de la intensidad de fluorescencia se seleccionó el área de interés (13 x 4 µm). Posteriormente el programa construyó un histograma de frecuencia donde en el eje “X” se encuentra la intensidad del color rojo, la cual va desde cero (negro) hasta 255 (rojo intenso). Mientras que en el eje “Y” se representa el número de pixeles en la imagen que se presentan en cada una de las intensidades. El valor de la intensidad en cada espora o célula de micelio se reportó como el promedio del histograma con la siguiente formula:

$$\text{Intensidad de fluorescencia} = \frac{\sum_0^{255} n * f_n}{N}$$

Donde:

n: Es la intensidad del rojo (0-255).

f_n: Es la frecuencia de pixeles en la n^{-ésima} intensidad del rojo.

N: Número total de intensidades del rojo (256).

f. Diseño estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con al menos 3 réplicas. Para la germinación de esporas y crecimiento micelial se utilizó un ANOVA bifactorial donde los factores fueron el tratamiento aplicado y el tiempo de incubación a 27 °C. Para la lixiviación y los parámetros medidos a partir de las imágenes de microscopía se utilizó un ANOVA unifactorial, donde el factor fue el tratamiento aplicado. Las medias se compararon utilizando la prueba de LSD de Fisher (p<0.05) con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion v. 16.1.

4. Etapa 4: Actividad antifúngica *in vivo* de la subfracción

a. Incidencia y severidad de antracnosis

Frutos de papaya en estado de desarrollo 2 (cáscara verde, con ligeras rayas naranja) se inocularon mediante inmersión en una suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (1×10⁶ conidios/mL) por 5 min. Posteriormente los frutos fueron tratados por frotación con una solución de FH₃ a 0.5 y 1 mg/mL en Tween-80 (0.5%

v/v). Se empleó TBZ (0.5 mg/mL) y Tween-80 (0.5% v/v) como control positivo y negativo, respectivamente. Adicionalmente se utilizaron frutos sin Tween-80 y sin inocular. Los frutos fueron almacenados por 15 días a 23 °C a una humedad relativa superior al 90% (López-Velázquez y col 2021). La incidencia y severidad de antracnosis de los frutos se determinó como fue descrito previamente.

b. Diseño estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 3 réplicas. Se utilizó un ANOVA bifactorial donde los factores fueron el tratamiento aplicado y el tiempo de almacenamiento de los frutos a 23 °C. Las medias se compararon utilizando la prueba de LSD de Fisher ($p < 0.05$) con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion v. 16.1.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. ETAPA 1: SELECCIÓN DE LA FMA

1. Ensayos *in vitro*

a. Extractos metanólicos

Los rendimientos de extracción de los EM variaron entre 4.73 y 60.8% (Cuadro 6); los extractos de pulpa mostraron los valores más altos (40.63-60.8%) y los de semillas los más bajos (4.73-58.81%), esto debido a que la pulpa está comúnmente enriquecida en compuestos polares y el metanol disuelve fácilmente estos compuestos (López-Angulo y col 2014). Por otro lado, cáscaras, semillas y hojas contienen una importante cantidad de polímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina) que muestran solubilidad baja en metanol (El Batam y col 2013; Salem y Saltana, 2015), reflejándose en bajos rendimientos de extracción (Cuadro 6).

Siete de los 16 EM inhibieron el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* y el de la pulpa de *V. mollis* fue el mejor (100%), siendo superior al control positivo (TBZ) (52.29. Los otros seis EM mostraron actividad moderada (19.5-25.7%) (Cuadro 6). Cabe mencionar que los EM fueron evaluados a una concentración alta (400 mg/mL) debido a que la extracción con metanol es muy poco selectiva y otros metabolitos más abundantes podrían estar disminuyendo la actividad del compuesto de interés y no mostrar actividad a concentraciones bajas.

Estudios previos con estos modelos vegetales han registrado su actividad antifúngica *in vitro*. Por ejemplo, la pulpa de *P. sartorianum* y las hojas de *Echeveria* spp. inhiben el crecimiento micelial de hongos y levaduras patógenos humanos (Camacho-Hernández y col 2004; Martínez-Ruiz y col 2013), mientras que los extractos de semilla de *P. dulce* y las hojas y tallos de *V. mollis* inhiben el crecimiento micelial de fitopatógenos relevantes en la agricultura como *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium* spp. (Bautista-Baños y col 2003; Valencia-Botin y col 2018).

Aunque las propiedades antifúngicas de *P. sartorianum*, *Echeveria* spp., *P. dulce* y *V. mollis* se han reportado previamente, aún se desconoce la identidad de sus compuestos antifúngicos y el mecanismo involucrado. Para el caso de la pulpa de *V.*

Cuadro 6. Rendimiento de extracción, actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* y toxicidad *in vitro* de extractos metanólicos de plantas típicas del estado de Sinaloa.

Modelo vegetal (nombre común)	Órgano	Rendimiento de extracción (%)	Inhibición del crecimiento micelial ¹ (%)	Toxicidad <i>in vitro</i> ² (% de mortalidad)
<i>Bromelia pinguin</i> (aguama)	Pulpa	46.63 ± 0.77 d	< 5	NA
	Cáscara	24.28 ± 0.56 h	< 5	NA
<i>Psidium sartorianum</i> (arrayán)	Pulpa	55.70 ± 0.14 c	20.44 ± 1.69 c	0 ± 0.00 d
	Semilla	58.81 ± 0.21 b	25.66 ± 2.52 c	53.33 ± 11.55 c
<i>Spondias purpurea</i> (ciruela mexicana)	Pulpa	56.42 ± 0.44 c	< 5	NA
	Cáscara	29.81 ± 0.41 g	< 5	NA
<i>Echeveria craigiana</i>	Hoja	32.30 ± 0.78 f	< 5	NA
<i>Echeveria kimnachii</i>	Hoja	20.50 ± 1.18 i	23.13 ± 3.53 c	0 ± 0.00 d
<i>Echeveria subrigida</i>	Hoja	40.30 ± 0.94 e	< 5	NA
<i>Pithecellobium dulce</i> (guamúchil)	Pulpa	58.25 ± 0.35 b	< 5	NA
	Cáscara	13.43 ± 0.13 j	21.55 ± 1.92 c	83.33 ± 5.77 b
	Semilla	23.62 ± 0.36 h	19.52 ± 0.69 c	100 ± 0.00 a
<i>Randia echinocarpa</i> (papache)	Pulpa	60.82 ± 0.15 a	< 5	NA
	Semilla	4.73 ± 0.22 l	< 5	NA
<i>Vitex mollis</i> (uvalama)	Pulpa	46.82 ± 0.24 d	100 ± 0.00 a	0 ± 0.00 d
	Semilla	12.45 ± 0.37 k	21.45 ± 2.95 c	0 ± 0.00 d
Tiabendazol		NA	52.29 ± 6.86 b	73.33 ± 15.27 b

NA: No aplica. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ La actividad antifúngica de los extractos fue evaluada a 400 mg/mL. Tiabendazol fue evaluado a 0.5 mg/mL.

² La toxicidad *in vitro* fue evaluada únicamente en los extractos con inhibición mayor al 5%. Los extractos fueron evaluados a 2 mg/mL. Tiabendazol fue evaluado a 0.2 mg/mL.

mollis, su elevada actividad antifúngica puede deberse a la presencia de numerosos monoterpenos (e.g., eucaliptol, sabineno, α -pineno y limoneno), los cuales son componentes característicos entre los frutos del género *Vitex*, y poseen una fuerte actividad contra diversos microorganismos (Miron y col 2014; Pío-León y col 2014).

Aunque reportes previos han demostrado que los EM de *B. pinguin* y *R. echinocarpa* fueron activos contra hongos patógenos para el ser humano (Camacho-Hernández y col 2002; Salinas-Sánchez y col 2009), en el presente estudio, estos extractos no inhibieron el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Las hojas de *S. purpurea* poseen una variedad de compuestos (e.g., espatulenol, cariofileno y α -muuroleno) con fuertes propiedades antifúngicas contra *Moniliophthora perniciosa*, el cual infecta a árboles de cacao (Marisco y col 2007); sin embargo, estos compuestos pueden estar ausentes en los extractos de cáscara y pulpa, ya que resultaron ineficaces contra *C. gloeosporioides*.

Con respecto a la valoración de toxicidad *in vitro*, solo se evaluaron los EM con actividad antifúngica superior al 5%. Tres de los siete extractos evaluados fueron tóxicos contra *A. salina* (Cuadro 6) (Anexo 1), los valores más altos fueron para semilla (100%) y cáscara (83.3%) de *P. dulce*, seguido por la semilla de *P. sartorianum* (53.3%). La toxicidad de TBZ se evaluó a 0.2 mg/mL, según lo descrito por Solis y col (1993) para compuestos sintéticos, y su valor fue estadísticamente mayor que el de los EM, a excepción de los EM de *P. dulce*. Algunos autores han evaluado la toxicidad de pulpa y corteza de *P. dulce* (Megala y Geetha, 2012; Toudji y col 2017) y de algunas especies de los géneros *Psidium* y *Vitex* (Rani y Sharma 2013; Manekeng y col 2019); sin embargo, éste es el primer reporte de toxicidad para los diferentes órganos de los modelos aquí evaluados.

Como era de esperar, dado su consumo habitual, los extractos de pulpa no fueron tóxicos. Para el caso de la toxicidad de los extractos de hojas, ésta varía entre modelos de plantas; por ejemplo, los extractos de *Psidium guajava* tienen baja toxicidad *in vivo* y se utilizan para tratar la colitis (Etuk y Francis 2003), mientras que los extractos de *Catharanthus roseus* y *Azadirachta indica* muestran toxicidad aguda en ratones y no se recomienda su consumo (Kevin y col 2012; Deng y col 2013). Por su parte, los extractos de semillas y cáscaras comúnmente contienen compuestos tóxicos como

arsénico, cianuro, ácido fítico, inhibidores de proteasas y taninos (Popova y Mihaylova 2019). Cavalcante-Fonseca y col (2013) evaluaron la toxicidad *in vitro* de extractos (2 mg/mL) de varias semillas de frutos y la mitad de ellos indujeron una mortalidad del 100% por su contenido alto de cianuro.

Teniendo en cuenta los resultados de toxicidad, solo se seleccionaron los EM de *P. sartorianum* (pulpa), *E. kimnachii* (hoja) y *V. mollis* (pulpa). No se seleccionó el extracto de semilla de *V. mollis*, dado que su actividad puede ser causada por los mismos compuestos que se encuentran en pulpa, pero en menor concentración o por los restos de pulpa en este tejido.

b. Fracciones

Los rendimientos del fraccionamiento fueron más altos en las fracciones acuosas (32.3-53.0%) (Cuadro 7) (Anexo 2), debido al contenido alto de compuestos polares en los EM. Por otro lado, los valores para las fracciones de media (acetato de etilo) y baja (hexano) polaridad oscilaron entre 0.4 y 4.4%. Las fracciones de acetato de etilo normalmente contienen fenólicos, lactonas y ácidos carboxílicos, mientras que la fracción de hexano contiene terpenos, fitoesteroles y ácidos grasos (López-Angulo y col 2016).

En la evaluación antifúngica, los valores más altos (100%) fueron para las fracciones en hexano (FH-VM) y acetato de etilo (FAE-VM) de *V. mollis* y la fracción de acetato de etilo de *E. kimnachii* (FAE-EK), siendo mejor que el TBZ (52.3%); mientras que la fracción de acetato de etilo de *P. sartorianum* (FAE-PS) tuvo una actividad moderada (53.3%) (Cuadro 7). En comparación con su EM correspondiente, FAE-EK y FAE-PS tuvieron un aumento de actividad de 260 y 430%, respectivamente, mientras que la FAE-VM y FH-VM mantuvieron el mismo valor presentado en su EM.

En comparación con las fracciones acuosa y hexánica, las cuales no fueron efectivas contra *C. gloeosporioides*, el incremento de actividad en FAE-PS y FAE-EK sugiere que los compuestos activos contra este hongo se encuentran en la FAE. Se han reportado resultados similares en otros modelos de plantas, mostrando mayor

Cuadro 7. Rendimiento de extracción, actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* y toxicidad *in vitro* de fracciones provenientes de extractos metanólicos con actividad antifúngica.

Modelo vegetal (nombre común) ¹	Fracción	Rendimiento de extracción (%)	Inhibición crecimiento micelial ² (%)	Toxicidad <i>in vitro</i> ³ (% de mortalidad)
Pulpa de <i>Psidium sartorianum</i> (arrayán) (20.44)	Hexánica	0.43 ± 0.14 f	< 5	NA
	Acetato de etilo	2.02 ± 0.08 e	53.26 ± 4.03 b	NA
	Acuosa	52.99 ± 0.10 a	< 5	NA
Hoja de <i>Echeveria kimnachii</i> (23.13)	Hexánica	4.39 ± 0.37 d	< 5	NA
	Acetato de etilo	3.67 ± 0.43 d	100 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
	Acuosa	32.28 ± 0.80 c	< 5	NA
Pulpa de <i>Vitex mollis</i> (uvalama) (100)	Hexánica	2.65 ± 0.79 e	100 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
	Acetato de etilo	0.75 ± 0.11 f	100 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
	Acuosa	43.42 ± 0.44 b	< 5	NA
Tiabendazol		NA	52.29 ± 6.86 b	73.33 ± 15.27

NA: No aplica. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Entre paréntesis se muestra la actividad antifúngica expresada en porcentaje del respectivo extracto metanólico.

² La actividad antifúngica de las fracciones fue evaluada a 400 mg/mL. Tiabendazol fue evaluado a 0.5 mg/mL.

³ La toxicidad *in vitro* fue evaluada únicamente en los extractos que presentaron 100% de inhibición. Las fracciones fueron evaluados a 2 mg/mL. Tiabendazol fue evaluado a 0.2 mg/mL.

actividad para fracciones de polaridad baja y media, debido a la eliminación de compuestos polares como carbohidratos (López-Angulo y col 2016; Ismail-Suhaimy y col 2017; Verma y col 2018). La FAE-VM y FH-VM exhibieron una fuerte actividad antifúngica. Aunque estas fracciones pueden compartir algunos compuestos, ambas mostraron inhibición del 100%, lo que sugiere que diferentes compuestos están involucrados en la actividad antifúngica.

En la evaluación de toxicidad *in vitro* (Cuadro 7), la FAE-EK, FAE-VM y FH-VM no fueron tóxicas a 2 mg/mL, mostrando mejores resultados que TBZ. Por lo tanto, estas fracciones pueden ser útiles para inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya. Se excluyó la FAE-PS debido a su baja actividad antifúngica.

Las actividades antifúngicas de FAE-EK, FAE-VM y FH-VM mostraron resultados prometedores; sin embargo, la concentración probada (400 mg/mL) es inapropiada para la evaluación *in vivo*, dado que la superficie de la fruta podría mancharse y se necesitarían grandes cantidades para su aplicación poscosecha. Por tanto, se necesita calcular los valores de CMI para los ensayos *in vivo*.

c. Determinación de la CMI

La actividad antifúngica de los EM seleccionados y sus respectivas fracciones a diferentes concentraciones (10-400 mg/mL) se muestra en el Cuadro 8. Las fracciones fueron más activas que su correspondiente EM y las mejores fracciones fueron las obtenidas de *V. mollis*, mostrando los siguientes valores de CMI (mg/mL): EM (400) > FAE (30) > FH (20) (Anexo 3). El EM y la FAE de *E. kimnachi* tuvieron valores altos de CMI (400 mg/mL) y por lo tanto no se consideraron para análisis posteriores. Debido a lo anterior, se eligieron únicamente la FH y la FAE de *V. mollis* para el ensayo antifúngico *in vivo*.

2. Ensayos *in vivo*

Tomando en consideración las diferencias entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, las concentraciones elegidas y evaluadas fueron la de su CMI y una concentración adicional al doble: FH a 20 (FH₂₀) y 40 mg/mL (FH₄₀) y FAE a 30 (FAE₃₀) y 60 mg/mL (FAE₆₀). Se utilizó TBZ como control positivo.

Cuadro 8. Efecto de la concentración de extractos metanólicos y sus respectivas fracciones sobre la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Extractos/ Fracciones	Concentración (mg/mL)							
	400	200	100	50	40	30	20	10
Hoja <i>Echeveria kimmachii</i>								
Extracto metanólico (EM)	23.1 ± 3.5 a	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Fracción acetato de etilo (FAE)	100 ± 0.0 a	31.9 ± 0.6 b	15.5 ± 0.6 c	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Pulpa <i>Vitex mollis</i>								
Extracto metanólico (EM)	100 ± 0.0 a	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Fracción hexánica (FH)	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	14.5 ± 0.8 b
Fracción acetato de etilo (FAE)	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	39.0 ± 7.2 b	15.3 ± 0.8 c

Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

a. Incidencia y severidad de antracnosis

La sintomatología de antracnosis en frutos de papaya fue consistente con reportes previos, esto es, la presencia de áreas circulares color marrón y a medida que se propagó la enfermedad, aparecieron masas conidiales color salmón y áreas algodonosas blancas (Figura 7) (Ademe y col 2013; Maha–Laksha y col 2019).

