



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**EVALUACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A BASE DE EXTRACTO DE  
MESOCARPIO DE COCO (*Cocos nucifera*) Y QUITOSANO PARA PREVENIR  
EL DETERIORO FÚNGICO Y CONSERVAR LA CALIDAD EN GUANÁBANA  
(*Annona muricata L.*) EN POSTCOSECHA.**

POR:

IBQ. HÉCTOR JAVIER CORTÉS RIVERA

TESIS PROPUESTA A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PORFIRIO GUTIÉRREZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR:

DR. JOSÉ ÁNGEL HUERTA OCAMPO



“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

Tepic, Nayarit, **05/Mayo/2021**

**CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**  
No. Oficio CMCA: 11-2021

**M.C. Luz del Carmen Romero Islas**  
**JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **I.B.Q. Héctor Javier Cortés Rivera** con número de control **M14400243**, cuyo título es **“Evaluación de un biofungicida a base de mesocarpio de Coco (*Cocos nucifera*) y quitosano para prevenir el deterioro fúngico y conservar la calidad en Guanábana (*Annona muricata* L.) en postcosecha”**, a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.

Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez  
(Presidente)

Dr. José Ángel Huerta Ocampo  
(Secretario)

Dr. Rita María Velázquez Estrada  
(Vocal)

Dr. Francisco Javier Blancas Benitez  
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica®*

**Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos**  
**Presidente del Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos**

c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, 04/may/2021

No. Oficio: 25-282-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "EVALUACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A BASE DE EXTRACTO DE MESOCARPIO DE COCO (*Coccus nucifera*) Y QUITOSANO PARA PREVENIR EL DETERIORO FÚNGICO Y CONSERVAR LA CALIDAD EN GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN POSTCOSECHA" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos de la **C. ING. HÉCTOR JAVIER CORTÉS RIVERA** con numero de control **M14400243** cuenta con un nivel de **originalidad Excelente** según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican artículos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin mas por el momento envío saludos cordiales

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®*



**MANUEL ANGEL URIBE VAZQUEZ**  
**DIRECTOR**



Ccp. Archivo DEPI





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **07/mayo/2021**

No. Oficio:25-303-2021

Asunto: Autorización de impresión

**HÉCTOR JAVIER COTÉS RIVERA**  
**PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado **“Evaluación de un biofungicida a base de mesocarpio de Coco (*Cocos nucifera*) y quitosano para prevenir el deterioro fúngico y conservar la calidad en Guanábana (*Annona muricata* L.) en postcosecha.”** La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica*  
Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu.

**LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS**  
**JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE TEPIC  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo DEPI.



**Tecnológico Nacional de México**  
**Instituto Tecnológico de Tepic**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

**Carta de sesión de derechos**

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el día 15 de Septiembre del 2021, el que suscribe Hector Javier Cortés Rivera alumno del Programa de Posgrado en Ciencias en Alimentos con número de control M14400243, manifiesto que todos los resultados derivados de mis estudios de posgrado, realizados bajo la dirección de la Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez, pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos e investigación. Así mismo manifiesto, que es de mi conocimiento que si estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

Atentamente



---

I.B.Q. Hector Javier Cortés Rivera

## RESUMEN

Cortés-Rivera Héctor Javier. IBQ. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Tepic. Septiembre 2021. Evaluación de un biofungicida a base de extracto de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera*) y quitosano para prevenir el deterioro fúngico y conservar la calidad en guanábana (*Annona muricata*) en postcosecha. Director: Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez. Co-Director: Dr. José Ángel Huerta Ocampo.