El tratamiento FH₄₀ mostró una mejor protección contra el desarrollo de *C. gloeosporioides* (Figuras 7 y 8). Al analizar la incidencia de antracnosis en los frutos de papaya (Figura 8A), los síntomas de la enfermedad aparecieron en todos los tratamientos el día 3. Al siguiente día de almacenamiento, los valores de los tratamientos FH₄₀ y FAE₆₀ fueron menores que los del tratamiento control. Luego de 5 días de almacenamiento, el tratamiento FH₄₀ mostró los valores más bajos de incidencia, mientras que después de 6 días, el efecto protector de los tratamientos FH₄₀ y TBZ fueron similares. Al día 7 solo el TBZ presentó diferencia con respecto al control, y al día 8 todos los tratamientos presentaron una incidencia del 100%. La severidad de antracnosis en frutos de papaya incrementó hasta 55% en los frutos control después de 16 d a 13 °C (Figura 8B). De manera general, se observó que los tratamientos de ambas fracciones, FH y FAE, redujeron el desarrollo de la enfermedad a 13 °C, pero el efecto fue más marcado en las concentraciones más elevadas (FH₄₀ y FAE₆₀), mostrando un efecto similar al del fungicida sintético (TBZ).

Los resultados de incidencia y severidad de antracnosis muestran que el tratamiento FAE₆₀ retrasó la propagación de síntomas, pero solo tuvo un efecto significativo sobre la incidencia de antracnosis al día 4. Por otro lado, el tratamiento FH₄₀ tuvo un efecto más fuerte en ambos criterios ya que redujo en gran medida la aparición y desarrollo de síntomas de la antracnosis, mostrando resultados similares a los obtenidos con TBZ durante todo el almacenamiento.

En los ensayos *in vitro* se observó que la FH-VM a 20 mg/mL y la FAE-VM a 30 mg/mL inhibieron completamente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*; sin embargo, los resultados *in vivo* mostraron que los frutos de papaya de todos los tratamientos presentaban sintomatología. Esto podría deberse a las múltiples variables involucradas en el análisis *in vivo*; por ejemplo, el análisis *in vitro* implica una gran

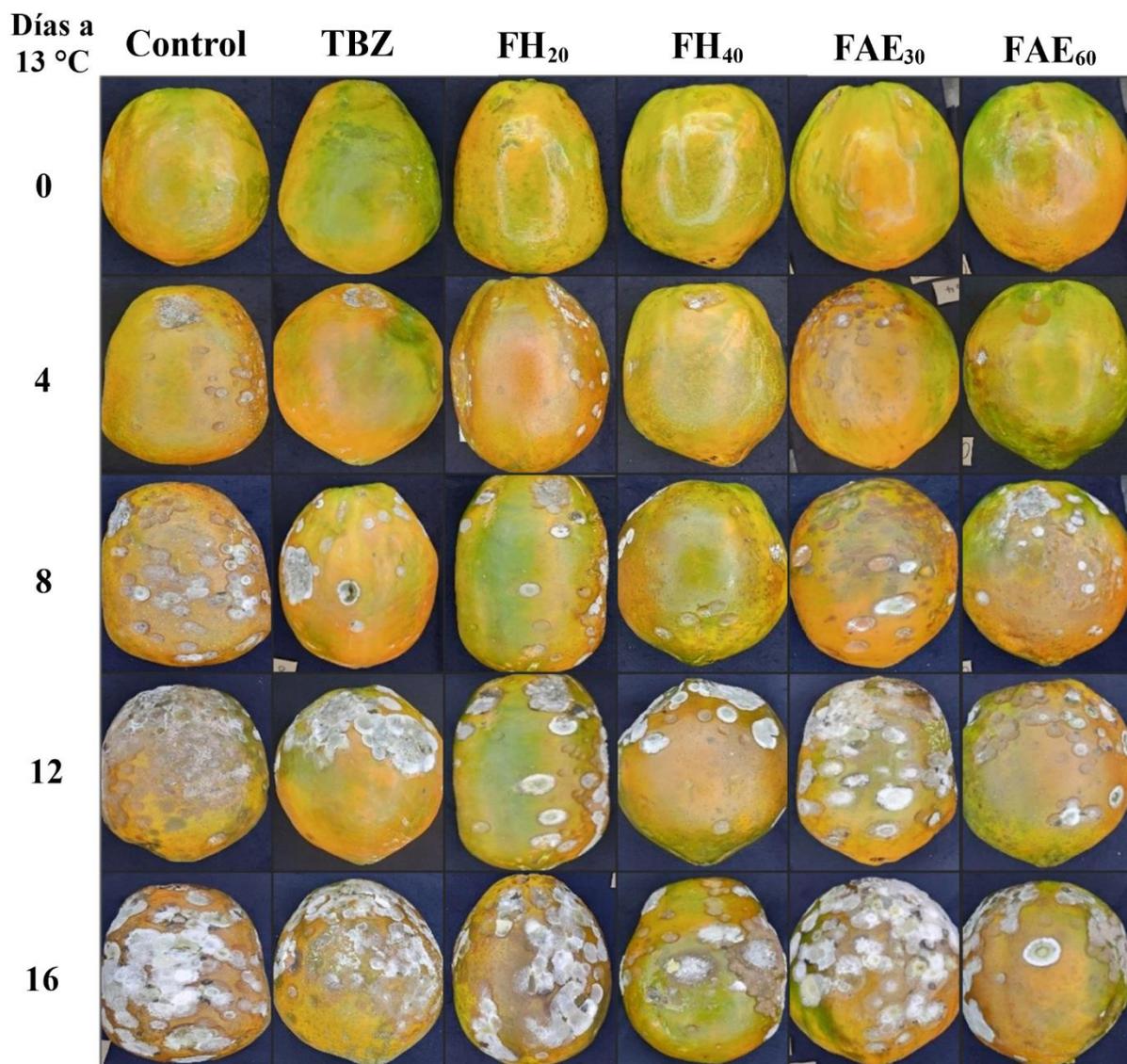


Figura 7. Imágenes representativas de frutos de papaya infectados con *C. gloeosporioides* y tratados con fracciones de pulpa de *V. mollis* (fracción hexánica, FH; fracción de acetato de etilo, FAE). Tiabendazol (TBZ) se usó como control positivo. Las concentraciones evaluadas fueron las siguientes: FH a 20 (FH₂₀) y 40 (FH₄₀) mg/mL y FAE a 30 (FAE₃₀) y 60 (FAE₆₀) mg/mL.

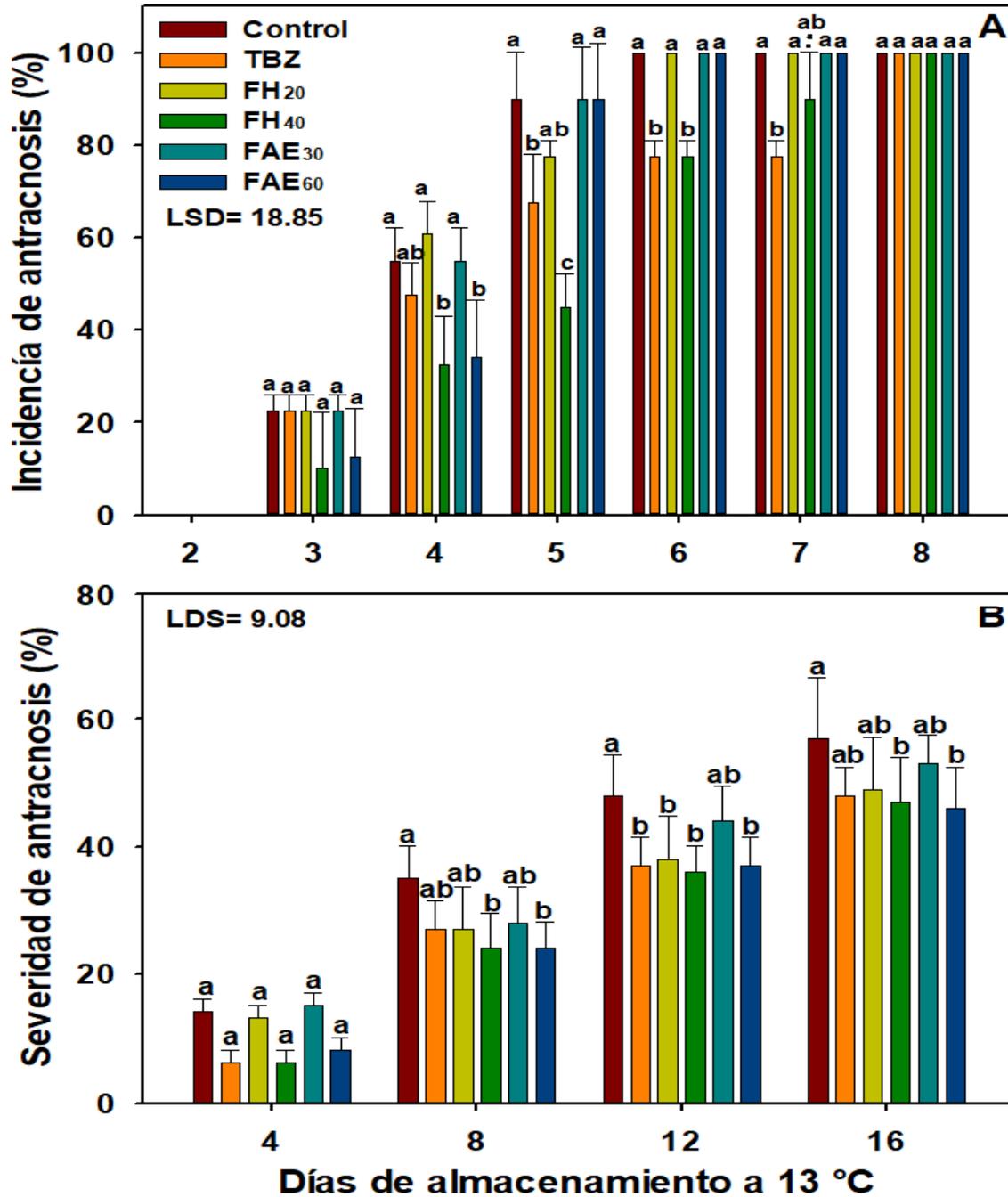


Figura 8. Efecto de la aplicación de fracciones de pulpa de *V. mollis* (fracción hexánica, FH; fracción de acetato de etilo, FAE) sobre la incidencia (A) y severidad (B) de antracnosis en frutos de papaya durante su almacenamiento a 13 °C. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes en el mismo día de evaluación indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). Las concentraciones evaluadas fueron las siguientes: FH a 20 (FH₂₀) y 40 (FH₄₀) mg/mL y FAE a 30 (FAE₃₀) y 60 (FAE₆₀) mg/mL.

limitación de nutrientes, mientras que en el ensayo *in vivo*, los frutos de papaya proveen micronutrientes específicos que podrían aumentar la patogenicidad del hongo (Iskandarov y col 2006).

En la literatura se han encontrado diversos reportes de extractos eficaces para inhibir antracnosis. Similar a lo observado en nuestro estudio, Ademe y col (2013) aplicaron un extracto de *Echinops* spp. en papaya y observaron una disminución en la incidencia y severidad de antracnosis, mostrando una reducción similar con un fungicida sintético (carbendazim). Por su parte, Meng y col (2015) obtuvieron resultados similares en frutos de mango y banano mediante la aplicación de extractos de *Camellia semiserrata*. En cuanto al mecanismo involucrado, Garcia y col (2008) encontraron que monoterpenos aplicados en papaya degradan el micelio del hongo y sugieren que se debe a la interacción de los monoterpenos con el ergosterol, formando un canal en la membrana y debilitándola, afectando a diferentes organelos (Miron y col 2014).

b. Parámetros de calidad

Cuando se aplican fungicidas a frutas y hortalizas, los productores buscan compuestos que no afecten su proceso de maduración, así como los parámetros de calidad. En los frutos de papaya evaluados en este proyecto, los parámetros de calidad no se vieron afectados por la aplicación de las fracciones de *V. mollis* (FH y FAE) disueltas en lecitina (60 mg/mL). Durante el almacenamiento a 13 °C, se observó un cambio significativo en los parámetros de calidad, que evidencian un avance en la maduración de los frutos de papaya. Sin embargo, entre estos parámetros, solo la pérdida de peso mostró diferencias significativas entre tratamientos, los valores obtenidos para los tratamientos FH y FAE fueron menores que los de TBZ (Cuadro 9). Esto se debe a que todos los tratamientos, a excepción del control positivo (TBZ) contienen lecitina, el cual es un compuesto hidrofóbico que actúa como recubrimiento en la superficie del fruto y reduce el intercambio de agua (Pérez-Gago y col 2003; Tomás y col 2005). En la literatura se reportan resultados similares, donde la aplicación de extractos de plantas naturales produce una reducción en la incidencia y severidad

Cuadro 9. Parámetros de calidad de frutos de papaya infectados con *C. gloeosporioides* y tratados con fracciones de *V. mollis* y tiabendazol (TBZ). Los frutos fueron almacenados por 16 d a 13 °C.

Parámetro	Valor inicial	Tratamiento					
		Control	TBZ	FH ₂₀	FH ₄₀	FAE ₃₀	FAE ₆₀
PP ¹ (%)	0.0 ± 0.0 c	7.68 ± 1.24 ab	8.57 ± 0.93 a	6.57 ± 1.68 b	6.12 ± 0.86 b	6.11 ± 1.42 b	6.18 ± 0.54 b
Firmeza (N)	46.35 0 ± 3.15 a	28.48 0 ± 5.48 b	26.84 ± 2.75 b	30.03 ± 6.63 b	30.51 ± 3.56 b	27.84 ± 2.57 b	28.62 ± 13 b
pH	6.27 ± 0.06 b	6.80 ± 0.11 a	6.88 ± 0.16 a	6.87 ± 0.15 a	6.93 ± 0.21 a	6.94 ± 0.09 a	6.90 ± 0.16 a
AT ²	0.083 ± 4x10 ⁻³ a	0.077 ± 4x10 ⁻³ b	0.076 ± 2x10 ⁻³ b	0.074 ± 2x10 ⁻³ b	0.075 ± 4x10 ⁻³ b	0.076 ± 7x10 ⁻³ b	0.072 ± 5x10 ⁻³ b
SST ³	6.57 ± 0.21 b	8.93 ± 0.24 a	8.89 ± 0.37 a	8.98 ± 0.17 a	8.87 ± 0.24 a	9.02 ± 0.21 a	8.88 ± 0.23 a

Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). FH₂₀ y FH₄₀: Fracción hexánica de *V. mollis* a 20 y 40 mg/mL, respectivamente. FAE₃₀ y FAE₆₀: Fracción de acetato de etilo de *V. mollis* a 30 y 60 mg/mL, respectivamente.

¹ Pérdida de peso (PP) expresado como porcentaje de pérdida de peso.

² Acidez titulable (AT) expresado como porcentaje de ácido cítrico.

³ Sólidos solubles totales (SST) expresado como °Brix.

de antracnosis sin mostrar efectos negativos sobre los parámetros de calidad del fruto (Meng y col 2015; Maha-Lashka y col 2019), lo cual fomenta la implementación de estos recursos para combatir enfermedades poscosecha.

3. Análisis fitoquímico

Las fracciones de *V. mollis* aplicadas en el ensayo *in vivo* dieron positivo en cinco de las seis familias de metabolitos evaluados (Cuadro 10), donde únicamente la evaluación de saponinas resultó negativa. Se observó una mayor diversidad de fitoquímicos en la FAE-VM, mostrando presencia de taninos, flavonoides, cumarinas y terpenos/esteroides; mientras que en la FH-VM se observaron alcaloides, cumarinas y terpenos/esteroides. Dichos compuestos han sido reportados previamente en frutos de uvalama y otras especies del género *Vitex*, donde los compuestos más abundantes son terpenoides, flavonoides y catequinas. Se ha reportado también que metabolitos como polifenoles, alcaloides y terpenos poseen importantes propiedades antimicrobianas (Pío-León y col 2014).

En un ensayo preliminar (datos no mostrados), la FH-VM y FAE-VM se obtuvieron mediante extracción Soxhlet (90 °C, 5 h). Los resultados mostraron que las condiciones de extracción afectaron la composición de la FAE-VM, provocando una disminución en su actividad, mientras que la actividad de la FH-VM se mantuvo sin cambios. Esto sugiere que la actividad de la FAE-VM es generada por compuestos termolábiles como los polifenoles, y la actividad de la FH-VM por compuestos más resistentes como los terpenos. Ali y col (2014 y 2015) encontraron que terpenos provenientes de jengibre y hierba de limón (α -pineno, 1,8-cineol, borneol, geranial y neral) inhiben la germinación de esporas, el crecimiento de micelio y el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya almacenados a 12 y 25 °C. El mecanismo de estos compuestos involucra el debilitamiento del micelio del hongo como se observa por microscopía óptica en hifas de *C. gloeosporioides* y *C. musae* (García y col 2008), esto puede deberse a la interacción de dichos compuestos con el ergosterol, causando el debilitamiento de la membrana (Miron y col 2014).