La guanábana (*Annona muricata* L.) es uno de los cultivos con mayor importancia del estado de Nayarit en México, sin embargo, su alta susceptibilidad al deterioro postcosecha ha sido relacionada con el uso de fungicidas químicos para la prevención y prolongación de su vida útil durante su comercialización, siendo el hongo *Rhizopus stolonifer* uno de los principales agentes causales del deterioro fúngico del fruto. Una alternativa económica y sostenible que ha tomado fuerza en los últimos años para el tratamiento de estas enfermedades ha sido el uso de extractos vegetales y quitosano. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del quitosano comercial (QC) en conjunto con los extractos acuosos del mesocarpio de coco (*Cocos nucifera* L.) (EAC) para el control de la infección por *R. stolonifer* en frutos de guanábana. Se utilizó una cepa de *R. stolonifer* identificada por amplificación de las regiones ARNr 18 y 28s. Los tratamientos *in vitro* consistieron en medio de guanábana adicionado con extracto al 1.0, 5.0 y 10% v/v y con quitosano al 0.5, 1.0 y 1.5% p/v. Se realizaron pruebas de inhibición del crecimiento micelial, cinética de crecimiento radial, esporulación y porcentaje de germinación de esporas sometido a los diferentes tratamientos. Durante la postcosecha del fruto se evaluó el efecto curativo y preventivo de los tratamientos sobre la infección causada por *R. stolonifer*; analizando el efecto sobre los cambios fisicoquímicos y de calidad en frutos almacenados a 15 y 25 °C. Resultados de la etapa *in vitro* demostraron que el extracto presentó un efecto significativo sobre la reducción del crecimiento micelial (> 45%); Por otro lado, el QC (1.5%) mostró 87% de inhibición, sin embargo, la combinación de EAC (10%) con QC (1.5%) fue más efectiva para reducir el crecimiento del micelio (> 93%). Todos los tratamientos fueron efectivos para inhibir la producción de esporas (> 94%) en comparación con el control. El QC en combinación con el extracto acuoso, fue más efectivo (> 98%) que los tratamientos individuales (<48%) en inhibir la germinación de esporas. El modelo modificado de Gompertz mostró un ajuste adecuado para ambas temperaturas de almacenamiento del fruto (>98-99%) observándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las variables de velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y periodo de latencia ( $\lambda$ ) dependiendo el tipo de tratamiento aplicado, todos los tratamientos demostraron un efecto fungistático. La aplicación *in vivo* de los tratamientos mostró un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) sobre la reducción de la severidad e incidencia de la enfermedad para ambas temperaturas de almacenamiento, mejores resultados fueron observados al aplicar las combinaciones más altas de ambos tratamientos (QC 1.5% + EAC 10%) y almacenando a 15 °C (Severidad=35.03 ± 5.09%, Incidencia=32.5 ± 6.36%). Los parámetros de calidad no fueron afectados negativamente mediante la aplicación de los tratamientos, sin embargo, la aplicación de quitosano de manera individual y en combinación con el extracto a 15 °C produjo una menor pérdida en peso y firmeza, así como un mayor alargamiento en la vida útil del fruto conservando los parámetros fisicoquímicos de calidad. La aplicación de QC en conjunto con los EAC puede representar una alternativa sustentable para el tratamiento de la pudrición blanda en guanábana sin modificar su calidad postcosecha.

Palabras clave: Guanábana, Quitosano, Extracto vegetal, Deterioro Fúngico, Ecológico.

## ABSTRACT

Cortés-Rivera Héctor Javier. IBQ. Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Tepic. September 2021. Evaluación de un biofungicida a base de extracto de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera*) y quitosano para prevenir el deterioro fúngico y conservar la calidad en guanábana (*Annona muricata* L.) en postcosecha. Director: Dr. Porfirio Gutiérrez Martínez. Co-Director: Dr. José Ángel Huerta Ocampo.

Soursop (*Annona muricata* L.) is one of the most important crops within the state of Nayarit, however, its high postharvest susceptibility has been related to the use of chemical fungicides to prevent the lengthening of its useful life during its commercialization. Being the *Rhizopus stolonifer* fungus one of the main causal agents of the fungal deterioration of the fruit. An economical and sustainable alternative that has gained strength in recent years for the treatment of these diseases has been the use of plant extracts and chitosan. The aim of this research was to evaluate the effect of commercial chitosan (QC) in conjunction with aqueous extracts of coconut mesocarp (*Cocos nucifera* L.) (EAC) for the control of infection by *R. stolonifer* in soursop fruits. A strain of *R. stolonifer* identified by amplification of the 18 and 28s rRNA regions was used. In vitro treatments consisted of soursop medium added with extract at 1, 5 and 10% v / v and with chitosan at 0.5, 1.0 and 1.5% p / v. Inhibition tests of mycelial growth, radial growth kinetics, sporulation and percentage of spore germination were performed under the different treatments. During the postharvest of the fruit, the curative and preventive effect of the treatments on the infection caused by *R. stolonifer* was evaluated analyzing the effect on physicochemical and quality changes in fruits stored at 15 and 25 °C. Results of the in vitro stage showed that the extract showed a significant effect on the reduction of mycelial growth (> 45%); On the other hand, QC (1.5%) showed 87% inhibition, however, the combination of EAC (10%) with QC (1.5%) was more effective in reducing mycelium growth (> 93%). All treatments were effective in inhibiting spore production (> 94%) compared to the control. QC in combination with the EAC, was more effective (> 98%) than the individual treatments (<48%) in inhibiting the germination of spores. The modified Gompertz model showed an adequate fit for both storage temperatures (> 98-99%), observing significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the variables of maximum velocity ( $V_{max}$ ) and latency period ( $\lambda$ ) depending on the type of treatment. applied, all treatments demonstrated a fungistatic effect. The in vivo application of the treatments showed a significant effect ( $p \leq 0.05$ ) on the reduction of the severity and incidence of the disease for both storage temperatures, the best results were observed when applying the highest combinations of both treatments (QC 1.5 % + EAC 10%) and storing at 15 °C (Severity =  $35.03 \pm 5.09\%$ , Incidence =  $32.5 \pm 6.36\%$ ). The quality parameters were not affected by the application of the treatments, however, the application of chitosan individually and in combination with the extract at 15 °C produced a lower loss in weight and firmness, as well as a longer fruit shelf life preserving the physicochemical quality parameters. The application of QC together with the EAC can represent a sustainable alternative for the treatment of soft rot in soursop without modifying its post-harvest quality.

Keywords: Alternative treatments, Chitosan, Plant extract, Soursop, Fungal Disease, Eco-friendly.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....  | 7  |
| CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....  | 9  |
| 2.1. Generalidades de la Guanábana ( <i>A. muricata</i> ).....                           | 9  |
| 2.2. Importancia económica de la Guanábana.....  | 10 |
| 2.2.1. Producción nacional de Guanábana.....   | 10 |
| 2.2.2. Producción estatal.....   | 10 |
| 2.3. Enfermedades postcosecha en guanábana.....  | 10 |
| 2.4. <i>Rhizopus stolonifer</i> .....  | 12 |
| 2.5. Estrategias convencionales para el control de enfermedades fúngicas.....            | 13 |
| 2.5.1 Estrategias alternativas.....  | 14 |
| 2.5.2. Quitosano.....  | 14 |
| 2.5.3. Extractos vegetales.....  | 15 |
| 2.5.4. Extracto de mesocarpio de coco ( <i>C. nucifera</i> ).....                        | 17 |
| 2.5.5. Recubrimientos enriquecidos.....  | 18 |
| CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN.....   | 20 |
| CAPÍTULO 4. OBJETIVOS.....   | 21 |
| 4.1. Objetivo General.....   | 21 |
| 4.2. Objetivos específicos.....  | 21 |
| CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 22 |
| 5.1. Plan general.....   | 22 |
| 5.2. Primera Etapa Evaluaciones “ <i>In vitro</i> ”.....                                 | 23 |
| 5.2.1. Preparación del extracto acuoso de mesocarpio de coco ( <i>C. nucifera</i> )..... | 23 |
| 5.2.1. Preparación del quitosano.....  | 23 |
| 5.2.2. Reactivación de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....                                  | 24 |
| 5.2.3. Preparación de los tratamientos para su evaluación <i>in vitro</i> .....          | 24 |
| 5.2.4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%ICM).....                     | 24 |
| 5.2.5. Cinética del crecimiento radial.....  | 25 |
| 5.2.6. Esporulación.....   | 26 |
| 5.2.7. Porcentaje de Germinación.....  | 27 |
| 5.2.8. Simulación de las interacciones entre tratamientos.....                           | 27 |
| 5.3. Segunda Etapa Evaluaciones “ <i>In vivo</i> ”.....                                  | 28 |
| 5.3.1. Inoculación del patógeno en frutos de guanábana ( <i>A. muricata</i> ).....       | 28 |
| 5.3.2. Aplicación de los tratamientos <i>In vivo</i> .....                               | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 5.3.2.1. Incidencia de la enfermedad.....                             | 29 |
| 5.3.2.2. Severidad de la enfermedad.....                              | 29 |
| 5.3.3. Color.....   | 29 |
| 5.3.4. Firmeza.....   | 29 |
| 5.3.6. Pérdida de peso fisiológico.....                               | 30 |
| 5.3.7. Sólidos solubles totales (SST).....                            | 30 |
| 5.3.8. Acidez titulable.....  | 30 |
| 5.3.9. Vida útil máxima.....  | 30 |
| 5.4. Análisis estadístico.....  | 31 |
| CAPÍTULO 6. RESULTADOS.....   | 32 |
| 6.1.1. Identificación morfológica de <i>Rhizopus stolonifer</i> ..... | 32 |
| 6.1.2. Inhibición del crecimiento micelial.....                       | 33 |
| 6.1.3. Esporulación.....  | 36 |
| 6.1.4. Germinación de esporas.....                                    | 37 |
| 6.1.5. Cinética de crecimiento en medio sólido homogéneo.....         | 39 |
| 6.1.6. Interacción entre tratamientos.....                            | 43 |
| 6.2.2. Parámetros de calidad.....                                     | 51 |
| CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....   | 57 |
| CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....   | 58 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Apariencia externa e interna del fruto de guanábana ( <i>Annona muricata</i> L.).. .....   | 9  |
| Figura 2. Frutos de guanábana con síntomas de pudrición. A) Pudrición seca por infección con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Antracnosis), B) Pudrición asociada a invasión por insectos plaga ( <i>Bephratelloides cubensis</i> ), C) Pudrición blanda asociada a infección por <i>Rhizopus stolonifer</i> .....   | 12 |