Cuadro 10. Análisis fitoquímico de las fracciones hexánica (FH) y acetato de etilo (FAE) de pulpa de *V. mollis*.¹

Fitoquímicos	FH	FAE
Alcaloides	+	-
Cumarinas	+	+
Flavonoides	-	+
Saponinas	-	-
Taninos	-	+
Terpenos/esteroides	+	+

¹ (+) Presencia y (-) ausencia de fitoquímicos.

4. Selección de la FMA

Tomando en cuenta los resultados de incidencia, severidad y parámetros de calidad, la FH de *V. mollis* (pulpa) se seleccionó como la fracción más activa (FMA). Esto debido a que los parámetros de calidad no fueron afectados por esta fracción, aunado a esto, el tratamiento FH₄₀ tuvo un efecto más marcado tanto en la incidencia como en la severidad de antracnosis, y finalmente, el rendimiento de esta fracción fue ligeramente superior a la de la FAE.

B. ETAPA 2: TOXICIDAD Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

1. Toxicidad aguda de la FMA

Debido a su origen natural, se ha optado por utilizar extractos de plantas como fuente de compuestos con actividad biológica debido a que se reconoce su baja toxicidad (López-Angulo y col 2014). Sin embargo, es de suma importancia valorar su toxicidad para su uso posterior en medicamentos o alimentos, y la toxicidad aguda en modelos murinos es un primer acercamiento para establecer la dosis segura de aplicación.

La FH-VM (FMA) fue inocua en el ensayo de toxicidad aguda en ratones BALB/c y su dosis letal media LD₅₀ es mayor a 2 g/kg. Después de 24 h de la ingesta, los ratones se mantuvieron vivos y sin signos de morbilidad. Este valor de LD₅₀ categoriza a la FMA en el grupo de menor toxicidad. De igual manera no se observaron cambios de coloración en heces, orina y ojos, así como cansancio o falta de coordinación. De igual manera, no se presentaron diferencias en la ganancia de peso, así como en la apariencia, coloración o peso de órganos vitales entre los ratones control y los administrados con la FMA (Cuadro 11).

En la bibliografía se ha reportado ampliamente la baja toxicidad aguda de extractos y fracciones provenientes de la pulpa de diferentes frutos. Por ejemplo, Abubakar y col (2010) y Megala y Geetha (2012) encontraron valores de toxicidad aguda mayores a 2 g/kg en extractos de pulpa de *Tamarindus indica* y *Pithecellobium dulce*. Adicionalmente, estos autores no observaron cambios en el peso de órganos como cerebro, corazón, hígado, estómago y riñón. Por su parte, Traesel y col (2014 y 2016) evaluaron la toxicidad de una fracción hidrofóbica de la pulpa de *Acrocomia*

Cuadro 11. Ganancia de peso (g) y relación peso de órgano y peso total del ratón de ratones bal/c después de 30 días de la administración de la FMA a 2 g/kg.

Tratamiento	Ganancia de peso	Relación órgano y peso total				
		Bazo	Corazón	Hígado	Pulmones	Riñones
Control	8.66 ± 1.04a	0.24 ± 0.04a	1.85 ± 0.07a	4.92 ± 0.43a	0.57 ± 0.03a	0.65 ± 0.07a
FMA	9.4 ± 2.15a	0.24 ± 0.03a	1.79 ± 0.11a	4.96 ± 0.32a	0.56 ± 0.03a	0.66 ± 0.02a

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia significativa ($p < 0.05$).

aculeata y *Caryocar brasiliense* y registraron valores de LD₅₀ superiores a 2 g/kg.

2. Identificación de compuestos con actividad antifúngica en la FMA

a. Separación en columna abierta

Tras la separación en columna abierta, se colectaron 92 alícuotas de 10 mL aproximadamente. Las alícuotas se mezclaron en una de siete subfracciones (FH₁-FH₇) de acuerdo a las similitudes de los R_f en la TLC (Cuadro 12). Las subfracciones dieron positivo a la prueba de triterpenos (tonalidad violeta), excepto la FH₅ que presentó una tonalidad entre dorada y amarilla. El rendimiento de las subfracciones fue variable, la subfracción FH₁ constituía aproximadamente el 71% de la FMA, mientras que la subfracción FH₅ únicamente el 1%. Es importante resaltar que aun cuando cada subfracción estuvo caracterizada por la aparición de una sola mancha, esto no indica necesariamente que solo un compuesto se encuentre presente en cada subfracción, esto debido a que el indicador es para revelar triterpenos; además otros triterpenos podrían estar presentes, pero en menor concentración para ser detectados por este método.

Con respecto a la actividad antifúngica, la subfracción FH₃ mostró la mayor actividad (CMI = 0.5 mg/mL), seguida de la FH₂ (CMI = 2 mg/mL), el resto de las fracciones mostraron una CMI igual o mayor a 10 mg/mL. El incremento de actividad en la subfracción FH₃ con respecto a la FMA, indica que en esta subfracción se concentraron los compuestos responsables de inhibir el crecimiento del hongo *C. gloeosporioides*, por lo cual esta subfracción fue utilizada para caracterizar los compuestos responsables de dicha actividad y analizar su mecanismo de acción.

En comparación con el fungicida TBZ, las subfracciones FH₂ y FH₃ presentaron una mayor actividad antifúngica, ya que TBZ no fue capaz de inhibir completamente el crecimiento micelial en el rango de 0.5 a 2 mg/mL. Es importante mencionar que la actividad antifúngica de la subfracción FH₃ se evaluó en medio líquido (PDB) y el valor de CMI fue de 0.20 mg/mL. En el rango de 0.05-0.15 mg/mL se observaron pequeñas

Cuadro 12. Rendimiento, factor de retardo y actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* de subfracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de la FMA.

Subfracciones	Rendimiento¹ (% p/p)	R_f²	CMI³ (mg/mL)
FH-VM (FMA)	2.65	-	20
FH ₁	1.88	0.94	>10
FH ₂	0.10	0.51	2
FH ₃	0.20	0.45	0.5
FH ₄	0.22	0.36	10
FH ₅	0.03	0.22	10
FH ₆	0.06	0.064	10
FH ₇	0.14	0	>10
TBZ	-	-	>2

¹ El rendimiento se expresó en base al peso seco de la harina.

² Factor de retardo del soluto presente en cada subfracción utilizando hexano y acetato de etilo (8:2 v/v) como fase móvil.

³ Concentración mínima inhibitoria (mg/mL).

partículas de micelio y un gran número de conidios no germinados, lo que indica que la efectividad de esta subfracción varía dependiendo del método de aplicación.

b. Análisis mediante GC-MS

El análisis por CG-MS mostró 10 componentes principales en la subfracción FH₃ (Figura 9). Los compuestos más abundantes fueron los siguientes: 4-decenoato de metilo (39.43%); diferentes ácidos grasos, siendo el ácido caprílico (AC) el más abundante (27.53%); el triterpeno pentacíclico 24-metilencicloartanol (14.29%); y otras familias de compuestos (9.76%) (Cuadro 13).

Los compuestos antes mencionados se encuentran comúnmente en plantas. Los ácidos grasos saturados (ácidos caprílico, cáprico, palmítico y esteárico) e insaturados (ácido linoleico) de la subfracción FH₃ se sintetizan en los plástidos celulares y luego se transportan al retículo endoplásmico para su ensamblaje (Kim 2020). La presencia de ácidos grasos de cadena media (6-12 carbonos) como el ácido caprílico (8 carbonos) es poco común en frutos carnosos, este compuesto se clasifica como generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (Liu y col 2014). El ácido caprílico se encuentra comúnmente en el aceite de coco y palma y en la leche de algunos mamíferos (Kubitschke y col 2014); por lo tanto, la pulpa de uvalama es considerada una fuente novedosa de este valioso compuesto.

Los compuestos hexacosano y eicosanol se han aislado de ceras de frutas. Están presentes en la capa externa de las células epidérmicas y ayudan a disminuir la pérdida de agua (Pambou y col 2016). Para el caso del aldehído detectado, el cinamaldehído es un fenilpropanoide y un intermediario en la biosíntesis de compuestos fenólicos. El éster metílico del ácido 4-decenoico se encuentra con poca frecuencia en la naturaleza; sin embargo, Keeney y Patton (1955) y Blum y col (1959) identificaron derivados del ácido decenoico en productos lácteos y en jalea real, respectivamente. En cuanto a la presencia del compuesto 24-metilencicloartanol, las plantas del género *Vitex* contienen una amplia variedad de triterpenos pentacíclicos. (Pío-León y col 2014; Yao y col 2016). Sin embargo, éste es el primer estudio donde

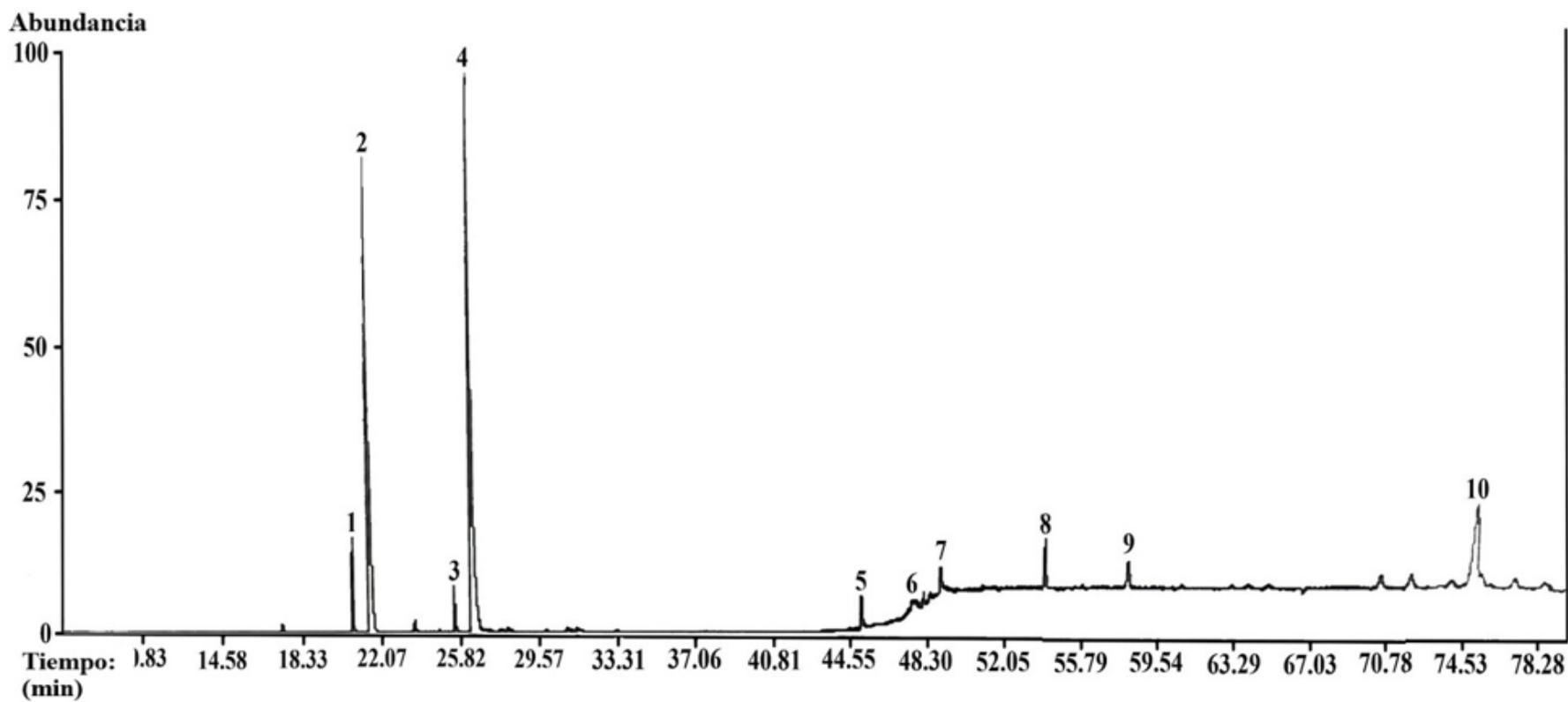


Figura 9. Cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la subfracción FH₃.

Cuadro 13. Datos cromatográficos de la subfracción FH₃

Compuesto químico					
No.	Tiempo de retención (min)	Nombre	Masa	Factor de coincidencia	Área (%)
1	20.43	Cinamaldehído	132	937	3.77
2	21.22	Ácido caprílico	144	940	27.53
3	25.29	Ácido cáprico	172	930	2.62
4	26.11	4-Decenoato de metilo	184	759	39.43
5	45.20	Ácido palmítico	256	932	1.91
6	48.28	Ácido esteárico	284	851	0.63
7	49.12	Ácido linoleico	280	862	1.17
8	54.29	Hexacosano	366	883	3.36
9	58.42	Eicosanol	298	886	2.63
10	75.45	24-metilencicloartanol	440	913	14.29

se reporta este compuesto en una especie del género *Vitex*.

Es importante resaltar que los componentes con mayor área bajo la curva (>5%) en la subfracción FH₃ (4-decenoato de metilo, ácido caprílico y 24-metilencicloartanol) cuentan con potentes propiedades antimicrobianas (Blum y col 1959; Silva y col 2008; Liu y col 2014).

c. Aislamiento y evaluación antifúngica del triterpeno

i. Aislamiento

La separación cromatográfica de la FH₃ dio como resultado 50 alícuotas de 5 mL, y el triterpeno se encontró principalmente en 8 de estas. El compuesto fue cristalizado y se obtuvieron aproximadamente 20 mg. El punto de fusión de los cristales fue de 80-81 °C. Este rango tan corto en el punto de fusión y la presencia de un solo punto en TLC con diferentes fases móviles sugiere la pureza del compuesto.

ii. Evaluación antifúngica

Los cristales del compuesto 24-metilencicloartanol fueron inactivos contra *C. gloeosporioides* (CMI > 0.5 mg/mL), lo que sugiere que la actividad de la subfracción FH₃ puede atribuirse a alguno de los otros dos compuestos o a un efecto sinérgico.

d. Identificación, cuantificación y evaluación antifúngica del ácido caprílico

i. Identificación y cuantificación

El tiempo de retención del estándar de ácido caprílico (AC) (pureza >99%) fue de 21.22 min, coincidiendo con el compuesto 2 de la subfracción FH₃ (Figuras 10A y 10B), el cual fue identificado como tal previamente (NIST08.LIB). Este dato se confirmó al mezclar la subfracción con el estándar, observándose la intensificación de la señal a un tiempo de retención de 21.22 min (Figura 10C).

El AC representa aproximadamente el 46.4% (p/p) de la subfracción FH₃, y presenta un contenido de 25.53 ± 1.09 mg de ácido caprílico/100 gff. Una de las fuentes vegetales más comunes de AC es el aceite de coco y palma, donde presentan un contenido de 8 y 4.5%, respectivamente. A pesar de que la subfracción FH₃ presenta un porcentaje mayor que las fuentes más comunes de AC, de manera general el coco presenta un contenido mayor con 171.2 mg de AC/100 gff (Boateng y col 2016).

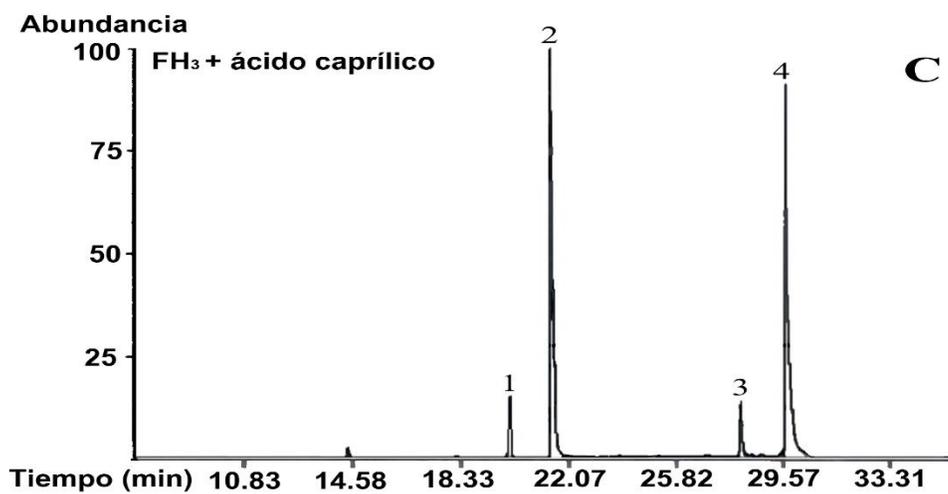
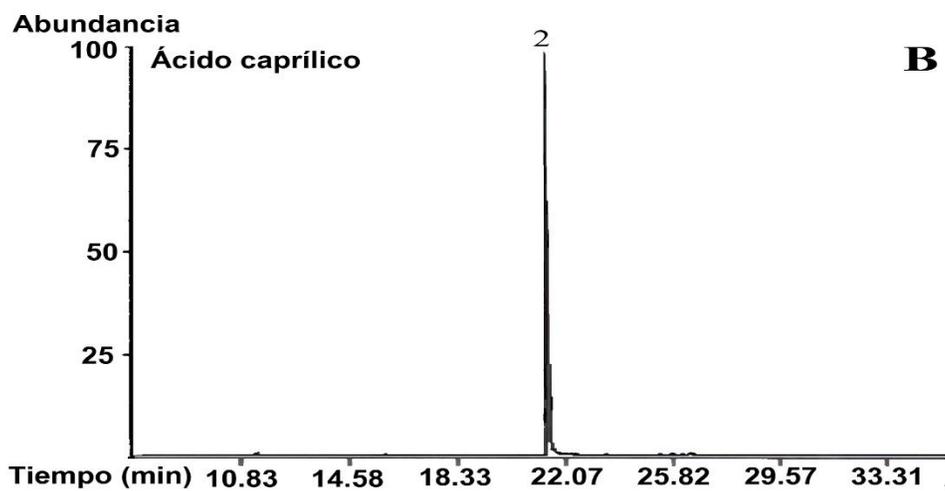
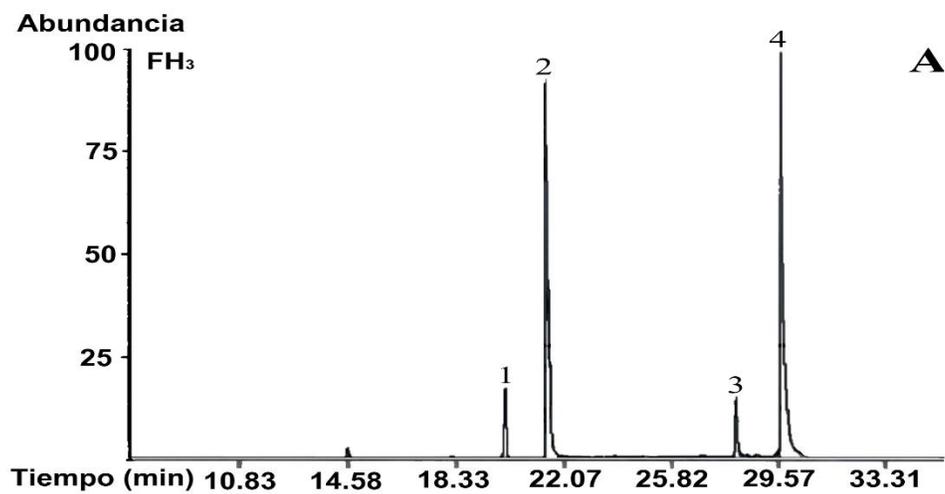


Figura 10. Cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la subfracción FH₃ (A), ácido caprílico (B), y subfracción FH₃ + ácido caprílico (C). (1) Cinamaldehído, (2) ácido caprílico, (3) ácido cáprico y (4) 4-decenoato de metilo.

ii. Evaluación antifúngica

El estándar de AC presentó un potente efecto antifúngico contra *C. gloeosporioides* con una CMI de 0.125 mg/mL. La comparación de la CMI del AC con el de la subfracción FH₃ (CMI =0.5 mg/mL) demuestra que la actividad antifúngica está estrechamente relacionada con la presencia de AC, descartando un efecto sinérgico entre los componentes mayoritarios. Previamente se ha reportado que la mezcla de ácidos grasos de cadena media (ácido caprílico, ácido pelargónico y ácido cáprico) inhiben el crecimiento micelial de diferentes hongos fitopatógenos con una CMI de 0.1 y 0.2 mg/mL para *Phytophthora infestans* y *Botrytis cinerea*, respectivamente (Liu y col 2014).

Los estudios del efecto antifúngico de ácidos de cadena media (como el AC) contra hongos fitopatógenos son escasos, no obstante, existen múltiples estudios clínicos. Bae (2019) reportó el efecto de estos compuestos sobre *Candida albicans* y demostró que el ácido caprílico daña la membrana y bloquea diferentes transportadores (15-36% de las células). Por su parte, Jadhav col (2017) demostraron que el ácido caprílico afecta la expresión transcripcional de genes asociados con la morfogénesis, adhesión y formación de biopelículas en *C. albicans*.

Contrastando con el efecto antifúngico del ácido caprílico, Suchodolski y col (2021) registraron efectos similares con otro ácido graso de cadena media (ácido cáprico) combinado con fluconazol. Esta combinación afectó a un transportador ubicado en la membrana plasmática de *C. albicans*. Los autores observaron que este efecto fue producido por la inhibición de la síntesis de ergosterol. En este caso es importante mencionar que la aplicación exclusiva del ácido cáprico tuvo el efecto contrario.

C. ETAPA 3: MECANISMO

1. Germinación de esporas

Para los tratamientos control y TBZ, la germinación de esporas alcanzó un 80% aproximadamente en las primeras 8 h (Figura 11A). En las esporas tratadas con la subfracción FH₃ a 0.25 y 0.50 mg/mL, la germinación se inhibió notablemente,

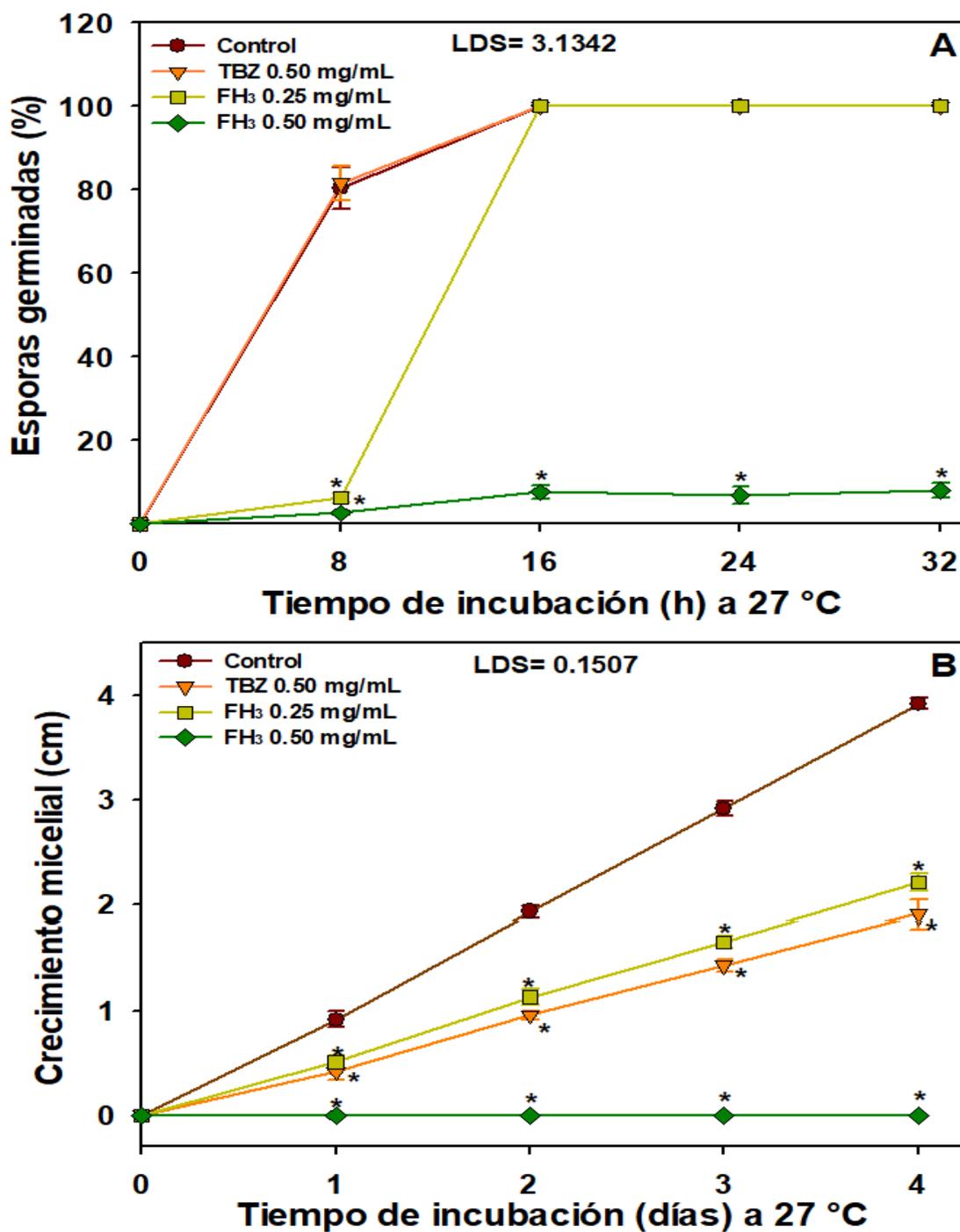


Figura 11. Germinación de esporas (A) y crecimiento micelial (B) de *Colletotrichum gloeosporioides* tratado con hexano (control), tiabendazol (TBZ) y la subfracción FH₃ (0.25 and 0.50 mg/mL). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos (*) denotan diferencia significativa ($p > 0.05$) con el control a un mismo tiempo de evaluación.

alcanzando apenas un 5%. Después de 16 h, el tratamiento FH₃ (0.50 mg/mL) tuvo un porcentaje similar de esporas germinadas. Por otro lado, en los otros tratamientos todas las esporas visualizadas ya se encontraban germinadas. Después de 24 h, la germinación de esporas en el tratamiento FH₃ (0.50 mg/mL) permaneció estable con una germinación menor al 10%. En la última evaluación (32 h), hubo una diferencia importante entre el tratamiento control y las esporas tratadas con la subfracción FH₃ a 0.50 mg/mL. En el tratamiento control se presentó un desarrollo visible de micelio, mientras que en las esporas tratadas solo se observó la germinación de un pequeño número de ellas (Figura 12).

Estos resultados son muy alentadores debido a que la inhibición de la germinación es uno de los mecanismos más convenientes para combatir hongos fitopatógenos, ya que las esporas son la estructura más resistente del hongo, y la responsable del éxito de estos microorganismos.

El efecto sobre la germinación de *C. gloeosporioides* sugiere que la subfracción FH₃ compromete la funcionalidad de las esporas y que podría usarse para detener la infección de la fruta en etapas tempranas. Este efecto se ha reportado previamente con otros extractos naturales. Do Nascimento y col (2019) reportaron que diferentes aceites esenciales de plantas interfieren con la germinación de *C. gloeosporioides* al irrumpir en diferentes procesos metabólicos como síntesis de proteínas y respiración. Por su parte, Ahmed y col (2016) reportaron que extractos de hoja de *Capsicum chinense* y *Capsicum annuum* tuvieron un efecto marcado sobre la germinación de *B. cinerea*, lo cual fue asociado a la inducción de estrés oxidativo y daño a nivel de membrana plasmática.

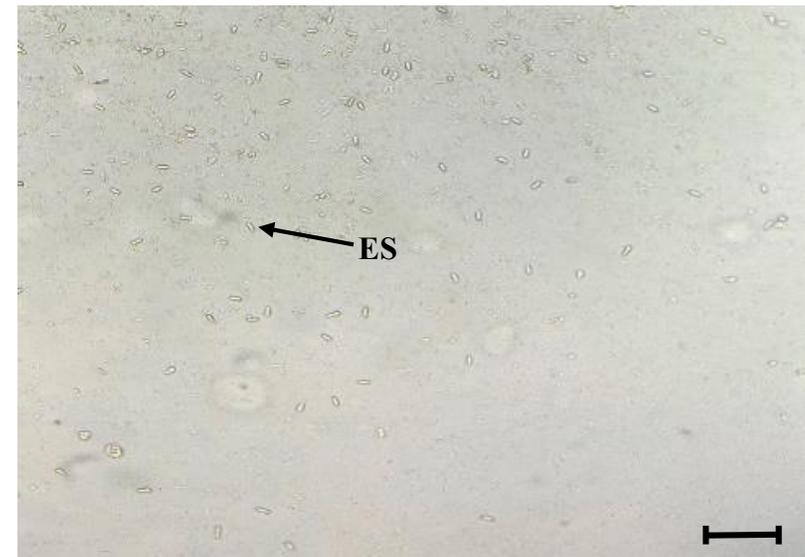
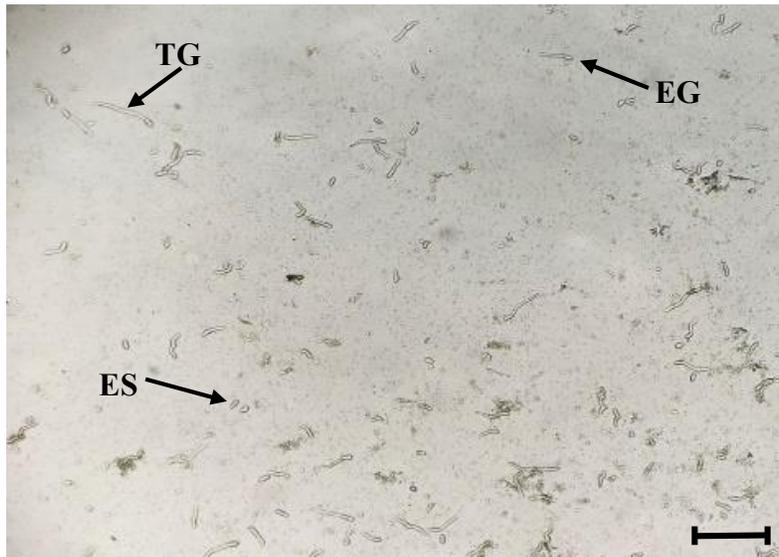
2. Crecimiento micelial

El diámetro del micelio creció alrededor de 1 cm por día en el tratamiento control (Figura 11B). Para los tratamientos FH₃ a 0.25 mg/mL y TBZ, el crecimiento micelial se redujo significativamente, mostrando al final de la evaluación un crecimiento de aproximadamente 2 cm. En el tratamiento FH₃ a 0.50 mg/mL no se observó crecimiento de micelio aun después de 4 días a 27 °C. Este resultado era de esperarse debido a que previamente se observó la inhibición de la germinación. Cabe mencionar que el

Control

FH₃ 0.50 mg/mL

8 h



32 h

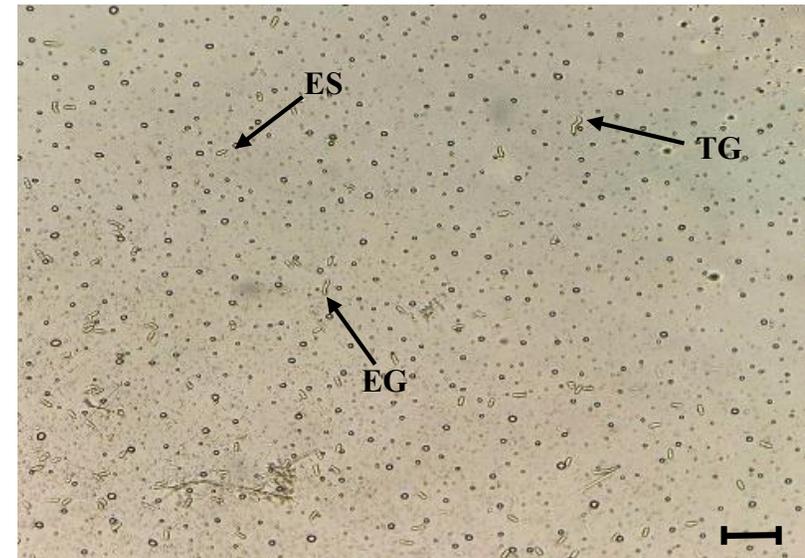
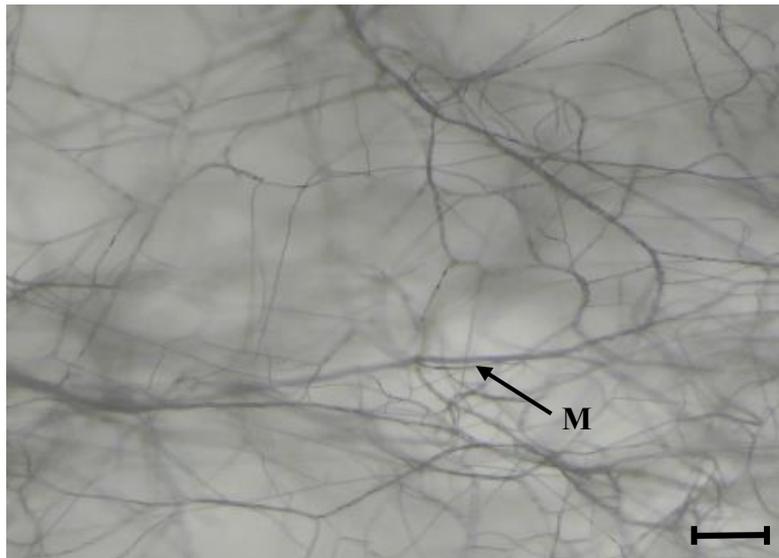


Figura 12. Imágenes representativas de esporas germinadas de *Colletotrichum gloeosporioides* tratadas con hexano (control) y la subfracción FH₃ (0.50 mg/mL). ES = Esporas sin germinar, EG= Esporas germinadas, TG= Tubo germinativo, M= Micelio. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico con un aumento de 10x. Barras = 50 µm.

tratamiento con TBZ mostró un valor de CMI superior a los valores para diferentes cepas de referencia (Gutiérrez-Alonso y Gutiérrez-Alonso 2003), lo que sugiere su resistencia a TBZ. Esta resistencia al TBZ se ha registrado para otras especies de *Colletotrichum* en México (Torres-Calzada y col 2015). La efectividad de la subfracción FH₃ contra la germinación de esporas y el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* fue mayor que TBZ. Por lo tanto, la subfracción FH₃ podría ser un agente prometedor de origen natural contra la antracnosis en papaya.