| Figura 3. Micrografías de <i>R. stolonifer</i> aisladas de guanábana. A) Micrografías del micelio a 9500 + aumentos. B) Micrografías de esporas de <i>R. stolonifer</i> a 910000 aumentos. ....  | 13 |
| Figura 4. Micrografías de <i>Rhizopus stolonifer</i> A) Micelio 20x, B) Esporangio 40x, C) Esporas 100x, D) Hifa 100x.....   | 32 |
| Figura 5. Desarrollo micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> en los diferentes tratamientos durante 36 h a 28 °C. ....  | 35 |
| Figura 6. Microfotografía de una hifa de <i>Rhizopus stolonifer</i> a 100X. A) Control, B) Combinación quitosano-extracto acuoso. ....   | 36 |
| Figura 7. Germinación de esporas de <i>R. stolonifer</i> sometidas a los diferentes tratamientos durante 4 h, 40 X.....  | 39 |
| Figura 8. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la cinética de crecimiento de <i>R. stolonifer</i> a 25 °C. N= Diámetro promedio de la colonia en el tiempo t, N <sub>0</sub> = Diámetro de la colonia en el tiempo 0. Q= Quitosano, M= Extracto acuoso. ....  | 42 |
| Figura 9. Estructura química, conformación tridimensional y distribución de cargas por cálculo de Huckel de las principales moléculas orgánicas presentes en los tratamientos. ....  | 44 |
| Figura 10. Interacciones moleculares entre componentes presentes en los tratamientos: A) Interacción ácido clorogénico-quitosano. B) Interacción galocatequina-quitosano. C) Interacción entre grupos funcionales ácido clorogénico-quitosano. D) Interacción entre grupos funcionales galocatequina-quitosano.....  | 45 |
| Figura 11. Severidad e incidencia exterior de la infección por <i>R. stolonifer</i> sobre frutos inoculados de guanábana a 25 °C tras 5 días de almacenamiento.....  | 47 |
| Figura 12. Severidad interior en frutos de guanábana inoculados con <i>R. stolonifer</i> a 25 °C tras 5 días de almacenamiento. ....   | 48 |
| Figura 13. Severidad e incidencia exterior de la infección por <i>R. stolonifer</i> sobre frutos inoculados de guanabana a 15 °C tras 8 días de alma cenamiento.....   | 49 |
| Figura 14. Severidad interior en frutos de guanabana inoculados con <i>R. stolonifer</i> a 25 °C tras 5 días de almacenamiento. ....   | 50 |
| Figura 15. Parámetros de calidad de frutos de guanábana tratados con los diferentes tratamientos almacenados a 25 °C (6 Días de almacenamiento) y 15 °C (8 Días de almacenamiento). E=Extracto acuoso, Q= Quitosano. Letras mayúsculas comparativa entre temperaturas, letras minúsculas comparativa entre tatamientos. Medias seis réplicas ± desviación estándar. .... | 52 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Recopilación de investigaciones previas sobre el efecto de diferentes extractos vegetales como antifúngicos naturales.....   | 16 |
| Tabla 2. Porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de los diferentes tratamientos durante 36 h a 28 °C.....   | 34 |
| Tabla 3. Esporulación de <i>R. stolonifer</i> sometido a los diferentes tratamientos durante 72 h a 28 °C.....  | 37 |
| Tabla 4. Porcentaje de reducción de la esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i> sobre los diferentes tratamientos durante 36 h a 28 °C.....                               | 38 |
| Tabla 5. Parámetros modificados del modelo de Gompertz para las curvas de crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> sometidas a diferentes tratamientos y temperaturas..... | 39 |
| Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del quitosano, ácido clorogénico y galocatequina. ..  | 44 |
| Tabla 7. Porcentaje de severidad e incidencia de infección por <i>R. stolonifer</i> sobre frutos de guanábana inoculados artificialmente a 15 °C y 25 °C.....               | 46 |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