3. Ensayos de protección

En los ensayos de protección de las esporas se observó un efecto notable debido a la adición de los diferentes compuestos (Cuadro 14). Después de 24 h de la inoculación, los valores de CMI se incrementaron en las esporas tratadas con sorbitol, ácido palmítico y ácido linoleico. Después de 48 h, el efecto protector de los compuestos presentó el siguiente orden descendente: sorbitol \approx ácido linoleico > ácido palmítico > ergosterol. Las muestras tratadas con hexano o agua en lugar de los diferentes compuestos, permanecieron con un valor de 0.5 mg/mL incluso después de 5 días a 27 °C.

Los ensayos de protección proporcionaron información relevante sobre el mecanismo antifúngico de la subfracción FH₃. Las esporas fueron protegidas en mayor medida por el ácido linoleico y el sorbitol, lo que sugiere que el ácido caprílico en la subfracción interactúa con el ácido linoleico en la membrana de las esporas debilitando dicha estructura. Esta hipótesis fue apoyada por la protección inducida por sorbitol. El sorbitol es un potente osmoprotector que se utiliza para estabilizar el protoplasto de la célula cuando la pared celular y la membrana han sido dañadas. Estos datos sugieren que, en el presente experimento los ácidos linoleico y palmítico interactúan con el AC en la subfracción, lo que limita la interacción del AC con el hongo y permite su crecimiento tal como se ve reflejado con el aumento en el valor de la CMI.

El efecto protector del ácido palmítico fue menor que el exhibido por el ácido linoleico, esto indica una mejor interacción entre el AC y los ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, la subfracción FH₃ sería un antifúngico más eficaz en las membranas

Cuadro 14. Efecto de la adición de ácidos grasos (ácido linoleico y palmítico), ergosterol y sorbitol sobre la CMI (mg/mL) de la subfracción FH₃.

Tratamiento	24 h	48 h
Control	0.5	0.5
Ácido linoleico	1.5	2.5
Ácido palmítico	1.0	2.0
Ergosterol	0.5	1.0
Sorbitol	1.5	2.5

de esporas de fitopatógenos compuestas con una mayor proporción de ácidos grasos insaturados. El menor efecto protector del ergosterol, detectado solo después de 48 h (Tabla 4), sugiere que la interacción con ergosterol tiene una menor contribución a la actividad antifúngica del AC.

Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Liu y col (2013), quienes observaron que la adición de ácido oleico al medio de cultivo inducía resistencia al ácido caprílico en *Saccharomyces cerevisiae*, además disminuía la lixiviación de componentes intracelulares. Análisis *in silico* sugieren el mecanismo del AC para irrumpir en la estructura de membranas, el AC (8 carbonos) penetra la membrana en menos de 1000 ns; por otro lado, el ácido láurico (12 carbonos) no interacciona con la membrana y tiende a formar micelas estables al llegar a su equilibrio (1500 ns) (Bhattacharyya y col 2020). Esto se debe a que el carácter lipofílico del ácido láurico es muy alto, mientras que en el ácido caprílico el balance entre sus propiedades hidrofílicas y lipofílicas es ideal para interactuar con los fosfolípidos de la membrana plasmática.

En cuanto a la unión de ergosterol, este mecanismo está asociado con compuestos volátiles como geraniol, nerol y citral. Dichos compuestos se asocian con el ergosterol y forman de canales, afectando negativamente la permeabilidad de la membrana celular y funcionamiento de las mitocondrias (Miron y col 2014).

4. Lixiviación del contenido intracelular

El contenido intracelular de *C. gloeosporioides* se vio afectado por el tratamiento con la subfracción FH₃, presentándose lixiviación de componentes (Cuadro 15). La lixiviación de proteína, ADN y electrolitos que se observa en el tratamiento control es debida al debilitamiento normal de las esporas y el micelio. Esto se presenta por el daño mecánico sufrido durante la agitación de la mezcla. Aunado a esto, la exposición del hongo a un medio hipotónico ocasiona la liberación del contenido intracelular por la marcada diferencia de concentración.

Cuadro 15. Lixiviación de proteína, ADN y electrolitos en esporas y micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* tratados con la subfracción FH₃ (0.25 and 0.50 mg/mL).

	Proteína ¹	ADN ²	Electrolitos ³
Tratamiento	Esporas		
Control	2.41 ± 0.01 c	0.10 ± 0.01 b	68.49 ± 3.19 b
FH ₃ (0.25 mg/mL)	2.60 ± 0.06 b	0.11 ± 4x10 ⁻³ b	78.93 ± 3.43 a
FH ₃ (0.50 mg/mL)	2.70 ± 0.08 a	0.14 ± 5x10 ⁻³ a	81.33 ± 3.94 a
	Micelio		
Control	5.16 ± 0.20 a	0.04 ± 5x10 ⁻³ a	60.48 ± 4.53 b
FH ₃ (0.25 mg/mL)	5.07 ± 0.25 a	0.04 ± 8x10 ⁻³ a	76.10 ± 4.74 a
FH ₃ (0.50 mg/mL)	5.32 ± 0.16 a	0.04 ± 6x10 ⁻³ a	76.52 ± 2.17 a

Para esporas y micelio respectivamente, letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05).

¹ La lixiviación de proteína se expresó como µg/mL.

² Absorbancia a 260 nm.

³ Porcentaje de electrolitos lixiviados.

El tratamiento de las esporas con la subfracción FH₃ indujo la lixiviación de los tres componentes evaluados, resultando un efecto más marcado en los electrolitos. Con respecto al micelio, el tratamiento sólo indujo lixiviación de electrolitos (Cuadro 15), con un incremento del 16% en el tratamiento FH₃ con respecto al control.

Reportes previos han demostrado que el selenio, el AC combinado con fungicidas sintéticos y compuestos antifúngicos de fuentes naturales conducen a la lixiviación del contenido intracelular (Haraguchi y col 1999; Wu y col 2014; Yang y col 2016; Shi y col 2021). Además del mecanismo descrito anteriormente (interacción de ácidos grasos), estos autores discuten que la lixiviación en células fúngicas se atribuye a la inducción de estrés oxidativo al desencadenar la producción de radicales y la acumulación de peróxido de hidrógeno y subproductos de la peroxidación de lípidos.

5. Efecto sobre la microestructura

La microscopía confocal de *C. gloeosporioides* sometido a los tratamientos proporcionó imágenes con mayor resolución y contraste que las obtenidas por microscopía óptica (Figura 12). En la Figura 13 se observan microfotografías de esporas y micelio de *C. gloeosporioides* tratados con la subfracción FH₃, AC y TBZ, mientras que en la Figura 14 se muestran estas mismas estructuras y tratamientos, pero teñidas con un fluoróforo específico de membranas.

Con respecto a las esporas de *C. gloeosporioides*, su longitud no se vio afectada por ninguno de los tratamientos (Figura 13A-D), presentándose un valor aproximado de 14 µm en todas ellas (Cuadro 16). Por otro lado, a simple vista se puede observar que las esporas en el tratamiento con la subfracción FH₃ (Figura 13B) poseen una forma más delgada que el resto de los tratamientos. El análisis estadístico del ancho de las esporas evidenció una reducción significativa en todos los tratamientos con respecto al control. En los tratamientos con AC y TBZ se observó una reducción del 8 y 10%, respectivamente, mientras que con la subfracción FH₃ fue del 26% (Cuadro 16). La disminución en el ancho de las esporas especialmente en el tratamiento con la subfracción sugiere un daño en la pared celular (PC) y alteraciones en la permeabilidad de la membrana, considerando que la pared celular se encarga de

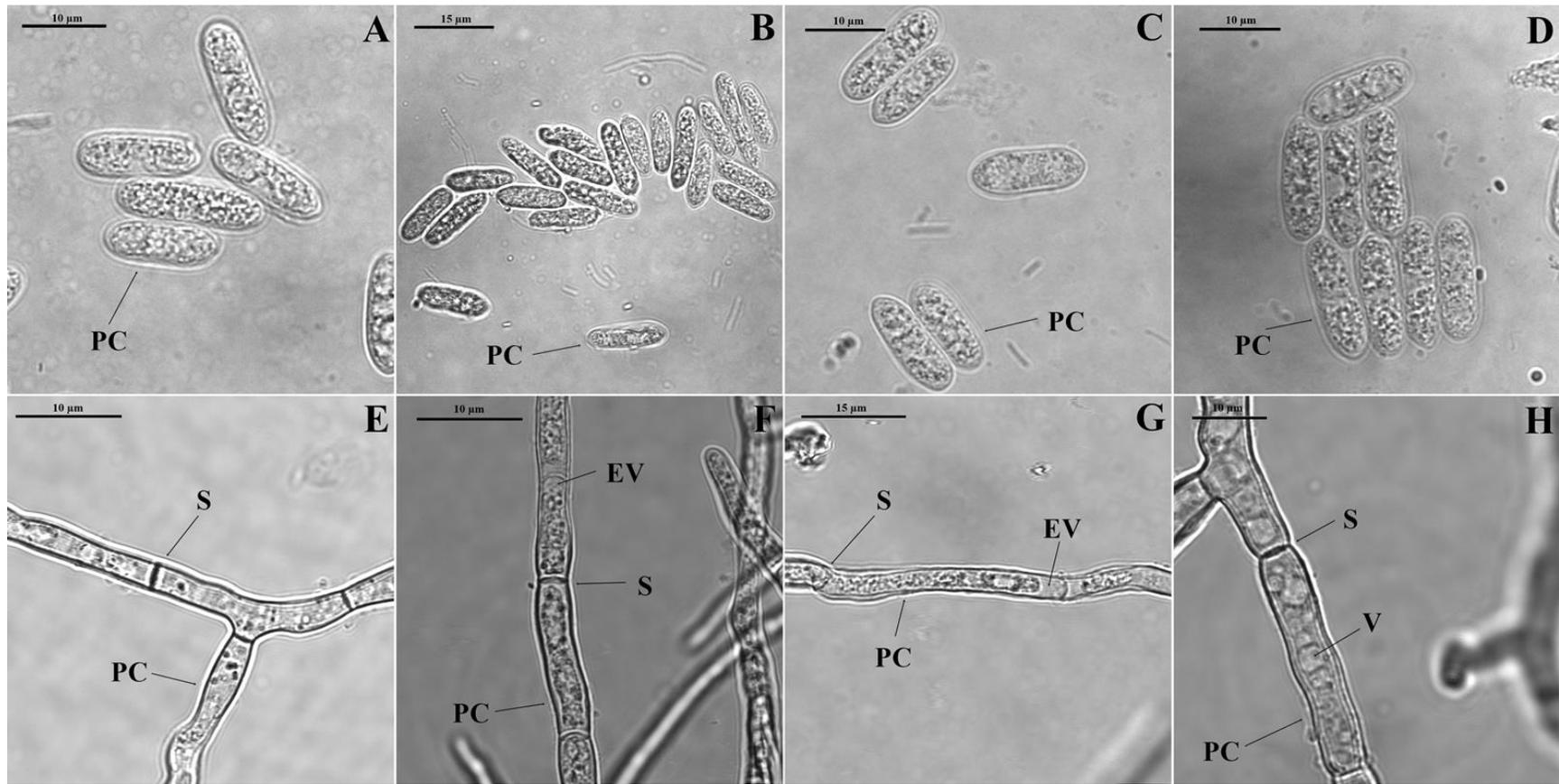


Figura 13. Muestras de *Colletotrichum gloeosporioides* observadas mediante microscopía confocal. Esporas y micelio sin tratamiento (A y E) y tratadas con FH₃ (0.5 mg/mL) (B y F), ácido caprílico (0.125 mg/mL) (C y G) y tiabendazol (0.5 mg/mL) (D y H). S=Septo, EV=Espacio vacío, V=Vacuola, PC=Pared celular.

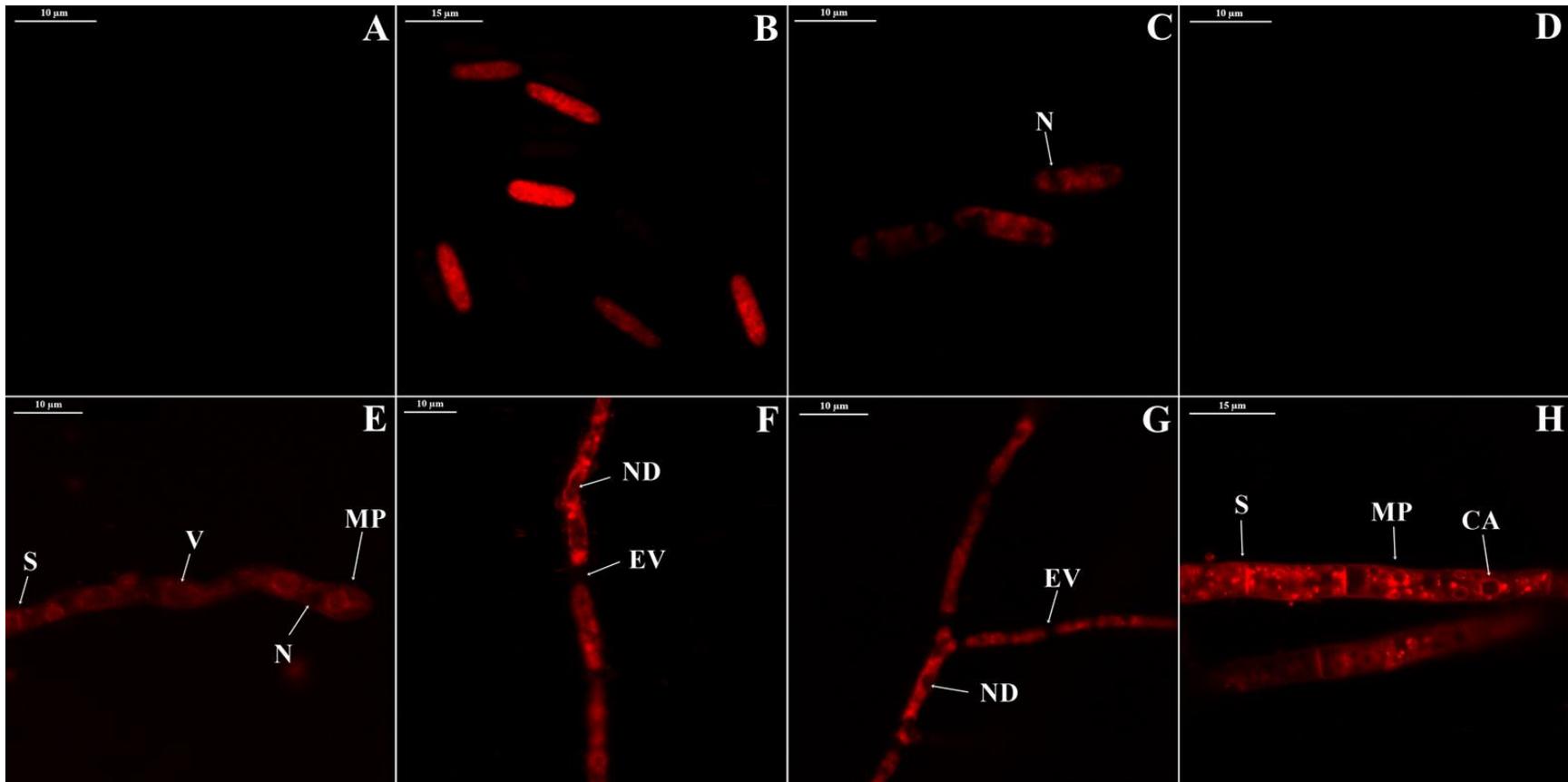


Figura 14. Muestras de *Colletotrichum gloeosporioides* observadas mediante microscopía de fluorescencia confocal a 558 nm de excitación y 734 nm de emisión. Esporas y micelio sin tratamiento (A y E) y tratadas con FH₃ (0.5 mg/mL) (B y F), ácido caprílico (0.125 mg/mL) (C y G) y tiabendazol (0.5 mg/mL) (D y H). S=Septo, V=Vacuola, N=Núcleo, MP=Membrana plasmática, EV=Espacio vacío, ND=Núcleo deformado, CA=Cuerpo apoptótico.

mantener la turgencia y rigidez de la célula. Por lo tanto, estas observaciones confirman los resultados del ensayo con sorbitol, compuesto que actúa como osmoprotector al unirse a las esporas. Con respecto al efecto menos pronunciado en el tratamiento con AC, se podría deber a que la concentración evaluada de este compuesto fue menor, recordando que el CMI del AC fue 0.125 mg/mL, mientras que en 0.5 mg/mL de la subfracción FH₃ hay aproximadamente 0.23 mg/mL de AC (46% p/p). En el tratamiento con TBZ no se esperaban cambios en las esporas, ya que este tratamiento ataca principalmente al micelio del hongo (Allen y Gottlieb 1970). Según lo reportado en la literatura, Rosas-Burgos y col (2011) y Velez-Haro y col (2018) observaron una alteración en las dimensiones de esporas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides* tratadas con los extractos de *Baccharis glutinosa* y *Heliopsis longipes*. Los autores asociaron esta disminución a un debilitamiento en las estructuras externas del hongo.

En cuanto a los cambios de textura en las esporas, al interior de estas se observa un patrón granular en todos los tratamientos (Figura 13A-D). Al analizar la textura se observaron valores similares de entropía entre tratamientos (8.34-8.53); sin embargo, las esporas tratadas con TBZ presentaron un valor estadísticamente menor (8.19), lo cual puede deberse a las pequeñas áreas sin granulación en el centro de las esporas de este tratamiento. Estos datos revelan que no hay cambios aparentes al interior de las esporas por la acción de la subfracción o del AC. Por otro lado, el TBZ no inhibe la germinación de las esporas, pero genera cambios en las esporas observadas mediante microscopía confocal.

Referente a la intensidad de fluorescencia de esporas y micelio sometidas a los tratamientos, es importante mencionar que el colorante empleado (FM4-64) emite fluorescencia color rojo únicamente cuando se encuentra en un ambiente lipofílico, como membranas, teniendo especial afinidad hacia la membrana plasmática y vacuolar (Read y Hickey 2001). Al respecto, los tratamientos control y TBZ no se detectó fluorescencia (Figura 14A y D), mientras que en los tratamientos con la subfracción FH₃ y AC (Figura 14B y C) presentaron una intensidad de fluorescencia de 212.0 y 59.2, respectivamente (Cuadro 16). La ausencia de fluorescencia en los tratamientos control y TBZ se explican por la estructura de las esporas, las cuales

Cuadro 16. Dimensiones, entropía e intensidad de fluorescencia de esporas y micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* tratadas con la subfracción FH₃ (0.5 mg/mL), ácido caprílico (0.125 mg/mL) y tiabendazol (0.5 mg/mL).

Parámetro	Control	FH ₃	Ácido caprílico	Tiabendazol
Esporas				
Largo (µm)	14.63 ± 1.06 a	13.93 ± 0.35 a	14.10 ± 0.99 a	14.63 ± 1.14 a
Ancho (µm)	5.55 ± 0.35 a	4.13 ± 0.35 c	5.12 ± 0.48 b	5.01 ± 0.54 b
Entropía¹	8.43 ± 0.15 a	8.53 ± 0.12 a	8.34 ± 0.23 ab	8.19 ± 0.24 b
Fluorescencia¹	-	212.00 ± 26.39 a	59.20 ± 24.08 b	-
Micelio				
Ancho (µm)	5.07 ± 0.68 b	4.89 ± 0.50 b	5.00 ± 0.59 b	6.31 ± 0.34 a
Entropía¹	6.95 ± 0.57 b	7.88 ± 0.22 a	7.65 ± 0.35 a	7.77 ± 0.31 a
Fluorescencia¹	31.07 ± 9.92 c	97.86 ± 24.20 a	99.01 ± 17.38 a	65.17 ± 17.57 b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ Entropía y fluorescencia se reportan como parámetros adimensionales.

cuentan con una pared celular gruesa, según lo reportado para *Ascospaera apis* (Li y col 2018), y *C. gloeosporioides* (Gomes-Moraes y col 2013). Para este último se observan 3 capas en la pared que protegen la membrana plasmática de la espora (Gomes-Moraes y col 2013). Es por lo anterior que se plantea que la pared celular impide el acceso del colorante a las membranas y que se fije el colorante. En el mismo sentido, la subfracción FH₃ y el AC debilitan la pared celular de la espora y la permeabilidad de la membrana plasmática aumenta. La diferencia en la intensidad de la fluorescencia para los tratamientos con la subfracción FH₃ y el estándar de AC podría explicarse por la mayor concentración de AC en la FH₃, efecto similar al descrito para ancho de la espora. De igual manera, solo en las esporas del tratamiento AC se logra apreciar la presencia de dos núcleos característicos, lo que indicaría la fragmentación de esta estructura en el tratamiento con la subfracción. Resultados similares fueron registrados para las esporas de *Alternaria alternata*, las esporas del tratamiento control no fijaron el colorante FM4-64, mientras que aquellas tratadas con quitosano y extracto de *Pseudomonas fluorescens* presentaron daño y coloración en las zonas afectadas (Trejo-Raya y col 2021).

Al analizar el efecto de los tratamientos sobre el micelio, el grosor del micelio tratado con TBZ fue el único que presentó diferencia con respecto al control, incrementándose en 24% (Cuadro 16). El grosor del micelio en el resto de los tratamientos fue aproximadamente de 5 µm. El efecto del TBZ puede deberse a la presencia de presuntas vacuolas (V) y cuerpos apoptóticos (CA) que incrementan el volumen del micelio.

Las imágenes del micelio sin y con el fluoróforo aportan información complementaria para entender el efecto de los tratamientos sobre la textura (Figura 13E-H y Figura 14E-H). Los límites exteriores del micelio presentan la pared celular (Figura 13E-H), mientras que al interior se observan los septos que dividen las células y participan en la comunicación célula-célula. El micelio en el tratamiento control muestra estructuras normales: áreas lisas, pequeños gránulos (Figura 13E), membrana plasmática bien definida y algunas vacuolas con forma circular u ovalada. Adicionalmente, se observan áreas circulares de color oscuro a lo largo de micelio (Figura 14E) que podrían pertenecer al núcleo de la célula. Por otro lado, las imágenes

confocales de los tratamientos con la subfracción FH₃ y AC se caracterizan por un mayor granulamiento y la aparición de espacios vacíos enseguida de los septos (Figura 13F y G). De igual manera, se observan áreas irregulares de color rojo y negro que podrían pertenecer a compartimentos desintegrados como vacuolas y núcleos. Estas observaciones revelan el daño causado por el AC a las membranas plasmática y de orgánulos; efecto reportado previamente para hongos y levaduras de importancia clínica (Bae 2019; Bhattacharyya y col 2020).

Las imágenes del tratamiento con TBZ muestran estructuras de forma globular y tamaño muy variable que se observan mejor en las muestras teñidas (Figura 13H y Figura 14H). Estas estructuras se encuentran a lo largo de todo el micelio y las de mayor tamaño (diámetro 3.0-4.5 µm) podrían ser vacuolas (Figura 13H), mientras que las de menor tamaño (1-2 µm) podría ser cuerpos apoptóticos (Figura 14H). Los cuerpos apoptóticos son vesículas extracelulares que contienen componentes celulares como proteínas degradadas, remanentes de la cromatina, fragmentos de ADN e incluso organelos. Estas estructuras se forman durante el proceso de apoptosis. La apoptosis puede desencadenarse de manera natural o bajo condiciones de estrés ambiental o derivado de un compuesto tóxico. En primera instancia, se podrían confundir todas estas estructuras con vacuolas, pero debido a la variabilidad de tamaño que solo se registra para el tratamiento con TBZ se descarta esta idea. Al considerar el diámetro del micelio se descartan otras vesículas extracelulares como exosomas y microvesículas que abarcan diámetros entre 40 y 500 nm (Battistelli y Falcieri 2020).

En la intensidad de fluorescencia en el micelio, todos los tratamientos presentaron coloración a las longitudes de excitación y emisión empleadas (Figura 14). En este experimento el tratamiento control (Figura 14E) presentó el valor más bajo de fluorescencia (31.07) y el color de la imagen tuvo que ser intensificado para la apreciación de las estructuras. En el tratamiento con TBZ (Figura 14H) se obtuvo un valor de 65.17, mientras que en los tratamientos con la subfracción y el AC (Figura 14F y G) presentaron valores de 97.86 y 99.01, respectivamente. Para el micelio se puede observar que, de igual manera, los tratamientos con AC lograron una intensidad más alta. Sin embargo, en este caso el tratamiento control sí emitió señal debido a

que el colorante puede ser introducido fácilmente en el micelio por endocitosis (Read y Hickey 2001). Esto nos podría indicar que el AC entra en contacto con la membrana y se adhiere a ella, incrementando sus propiedades lipofílicas y afinidad con el colorante. Adicional a esto, se observó que el contenido de AC no tuvo un efecto sobre la intensidad de fluorescencia.

D. ETAPA 4: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VIVO* DE LA SUBFRACCIÓN

1. Incidencia y severidad de antracnosis

En esta etapa del trabajo se propone a la subfracción FH₃ como alternativa más eficiente que la FH-VM, debido a que se requiere una menor concentración de extracto y emulsificante para la aplicación del tratamiento. Además, como se observa en las fotografías, la aplicación de la FH₃ (Figura 15) no provocó un cambio en el brillo del fruto como se observa en el ensayo *in vivo* previo (Figura 7).

La aparición de síntomas de antracnosis fue paulatina durante el almacenamiento a 23 °C. Los primeros signos aparecieron al día 4 para los tratamientos control y TBZ (Figura 16A), mientras que para el tratamiento con la FH₃ a ambas concentraciones (0.5 y 1 mg/mL) fue al día 5. En este caso, el desarrollo de la sintomatología en los frutos fue más lenta, a pesar de estar almacenados a una temperatura más alta, al compararlo con lo registrado en el ensayo *in vivo* previo (Figura 8A). Esto se presentó debido a que los frutos en esta ocasión se encontraban en una etapa menor de maduración (etapa 2); considérese que la enfermedad se desarrolla cuando el fruto entra en su pico climatérico, se ablanda y se facilita la infección (Kader 2007). Durante el almacenamiento, el tratamiento con TBZ no presentó ninguna diferencia significativa con respecto a los frutos control. En el caso de los tratamientos con la subfracción a 0.5 mg/mL se presentó una reducción en la incidencia únicamente en los días 9 y 10, mientras que a 1 mg/mL el efecto protector fue desde el día 7 hasta el día 11. Para estos tratamientos se observó que alcanzaron una incidencia del 100% hasta el día 12, mientras que en los tratamientos control y TBZ se alcanzó al día 10. Por su parte, Fischer y col (2018) reportaron una reducción de la incidencia de antracnosis en

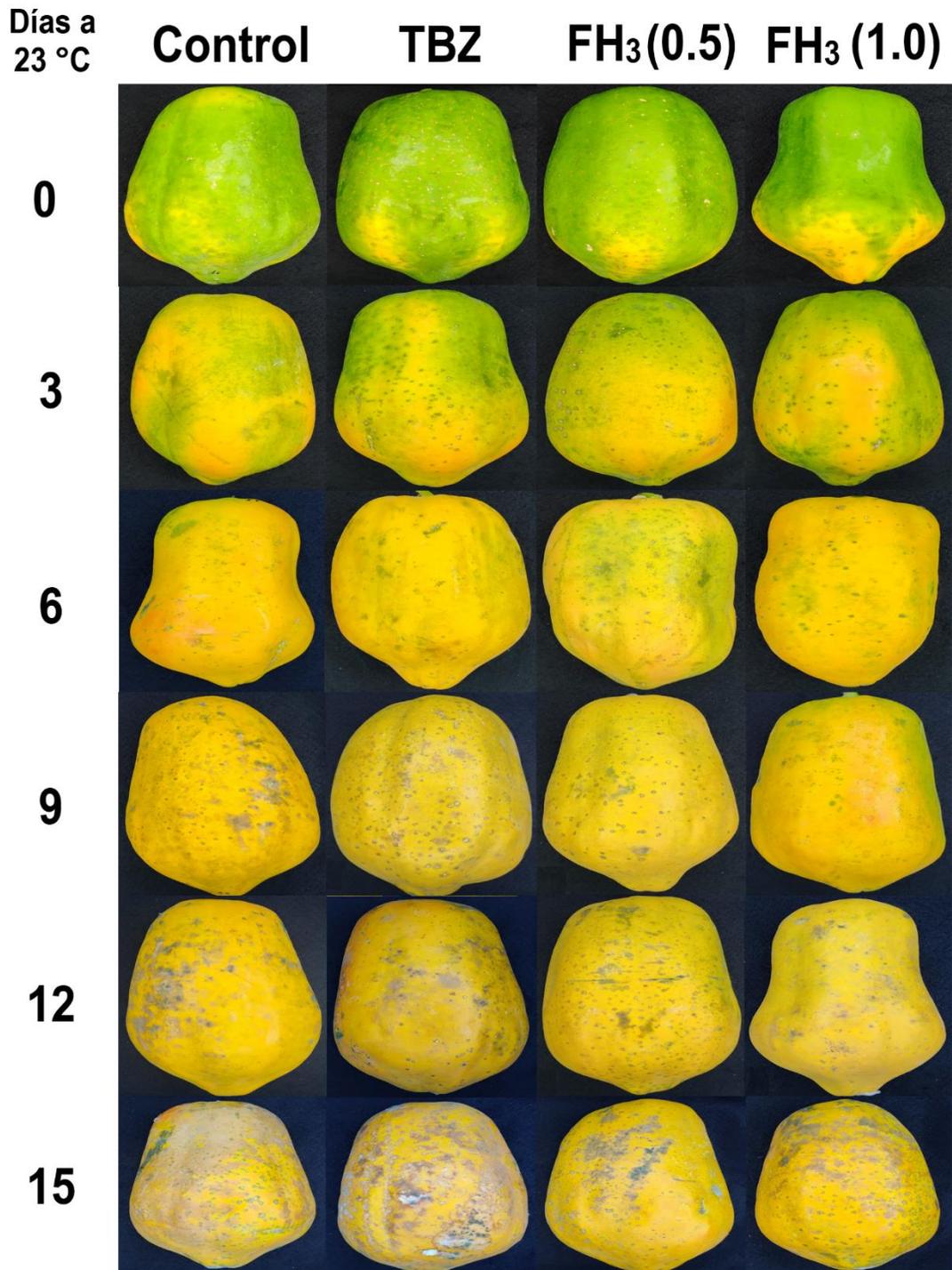


Figura 15. Imágenes representativas de frutos de papaya infectados con *C. gloeosporioides* y tratados con la subfracción FH₃ (0.5 y 1 mg/mL). Tiabendazol (TBZ) y Tween-80 se usaron como control positivo y negativo, respectivamente. Los frutos fueron almacenados por 15 d a 23 °C.