|   |    |
|---|----|
| Esquema 1. Plan general etapa 1 (Pruebas <i>in vitro</i> )..... | 22 |
| Esquema 2. Plan general etapa 2 (Pruebas <i>in vivo</i> ).....  | 23 |

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

La guanábana (*Annona muricata*) es uno de los cultivos de mayor importancia en algunas regiones tropicales del planeta, caracterizándose por ser un fruto dulce, con un peso promedio de 2 a 3 kg, del cual el 75% de su composición es pulpa comestible con elevada concentración de azúcares (17.2 grados Brix) y un alto contenido de compuestos bioactivos relacionados con funciones promotoras de la salud (Zorofchian *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2013). Debido a estas propiedades el consumo y la demanda de guanábana han incrementado en los últimos años, generando grandes expectativas dentro del sector agrícola Nacional, donde el valor neto de la producción de guanábana en los últimos años se ha estimado en 299 millones de pesos mexicanos, siendo México el principal productor del mundo con 3,600 ha cultivadas, del cual Nayarit aporta el 75.97% de la producción nacional con 2,529.29 ha (SIAP, 2018). Sin embargo, en los últimos años una de las principales problemáticas que ha afectado la actividad comercial del cultivo y consumo de guanábana en el estado de Nayarit, han sido los deterioros en postcosecha por enfermedades fúngicas, las cuales se evidencian después de la cosecha y durante la maduración del fruto sin poder detectarse hasta que la enfermedad se ha manifestado, produciendo el deterioro parcial o total de las características sensoriales y nutritivas (Ramos-Guerrero *et al.*, 2020). Uno de los principales patógenos fúngicos asociados al deterioro del fruto de guanábana en periodos postcosecha, es el hongo saprófito *Rhizopus stolonifer*, agente causal de la pudrición blanda, enfermedad capaz de generar graves lesiones y pérdidas totales en periodos muy cortos de tiempo (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a; Cambero-Ayón *et al.*, 2019). Actualmente el único tratamiento efectivo para el control de este fitopatógeno ha sido el uso de fungicidas sintéticos, los cuales se han relacionado con el desarrollo de tolerancia por parte de estos hongos, así como diversas afecciones a la salud humana y el medio ambiente (Sekhatha *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019); debido a esta problemática se propone el desarrollo de alternativas sustentables para el control de las pudriciones en postcosecha causadas por el patógeno *R. stolonifer* y la conservación de la calidad en frutos de guanábana en el estado de Nayarit; valorando el empleo de quitosano comercial de alto peso

molecular, debido al control que ejerce sobre algunas de las principales enfermedades fúngicas en frutos tropicales postcosecha, así como su capacidad de inducción de mecanismos de defensa en tejidos vegetales y a la capacidad para generar recubrimientos adicionados con otros compuestos antifúngicos, como es el caso de algunos extractos vegetales con alto contenido de compuestos bioactivos (Velázquez-del Valle *et al.*, 2008; Rodríguez-Perez *et al.*, 2016; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a), siendo los extractos acuosos de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera*) una alternativa viable en el aprovechamiento tecnológico de uno de los principales residuos orgánicos en las zonas costeras del estado de Nayarit, el cual ha demostrado un perfil fitoquímico con potencial antifúngico (Cortés-Rivera, 2019). Debido a lo anterior se planteó evaluar el potencial antifúngico del quitosano de alto peso molecular y de los extractos acuosos de mesocarpio de coco en *R. stolonifer* mediante pruebas *in vitro*, determinando las concentraciones más efectivas y el posible mecanismo de acción de ambos tratamientos mediante parámetros cinéticos y microscopía óptica; Formulando con las concentraciones más efectivas un recubrimiento bioactivo capaz de prevenir el deterioro producido por este patógeno, así como la conservación de los parámetros de calidad en frutos de guanábana en etapa postcosecha durante su almacenamiento, mediante pruebas *in vivo*.

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Generalidades de la Guanábana (*A. muricata*).