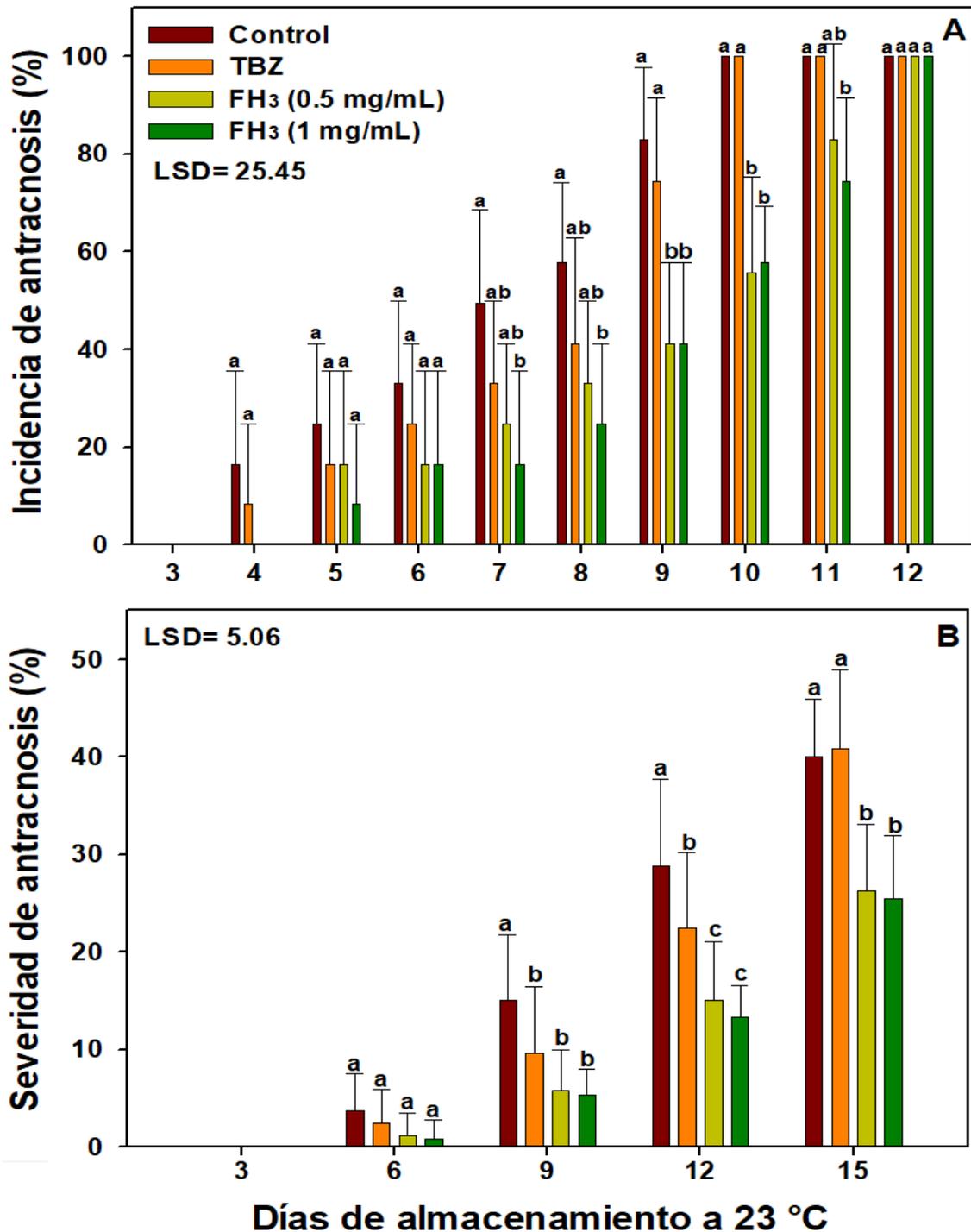


Figura 16. Efecto de la aplicación de la subfracción FH₃ (0.5 y 1 mg/mL) sobre la incidencia (A) y severidad (B) de antracnosis en frutos de papaya durante su almacenamiento a 23 °C. Tiabendazol y Tween-80 se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes en el mismo día de evaluación indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

aguacate al aplicar TBZ, lo que contrasta con nuestros resultados y haciendo evidente que el hongo presenta resistencia al fungicida sintético. Por otro lado, Cruz y col (2013) presentaron resultados similares, la incidencia de antracnosis en plátano disminuye cuando son tratados con un extracto de *Azadirachta indica* (20 y 40 mg/mL), observando un mejor resultado a 40 mg/mL.

Con respecto a la severidad de antracnosis (Figura 16B), el tratamiento con TBZ logró un efecto significativo únicamente los días 9 y 12, mientras que los tratamientos con la FH₃ (0.5 y 1 mg/mL) tuvieron un efecto más marcado con un efecto significativo desde el día 9 al 15. Para el final del almacenamiento, los frutos control y los tratados con TBZ presentaron una severidad del 40%, mientras que en los tratados con las subfracciones FH₃ se presentó un valor del 25%, aproximadamente. Contrastando los resultados de incidencia y severidad, la aplicación de TBZ no logró retardar la aparición de los síntomas, pero sí tuvo un efecto para desacelerar el avance de la enfermedad. Por otro lado, la subfracción FH₃ mostró ser más eficiente que el TBZ en ambos parámetros.

De manera similar, Martínez y col (2020) observaron una reducción en la severidad de antracnosis de papaya y mango al aplicar un extracto de la planta *Brosimum rubescens*. Los autores observaron que el extracto hexánico tuvo un mayor efecto *in vitro* y la actividad estuvo fuertemente relacionada con los compuestos Xantiletina y 7-demetilsuberosina. El mecanismo se asoció con la inhibición de la germinación de esporas y con la baja velocidad de desintoxicación del hongo hacia el compuesto 7-demetilsuberosina. Con respecto al TBZ, se ha reportado previamente el efecto de la aplicación de TBZ en mango a 0.5 mg/mL, encontrándose una disminución importante en la severidad de antracnosis (Gutiérrez-Alonso y col 2003).

IX. CONCLUSIONES

Los EM de *P. sartorianum* (pulpa), *E. kimnachii* (hoja) y *V. mollis* (pulpa) tuvieron los mejores resultados en la evaluación antifúngica y toxicidad *in vitro*.

La fracción hexánica (FH-VM) y en acetato de etilo (FAE-VM) de *V. mollis* presentaron las mejores propiedades antifúngicas y menores valores de toxicidad *in vitro*.

La FH-VM fue elegida como la fracción más activa (FMA) al mostrar una mayor reducción en el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya sin impactar negativamente sus parámetros de calidad.

La FMA cae en la categoría de más baja toxicidad en ratones BALB/c ($LD_{50} > 2$ g/kg), el peso corporal y la apariencia y peso de los órganos de los ratones fue normal.

Los principales componentes de la subfracción con mayor actividad contra *C. gloeosporioides* (FH₃, CMI = 0.5 mg/mL) fueron ácido caprílico, 4-decenoato de metilo, y 24-metilencicloartanol.

El compuesto 24-metilencicloartanol es reportado por primera en *V. mollis*, pero carece de actividad contra *C. gloeosporioides*.

La actividad antifúngica de los frutos de *Vitex mollis* fue asociada principalmente con la presencia del ácido caprílico (CMI=0.125 mg/mL).

El mecanismo del ácido caprílico estuvo asociado con la disrupción de la membrana plasmática y debilitamiento de la pared celular en esporas y micelio del hongo.

La subfracción FH₃ es mejor opción que el tiabendazol (TBZ) para inhibir el desarrollo de antracnosis en frutos de papaya.

V. mollis es una fuente novedosa de ácido caprílico, el cual debilita la estructura externa de *C. gloeosporioides* y este puede ser utilizado como fungicida natural e inocuo para reducir la prevalencia de antracnosis en cultivos Sinaloenses.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar MG, Yerima MB, Zahriya AG, Ukwuani AN. 2010. Acute toxicity and antifungal studies of ethanolic leaves, stem and pulp extract of *Tamarindus indica*. Res J Pharm Biol Chem 1: 104-111.
- Ademe, A, Ayalew A, Woldetsadik K. 2013. Evaluation of antifungal activity of plant extracts against papaya anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Plant Pathol Microbiol 4:1-10.
- Ahmed FA, Sipes BS, Alvarez AM. 2016. Natural products to control postharvest gray mold of tomato fruit-possible mechanisms. Plant Pathol Microbiol 7:1-7.
- Ali A, Ling CW, Zahid N, Kying OM. 2014. Efficacy of propolis and cinnamon oil coating in controlling post-harvest anthracnose and quality of chilli (*Capsicum annuum* L.) during cold storage. Food Bioproc Tech 7:2742-2748.
- Ali A, Wee Pheng T, Mustafa MA. 2015. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of 'Sekaki' papaya. J Appl Microbiol 118: 1456-1466.
- Allen PM, Gottlieb D. 1970. Mechanism of action of the fungicide thiabendazole, 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole. J Appl Microbiol 20:919-926.
- AOAC. 2012. Association of Official Analytical Chemists. Décimo sexta edición. Washington DC, USA. Disponible en: <http://www.aoac.org/aoac>. Consultado el 08 de abril de 2020.
- Ávalos-García A, Pérez-Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). S Fisiol Veg 2: 119-145.
- Ayón-Reyna L, González-Robles A, Rendón-Maldonado J, Báez-Flores M, López-López M, Vega-García M. 2017a. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. Postharvest Biol Technol 124:85–90.
- Ayón-Reyna LE, López-Valenzuela JE, Delgado-Vargas F, López-López ME, Molina-Corral FJ, Carrillo-López A, Vega-García MO. 2017b. Effect of the combination hot water-calcium chloride on the in vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and the postharvest quality of infected papaya. Plant Pathol J 33:572-581.

- Bae YS. 2019. Short-term antifungal treatments of caprylic acid with carvacrol or thymol induce synergistic 6-log reduction of pathogenic *Candida albicans* by cell membrane disruption and efflux pump inhibition. *Cell Physiol Biochem* 53:285-300.
- Basulto SF, Díaz PR, Gutiérrez AO, Santamaría FJ, Larqué S. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya Maradol. *REMEXCA* 2:631-643.
- Battistelli M, Falcieri E. 2020. Apoptotic bodies: particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology* 9: 1-11.
- Bautista-Baños S, García-Domínguez E, Barrera-Necha LL, Reyes-Chilpa R, Wilson CL. 2003. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biol Technol* 29:81-92.
- Bhattacharyya A, Sinha M, Singh H, Patel RS, Ghosh S, Sardana K. 2020. Mechanistic insight into the antifungal effects of a fatty acid derivative against drug-resistant fungal infections. *Front microbiol* 11:1-16.
- Blum MS, Novak AF, Taber S. 1959. 10-Hydroxy- Δ^2 -decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science* 130:452-453.
- Boateng L, Ansong R, Owusu WB, Steiner-Asiedu M. 2016. Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review. *Ghana Med J* 50: 189–196.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Camacho-Hernández IL, Cisneros-Rodríguez C, Uribe-Beltrán MJ, Ríos-Morgan A, Delgado-Vargas F. 2002. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*. *Fitoterapia* 73:411–413.
- Camacho-Hernández IL, Cisneros-Rodríguez C, Uribe-Beltrán MJ, Ríos-Morgan A, Delgado-Vargas F. 2004. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. *Fitoterapia* 75:401–404.

- Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas Soriano E, Nieto Ángel D, Gutiérrez Alonso JG. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* penz. Rev Mex Fitopatol 20:88–93.
- Cavalcante-Fonseca R, Alves de Souza N, Lima-Correa C, Ferreira Garcia L, Guilherme-Vieira dos Reis L, Garcia-Rodriguez A. 2013. Assessment of toxic potential of cerrado fruit seeds using *Artemia salina* bioassay. Food Sci Technol 33:251-256.
- Chávez-Sánchez I, Carrillo-López A, Vega-García M, Yahia EM. 2013. The effect of antifungal hot-water treatments on papaya postharvest quality and activity of pectinmethylesterase and polygalacturonase. J Food Sci Technol 50:101-107.
- Chen C, Wan C, Peng X, Chen Y, Chen M, Chen J. 2015. Optimization of antifungal extracts from *ficus hirta* fruits using response surface methodology and antifungal activity tests. Molecules 20:19647–19659.
- Crozier A, Clifford M.N, Ashihara H. 2006. Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Primera edición. E.U.A.: Blackwell Publishing. 735.
- Cruz MES, Schwan-Estrada KRF, Clemente E; Itako AT, Stangarlin JR, Cruz MJS. 2013. Plant extracts for controlling the post-harvest anthracnose of banana fruit. Rev Bras PI Med Campinas 15:727-733.
- Dean R, Jan AL, Kan V, Pretorius Z, Hammond-Kosack K, Di Pietro A. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol 13:414–430.
- Deng YX, Cao M, Shi DX, Yin ZQ, Jia RY, Xu J, Wang C, Lv C, Liang X, He C, Yang ZR, Zhao J. 2013. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: Acute and subacute toxicity. Environ toxicol 35:240–246.
- Do Nascimento DM, Dos Santos PL, Kronka AZ. 2019. Essential oils inhibit *Colletotrichum gloeosporioides* spore germination. Summa Phytopathol 45:432-433.
- Dong Q, Luo J, Qiu W, Cai L, Anjum SI, Li B, Hou MS, Xie GL, Sun GH. 2016. Inhibitory effect of camptothecin against rice bacterial brown stripe pathogen *Acidovorax avenaesub* sp. Avenae RS-2. Molecules 8:978-985.

- El Batam H, Hasib A, Ouattmane A, Abdelali B, Dehbi F, Joauad A. 2013. Yield and composition of carob bean gum produced from different Moroccan populations of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *J Mater Environ Sci* 4:309-314.
- Etuk EU, Francis UU. 2003. Acute toxicity and efficacy of *Psidium guajaba* leaves water extract on *Salmonella typhi* infected wistar rats. *Pak J Biol Sci* 6:195-197.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas. Disponible de: <http://www.fao.org/docrep/x5056s/x5056S00.htm#Contents>. Consultado el 3 de noviembre de 2020.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data>. Consultado el 20 de marzo del 2022.
- Feng G, Zhangc X, Zhangd Z, Yea H, Liuc Y, Yang G, Chenc C, Chena M, Yana C, Wange L, Zhangc J, Zhanga J. 2019. Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* and *in vivo* on mango fruit. *Postharvest Biol Technol* 147:139–147.
- Ficker C, Smith ML, Akpagana K, Gbeassor M, Zhang J, Durst T, Assabgui R, Arnason JT. 2003. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother Res* 17:897–902.
- Fischer IH, Froes MM, Arruda Palharini MC, Souza Fileti M, Sodário Cruz JC, Firmino AC. 2018. Effect of conventional and alternative products on postharvest disease control in avocados. *Rev Bras Frutic* 40:1-10.
- Garcia R, Alves SS, Santos MP, Viégas-Aquije MF, Fernandes AR, Dos Santos RB, Ventura JA, Fernandes MB. 2008. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J Microbiol* 39:163-168.
- Gomes-Moraes SR, Osama Tanaka FA, Massola Júnior NS. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Rev Bras Frutic Jaboticabal* 35:657-664.
- Gutiérrez-Alonso O, Gutiérrez-Alonso JG. 2003. Evaluación de resistencia a benomil, thiabendazol y azoxystrobin para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* penz.) en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en postcosecha. *Rev Mex fitopatol* 21:228-232.

- Gutiérrez-Alonso JG, Gutiérrez-Alonso O, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Zavaleta-Mejía E, Delgadillo-Sánchez F, Vaquera-Huerta H. 2003. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. Rev Mex Fitopatol 21:260-266.
- Haraguchi H, Kataoka S, Okamoto S. 1999. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. Phytother Res 13:151-156.
- Harborne J. 1973. Phytochemical Methods. Chapman and Hall. London.
- Hyde KD, Cai L, McKenzie EHC, Yang YL, Zhang JZ, Prihastuti H. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. Fungal Divers 39:1-17.
- Iskandarov US, Guzalova AG, Davranov KD. 2006. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Appl Biochem Microbiol 42:72–76.
- Ismail-Suhaimy NW, Noor-Azmi AK, Mohtarrudin N, Omar MH, Tohid FH, Cheema SM, Teh LK, Salleh MZ, Zakaria ZA. 2017. Semipurified ethyl acetate partition of methanolic extract of *Melastoma malabathricum* leaves exerts gastroprotective activity partly via its antioxidant-antisecretory-anti-inflammatory action and synergistic action of several flavonoid-based compounds. Oxid Med Cell Longev 17:1-14.
- Jadhav A, Mortale S, Halbandge S, Jangid P, Patil R, Gade W, Kharat K, Karuppaiyl SM. 2017. The dietary food components capric acid and caprylic acid inhibit virulence factors in *Candida albicans* through multitargeting. J Med Food 20:1083-1090.
- Jayaraman M, Arumugam G. 2012. Acute and sub-acute toxicity study of hydroalcoholic fruit extract of *Pithecellobium dulce*. Nat Prod Res 26:1167–1171.
- Jiménez-Díaz JA. 2002. Manual práctico para el cultivo de papaya hawaiana. Costa Rica. Earth. 108 páginas.
- Kader AA. 2007. Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. California, USA: Universidad de California. 437-440. Natural Product Research 24: 1907–1914.

- Keeney PG, Patton S. 1955. Elimination of 9-decenoic acid as a precursor of δ -decalactone in milk fat. *J Dairy Sci* 38:1390.
- Kevin LYW, Hussin AH, Zhari I, Chin JH. 2012. Sub-acute oral toxicity of methanol leaves extracts of *Catharanthus roseus* in rats. *J Acute Dis* 1:38-41.
- Kim HU. 2020. Lipid metabolism in plants. *Plants* 9:1-4.
- Kubitschke J, Lange H, Strutz H. 2014. Carboxylic Acids, Aliphatic. *Ullmann's encycl Ind Chem* 1:1–18.
- Latifa B, Bouchra L, Sanaa A, Najat C, Fouzia C, Adnane R. 2012. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *Afr J Biotechnol* 11:14083-14087.
- Li Z, You X, Wang L, Yan Z, Zhou Z. 2018. Spore morphology and ultrastructure of an *Ascosphaera apis* strain from the honeybees (*Apis mellifera*) in southwest China. *Mycologia* 110:325-338.
- Liu P, Chernyshov A, Najdi T, Fu Y, Dickerson J, Sandmeyer S, Jarboe L. 2013. Membrane stress caused by octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3239–3251.
- Liu X, Han R, Wang Y, Li X, Zhang M, Yan Y. 2014. Fungicidal activity of a medium-chain fatty acids mixture comprising caprylic, pelargonic and capric acids. *Plant Pathol J* 13:65-70.
- Looby C, Hauge JD, Barry D, Eaton WD. 2012. Fungal inhibition by *bromelia pinguin* (bromeliaceae) and its effect on nutrient cycle dynamics. *Trop Ecol* 53:225-234.
- López-Angulo G, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Vega-Aviña R, Ahumada-Santos YP, Delgado-Vargas F. 2014. Chemical composition and antioxidant, α -glucosidasa inhibitory and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. Species from Mexico. *Ariab J Chem* 1:1-10.
- López-Angulo G, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Vega-Aviña R, Báez-Flores M.E, Delgado-Vargas F. 2016. Bioactive components and antimutagenic and antioxidant activities of two *Echeveria* DC. species. *Ind Crops and Prod* 85:38–48.