*A. muricata* es un fruto dulce miembro de la familia *Annonaceae*, conocido popularmente como soursop o guanábana y cultivado principalmente en regiones tropicales del planeta. Los frutos tienen un peso promedio de entre los 2 y 3 kg, donde el 75% de su composición es fracción comestible con alto contenido de azúcares (17.2 grados Brix) la cual se emplea ampliamente en la preparación de jarabes, dulces, bebidas y concentrados (Zorofchian *et al.*, 2015). El fruto suele ser de forma ovalada o cónica, con color verde oscuro cuando no está maduro y con un color verde más claro cuando está completamente maduro (Fig.1), siendo la pulpa de un color blanco y textura jugosa, conteniendo de 150 a 170 semillas dependiendo el peso (Virgen-Ceceña *et al.*, 2013; Shuaibu & Mohd, 2018).



Figura 1. Apariencia externa e interna del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.).

Estudios previos han demostrado la presencia de un alto contenido de acetogeninas en *A. muricata*, a las cuales se les atribuye actividades anticancerígenas, antipalúdicas, antiartríticas, antiparasitarias, anticonvulsivas, hepatoprotectoras y antidiabéticas. Se estima que más de 100 tipos de acetogeninas anonáceas se han aislado de diferentes tejidos del árbol y del fruto de *A. muricata* (León-Fernández *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2013). Estas propiedades funcionales y terapéuticas

atribuidas al perfil fitoquímico de *A. muricata* la convierten en un fruto con importancia económica y social en regiones donde se cultiva y consume.

## **2.2. Importancia económica de la Guanábana.**

Actualmente el cultivo y demanda de guanábana (*A. muricata*) se incrementó tanto en el mercado nacional como internacional, debido a las características sensoriales, nutricionales, nutracéuticas y a su asociación con un alto contenido de acetogeninas con potencial anticancerígeno, esto ha permitido un auge en el consumo en fresco de la fruta, así como en el procesamiento de alimentos a base de este fruto (Mishra *et al.*, 2013). A nivel internacional, México ocupa el primer puesto en producción de guanábana con una superficie cultivada de 4,010.5 ha aproximadamente, superior a países de América Latina como Venezuela (2,174 ha), Brasil (2,000 ha) y Costa Rica (500 ha), esto en conjunto con la ubicación geográfica del país, le permiten ser el principal exportador de guanábana a los Estados Unidos de América (Reyes-Monter, 2018). Tan solo en 2017, se estimó que la producción de guanábana en México tuvo un valor neto superior a 299 millones de pesos mexicanos (SIAP, 2018).

### **2.2.1. Producción nacional de Guanábana.**

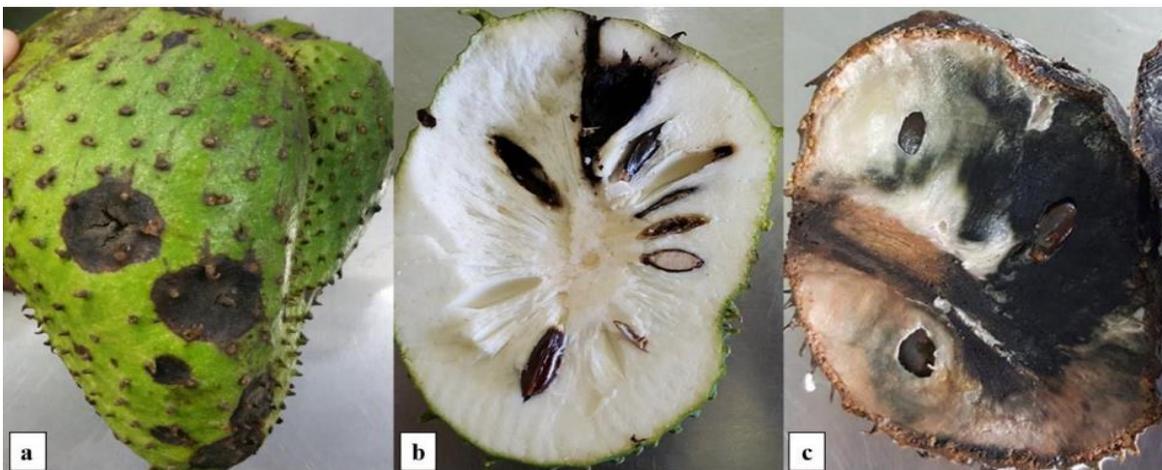
Según datos del SIAP en 2017 en México se cultivaron 3,693.19 ha de guanábana produciendo 29,228.46 toneladas de fruto distribuidas en 10 entidades federativas, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Jalisco, Morelos, Puebla, Tabasco, Veracruz, Campeche y Colima, siendo Nayarit el principal productor con el 74.79% (21,860.02 toneladas) (SIAP, 2018).

### **2.2.2. Producción estatal.**

En 2018, se cultivaron 2,529.29 ha de guanábana en el estado de Nayarit donde los principales municipios productores fueron: Compostela con 21,157.50 toneladas (97%), San Blas con 443.03 toneladas (2.03%) y Tepic con 97.32 toneladas (0.45%), con un valor neto aproximado superior a los 199 millones de pesos mexicanos (SIAP, 2018).

## **2.3. Enfermedades postcosecha en guanábana.**

La producción y comercialización de guanábana puede ser afectada por diferentes organismos patógenos, los cuales pueden producir lesiones graves en etapas tempranas de la madurez del fruto o desencadenar enfermedades en los periodos posteriores a la cosecha bajo una temperatura y humedad específica (Velázquez-del Valle *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayor tasa de pérdidas del fruto de guanábana se da en periodos postcosecha, principalmente por el ataque de patógenos fúngicos capaces de producir infecciones en etapas tempranas de la maduración del fruto y no pueden ser detectados tan fácilmente hasta que la enfermedad se ha manifestado en la superficie generando graves lesiones; esto se da principalmente porque las condiciones climáticas y fisiológicas de maduración del fruto son favorables para el desarrollo de estas enfermedades produciendo pérdidas de hasta el 100% de los frutos infectados (Andrades *et al.*, 2009). Un estudio previo por Cambero-Ayón *et al.*, (2019) clasificó a los principales fitopatógenos del fruto de guanábana en el estado de Nayarit, donde la pudrición de los frutos produce el mayor volumen de pérdidas y deterioros en la calidad del mismo, siendo los hongos *Pestalotiopsis sp.* y *Colletotrichum gloeosporioides* identificados como los principales agentes causales de la pudrición seca en frutos, mientras que *Lasiodiplodia pseudotheobromae* es conocido como agente causal de la pudrición blanda del fruto y en algunos casos se le asocia con la pudrición seca. Mientras que los hongos *Fusarium sp.* y *Cladosporium sp.* son patógenos secundarios asociados con la capacidad de producir pudrición seca de frutos, mientras que *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* son hongos saprófitos agentes causales de la pudrición blanda del fruto de guanábana (Fig. 2).



Fuente: Cambero-Ayón *et al.*, (2019).

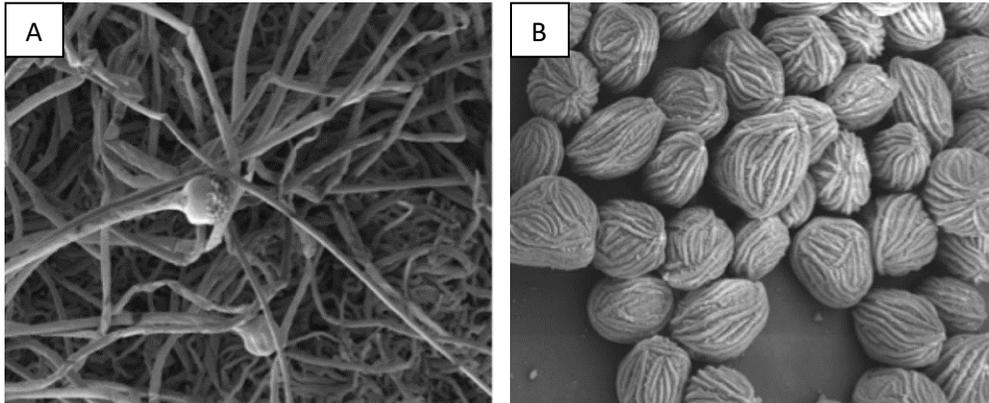
Figura 2. Frutos de guanábana con síntomas de pudrición. A) Pudrición seca por infección con *Colletotrichum gloeosporioides* (Antracnosis), B) Pudrición asociada a invasión por insectos plaga (*Bephratelloides cubensis*), C) Pudrición blanda asociada a infección por *Rhizopus stolonifer*.

Uno de los principales fitopatógenos del fruto de guanábana (*A. muricata*) es el hongo saprófito *R. stolonifer* agente causal de la pudrición blanda, capaz de generar graves lesiones y pérdidas de hasta el 100% en lapsos muy cortos de tiempo durante el periodo postcosecha de los frutos (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018b).