- López-Navarrete MC, Arévalo-Lagarza LC, Nieta-Angel D. 2009. Uso de fungicidas y tratamiento térmico postcosecha para control de antracnosis en frutos papaya maradol. *Agroproductividad* 2:24-28.
- López-Velázquez J, Delgado-Vergas F, Ayón-Reyna L, López-Angulo G, Bautista-Baños S, Uriarte-Gastelum YG, López-López ME, Vega-García MO. 2021. Postharvest application of partitioned plant extract from Sinaloa, Mexico for controlling papaya pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Plant Pathol* 103:831-842.
- Lorke D. 1983. A new approach to practice acute toxicity testing. *Arch toxicol* 54:275-287.
- Low C, Maretzki AN. 1982. Papaya commodity fact sheet PA-A1. Coop exrtention service. Universidad de Hawái.
- Maha-Laksha, MCD, Villani-Sepala, D., Chithrani, R. 2019. Antifungal potential of some plant extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* causal organism of papaya anthracnose disease. *Asian J Biol Sci* 12:589-595.
- Malegori C, Franzetti L, Guidetti R, Casiraghi E, Rossi R. 2016. GLCM, an image analysis technique for early detection of biofilm. *J Food Eng* 185:48–55
- Manekeng HT, Mbaveng AT, Ntyam-Mendo SA, Agokeng AD, Kuete V. 2019. Evaluation of acute and subacute toxicities of *Psidium guajava* methanolic bark extract: a botanical with *in vitro* antiproliferative potential. *Evid-Based Complementary Altern Med* 1-13.
- Marangoni GA, Jackman LR, Stanley WD. 1995. Chilling-associated softening of tomato fruit is related to increased pectin methyl esterase activity. *J Food Sci* 60: 1277-1281.
- Marisco G, Santos RX, Aguiar R, Pungartnik B. 2017. Antifungal potential of terpenes from *Spondias purpurea* L. leaf extract against *Moniliophthora perniciosa* that causes witches broom disease of *Theobroma cacao*. *Inter J Complement Altern Med* 7:1-6.
- Martínez J, Gómez A, Gil J, Durango D. 2020. Controlling anthracnose by means of extracts, and their major constituents, from *Brosimum rubescens* Taub. *Biotechnol Rep* 25:1-8.

- Martínez-Ruiz M, Gómez-Velasco A, Juárez Z, Hernández L, Bach Z. 2013. Exploring the biological activities of *Echeveria leucotricha*. *Nat Prod Res* 27:1123-1126.
- Megala J, Geetha A. 2012. Acute and sub-acute toxicity study of hydroalcoholic fruit extract of *Pithecellobium dulce*. *Nat Prod Res* 26:1167–1171.
- Meng X, Li J, Fangcheng B, Zhu L, Ma Z. 2015. Antifungal activities of crude extractum from *Camellia semiserrata* Chi (Nanshancha) seed cake against *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium italicum* *in vitro* and *in vivo* fruit test. *Plant Pathol J* 31:414-420.
- Mercado-Silva E, Aquino-Bolaños EN. 2005. Enzimas involucradas en el deterioro. En: González-Aguilar GA, Gardea AA, Cuamea-Navarro F. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Hermosillo, Sonora, México: CIAD. 179-214.
- Miron D, Battisti F, Silva FK, Lana AD, Pippi B, Casanova B, Gnoatto S, Fuentefria A, Mayorka P, Schapoval ES. 2014. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Rev Bras Farmacogn* 24:660-667.
- Moiz AA, Amiya A, Zeeshan F, Saif H. 2013. Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. India. Formatex. 1195 páginas.
- Nair MS, Saxena A, Kaur C. 2018. Characterization and antifungal activity of pomegranate peel extract and its use in polysaccharide-based edible coatings to extend the shelf-life of capsicum (*Capsicum annum* L.). *Food Bioproc Technol* 11: 1317-1327.
- Natalini A, Schouten RE, Woltering EJ. 2010. The locular gel differentially affects translucency development and firmness decay in fresh-cut tomato slices. *Postharvest Biol Technol* 58:72-77.
- Oliveira GJ, Vitoria AP. 2011. Papaya: Nutritional and pharmacological characterization, and quality loss due to physiological disorders. An Overview. *Food Res Int* 44:1306–1313.
- Pambou E, Li Z, Campana M, Hughes A, Clifton L, Gutfreund P. 2016. Structural features of reconstituted wheat wax films. *J R Soc Interface* 13:1-12.

- Pérez-Gago, MB, Rojas, C, Del Río, MA. 2003. Effect of hydroxypropyl methylcellulose–lipid edible composite coatings on plum (cv. *Autumn giant*) quality during storage. *Food Chem Toxicol* 68:879-883.
- Perfect ES, Hughes BH, O’Connell JR, Green RJ. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet Biol* 27:186-198.
- Pío-León JF, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F. 2014. Biological activities and phytochemicals of the fruits of *Vitex* Plants. *Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine* 2:93-120.
- Popova A, Mihaylova D. 2019. Antinutrients in plant-based foods: A review. *Open Biotechnol J* 13:68-76.
- Prusky D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu Rev Phytopathol* 34:413–434.
- Rani A, Sharma A. 2013. The genus *Vitex*: A review. *Pharmacogn Rev* 7:188-198.
- Read N D, Hickey PJ. 2001. The vesicle trafficking network and tip growth in fungal hyphae. in *cell biology of plant and fungal tip growth* (a. Geitmann, m. Cresti and i. b. heath, eds), pp. 137–148. ios press, Amsterdam.
- Rojo-Báez I, García-Estrada RS, Sañudo-Barajas AJ, León-Félix J, Allende-Molar R. 2017a. Proceso de infección de antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol. *Rev Bras Frutic* 39:1-5.
- Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R. 2017b. Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Rev Mex fitopatol* 201:548-570.
- Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Plascencia-Jatomea M, Cinco-Moroyoqui FC, Robles-Zepeda RE, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Lares-Villa F. 2011. The effect of *Baccharis glutinosa* extract on the growth of mycotoxigenic fungi and fumonisin B1 and aflatoxin B1 production. *World J Microbiol Biotechnol* 27:1025-1033.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2022. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca

- y Alimentación. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca. Avance de siembras y cosechas. Disponible de: <http://www.siap.gob.mx/>. Consultado el 20 de marzo del 2022.
- Salem A, Saltana H. 2015. Chemical composition of pulp, seed and peel of red grape from Libya. *Glob J Sci Res* 3:6-11.
- Salinas-Sánchez DO, Arteaga Najera GL, León-Rivera I, Dorado-Ramírez O, Valladares-Cisneros MG, Navarro-García VM. 2009. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla sierra biosphere reserve in Morelos (México). *Polibotánica* 28:213-225.
- Semicol SA. 2019. Semillas Colombianas, Papayas hawaiana polinizadas Imp. S.f. Ficha Técnica de la Papaya Hawaiana. Bogotá, Colombia. Consultado el 11 de abril de 2019.
- Shi C, Knøchel S. 2021. Inhibitory effects of binary combinations of microbial metabolites on the growth of tolerant *Penicillium roqueforti* and *Mucor circinelloides*. *LWT - Food Sci Technol* 149:1-11.
- Silva MSS, De Lima SG, Oliveira EH, Lopes JAD, Chaves MH, Reis FAM. 2008. Anacardic acid derivatives from Brazilian propolis and their antibacterial activity. *Eclética Química* 33:1-6.
- Singh R, Chand K, Shahi NC. 2017. Enhancement of shelf life of fresh papaya under different storage conditions using edible coatings. *Int J Appl Agric* 15:60-67.
- Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Philipson, JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica* 59:250-252.
- Suchodolski J, Derkacz D, Bernat P. 2021. Capric acid secreted by *Saccharomyces boulardii* influences the susceptibility of *Candida albicans* to fluconazole and amphotericin B. *Sci Rep* 11:1-10.
- Toledo VM. 1994. La diversidad biológica de México: nuestros retos para la investigación en los noventas. Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México:34: 43-59.
- Tomás SA, Bosquez-Molina E, Stolik S, Sánchez F. 2005. Effects of mesquite gum-candelilla wax based edible coatings on the quality of guava fruit (*Psidium guajava* L.). *J Phys IV* 125:889-892.

- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. *Plant Dis* 99:1590-1995.
- Toudji GA, Dosseh K, Karou SD, Adjrah Y, Anani K, Ameyapoh Y, Simpore J. 2017. Acute and sub-acute toxicity of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. stem bark hydroalcoholic extract on Wistar rats. *J Pharm Pharmacol Res* 5:310-319.
- Traesel GK, Coelho de Souza J, Lima de Barros A, Souza MA, Onofre Schmitz W, Marques-Muzzi R, Aparecida Oesterreich S, Arena AC. 2014. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food Chem Toxicol* 74:320-325.
- Traesel GK, ToloueiMenegati SEL, Carvalhodos Santos A, Carvalho Souza RI, Villas Boas GR, Narciso-Justi P, Leite Kassuya CA, Sanjinez-Argandoña EJ, Oesterreich SA. 2016. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. *Food Chem Toxicol* 97: 224-231.
- Trejo-Raya AB, Rodríguez-Romero VM, Bautista-Baños S, Quiroz-Figueroa FR, Villanueva-Arce R, Durán-Páramo E. 2021. Effective *in vitro* control of two phytopathogens of agricultural interest using cell-free extracts of *Pseudomonas fluorescens* and chitosan. *Molecules* 26:1-13.
- Valencia-Botin AJ, Gutiérrez-Lomelí M, Morales-Del-Rio JA, Guerrero-Medina PJ, Robles-García, MA, Ruiz-Cruz S, Wong-Corral FJ, Borboa-Flores J, Rueda-Puente EO, Del-Toro-Sánchez CL. 2018. Inhibitory effect of *Vitex mollis* kunth extracts against bacteria and *Fusarium* species of human and agricultural importance. *Rev Fitotec Mex* 41:353-363.
- Velez-Haro JM, Buitimea-Cantúa NE, Rosas-Burgos EC, Molina-Torres J, Buitimea-Cantúa GV. 2018. Effect of the roots extract from *Heliopsis longipes* on *Aspergillus parasiticus* growth. *Biotechnia* 3:127-134.
- Ventura JA, Costa H, Tatagiba JD. 2004. Papaya diseases and integrated control. En S. Naqvi. Diseases of fruits and vegetables. Volume II. United States of America. Kluwer Academic Publishers. 67:201-213.

- Verma R, Balaji BS, Dixit A. 2018. Phytochemical analysis and broad spectrum antimicrobial activity of ethanolic extract of *Jasminum mesnyi* Hance leaves and its solvent partitioned fractions. *Bioinformation* 14:430-438.
- Villaseñor JL. 2016. Taxonomy and systematics checklist of the native vascular plants of Mexico. *Rev Mex Biodivers* 1:1-344.
- Wharton PS, Diéguez-Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales Jard Bot* 61:3-22.
- Wu Z, Yin X, Lin Z, Bañuelos GS, Lin-Xi Y, Liu Y. 2014. Inhibitory effect of selenium against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *Curr Microbiol* 69:192-201.
- Yang S, Liu L, Li D, Xia H, Su X, Peng L. 2016. Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action. *Food Chem* 196:610-618.
- Yao J, Fang S, Liu R, Opong MB, Liu ER, Fan G. 2016. A Review on the terpenes from genus *Vitex*. *Molecules* 21:1-20.
- Zavala-León MJ, Alejo JC. 2012. Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). *Fitosanidad* 6:83-86.

XI. APÉNDICES

A. Abreviaturas

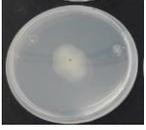
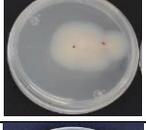
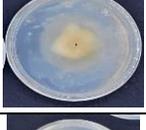
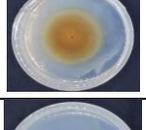
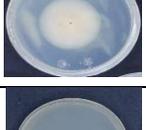
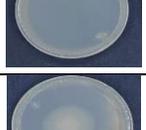
° Brix	Grados Brix (porcentaje de sólidos solubles)
%	Porcentaje
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Ácidez titulable
BALB/c	Cepa de ratón albino
CG-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Col	Colaboradores
CPT-1	Campotecina
CPT-11	9-metoxicampotecina
e.g.	Por ejemplo
ESI	Ionización por electroespreado
FAE	Fracción acetato de etilo
FAE ₃₀	Fracción acetato de etilo a 30 mg/MI
FAE ₆₀	Fracción acetato de etilo a 60 mg/MI
FAE-EK	Fracción acetato de etilo de <i>Echeveria kimnachii</i>
FAE-PS	Fracción acetato de etilo de <i>Psidium sartorianum</i>
FAE-VM	Fracción acetato de etilo de <i>Vitex mollis</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Statistical Database
FCQB	Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
FDA	Food and Drug Administration

FH	Fracción hexánica
FH ₂₀	Fracción hexánica a 20 mg/mL
FH ₄₀	Fracción hexánica a 40 mg/mL
FH-EK	Fracción hexánica de <i>Echeveria kimnachii</i>
FH-VM	Fracción hexánica de <i>Vitex mollis</i>
FMA	Fracción más activa
GC	Cromatografía de gases
gff	Gramo de fruto fresco
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
LD ₅₀	Dosis letal media
LSD	Diferencia mínima significativa
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MS	Espectrometría de masas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NOM	Norma oficial mexicana
OECD	Organización para la cooperación económica y desarrollo
p/v	Relación peso volumen
PDA	Agar dextrosa papa
PDB	Caldo dextrosa papa
ppm	Partes por millón
PTFE	Politetrafluoroetileno
R _f	Factor de retardo
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SST	Sólidos solubles totales

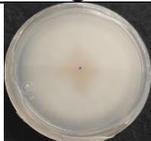
TBZ	Tiabendazol
TLC	Cromatografía en capa fina
UAS	Universidad Autónoma de Sinaloa
USA	Estados Unidos de América
v/v	Relación volumen volumen

B. Anexos

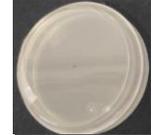
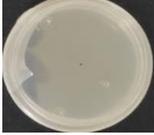
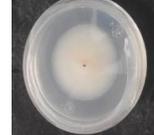
Anexo 1. Fotografías de cajas Petri tratadas con extractos de plantas (400 mg/mL) nativas del estado de Sinaloa con actividad antifúngica (> 5 %) contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Las cajas Petri fueron incubadas durante 6 d a 27 °C.

Modelo vegetal	Parte anatómica	Fotografía
Control	-	
Tiabendazol	-	
Arrayán	Pulpa	
	Semilla	
<i>Echeveria kimnachii</i>	Hoja	
Guamuchil	Cáscara	
	Semilla	
Uvalama	Pulpa	
	Semilla	

Anexo 2. Fotografías de cajas Petri tratadas con fracciones (400 mg/mL) de extractos de plantas típicas del estado de Sinaloa con actividad antifúngica (>5%) contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Las cajas Petri fueron incubadas durante 6 d a 27 °C.

Modelo vegetal	Fracción	Fotografía
Control	-	
Arrayán	Acetato de etilo	
<i>Echeveria kimnachii</i>	Acetato de etilo	
Uvalama	Hexánica	
	Acetato de etilo	

Anexo 3. Fotografías de cajas Petri tratadas con extractos de plantas nativas del estado de Sinaloa y sus fracciones (400-10 mg/mL), registrando actividad antifúngica (> 5 %) contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Las cajas Petri fueron incubadas durante 6 d a 27 °C.

Modelos vegetales	Concentración (mg/mL)							
	400	200	100	50	40	30	20	10
	Pulpa uvalama							
Extracto metanólico		-	-	-	-	-	-	-
Fracción hexánica								
Fracción acetato de etilo								
	Hoja <i>Echeveria kimnachii</i>							
Extracto metanólico		-	-	-	-	-	-	-
Fracción acetato de etilo				-	-	-	-	-