#### **2.4. *Rhizopus stolonifer*.**

*R. stolonifer* es un zigomiceto de crecimiento filamentososo considerado uno de los principales hongos fitopatógenos en frutos tropicales, se caracteriza por su capacidad para crecer y desarrollarse en un amplio rango de temperaturas y humedades relativas, siendo su rápida velocidad de desarrollo lo que le permite infectar en periodos cortos la superficie de algunos frutos tropicales, generando la patología conocida como pudrición blanda (Velázquez-del Valle *et al.*, 2008; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a). Este fitopatógeno es capaz de sobrevivir en el suelo, en los desechos del huerto y en los alrededores de las empacadoras y almacenes de fruta, debido a que las esporas liberadas pueden llegar a sobrevivir por largos periodos a temperaturas relativamente elevadas y en ambientes secos. Sin embargo, estas esporas no suelen causar una infección directa en los tejidos sanos del fruto, sino que la infección previa a la cosecha ocurre comúnmente en frutos lesionados por insectos, afectados por trastornos fisiológicos o por daño mecánico durante su recolección, siendo una infección oportunista (Bautista-Baños *et al.*, 2008). Una vez que una espora entra en contacto con un tejido herido, comienza un proceso interno de señalización desencadenando un conjunto de procesos bioquímicos que hacen que la espora germine, comenzando a desarrollarse el tubo germinativo y posteriormente el micelio de rápido crecimiento sobre la superficie del fruto (Fig.3-A), mediante la producción de enzimas capaces de degradar la pared celular de las células vegetales (Pectinasas y amilasas) desnaturalizando los tejidos y provocando la infección y muerte del fruto (Bautista-Baños *et al.*, 2008). Este hongo se caracteriza por la capacidad de penetrar en el sustrato para obtener los nutrientes para su desarrollo y por la producción de esporangióforos erectos delgados y anclados al sustrato por rizoides. Una vez finalizado el desarrollo del micelio, los esporangióforos dan lugar a esporangios de columela aérea hemisférica, pared

celular delgada que contiene numerosas esporangiosporas negras cuando están maduras (Fig.3) (Omoifo Charles, 2011; Bautista-Baños *et al.*, 2008).



Fuente: Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a.

Figura 3. Micrografías de *R. stolonifer* aisladas de guanábana. A) Micrografías del micelio a 9500 aumentos. B) Micrografías de esporas de *R. stolonifer* a 91000 aumentos.

Actualmente el único tratamiento efectivo en el control de este fitopatógeno ha sido el empleo de fungicidas químicos. Sin embargo, investigaciones previas han puntualizado las diversas afecciones a la salud y al medio ambiente que el uso continuo de estos productos conlleva (Sekhotha *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019).

## 2.5. Estrategias convencionales para el control de enfermedades fúngicas.

Diversos estudios han señalado el elevado volumen de pérdidas en la producción agrícola relacionadas al ataque por enfermedades fúngicas en periodos posteriores a la cosecha, las cuales tienen la capacidad de mermar las ganancias económicas y aumentar la carga financiera para productores y consumidores, deteriorando la cadena productiva de los principales insumos agrícolas; debido a esto muchos agricultores optan por el uso de fungicidas sintéticos, los cuales han demostrado tener un efecto control sobre los principales fitopatógenos fúngicos y representar una alternativa económicamente viable para el cultivo y manejo de frutos en postcosecha. Sin embargo, investigaciones previas han puntualizado las diversas afecciones a la salud y al medio ambiente que el uso continuo de estos productos conlleva (Sekhotha *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019); desde la década de 60's se ha experimentado un aumento generalizado en el uso de fungicidas sintéticos debido a la creciente demanda agrícola y alimentaria que supone el crecimiento poblacional

en países en desarrollo, esto se ha relacionado con un aumento sustancial en el número de envenenamientos no intencionales y en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas en personas expuestas a diferentes dosis de productos fungicidas, estimándose un aproximado de 355,000 muertes anuales a causa de afecciones a la salud por la exposición o el manejo de agroquímicos sintéticos de manera continua o aislada (Konradsen *et al.*, 2003; Anjala, 2017; Zelonkova *et al.*, 2019). Así mismo diversos estudios han demostrado el desarrollo de tolerancia al uso continuo de agroquímicos y fungicidas por parte de algunos de los principales patógenos fúngicos, esto ha motivado la búsqueda de alternativas naturales para el control de las pudriciones postcosecha, valorándose opciones como el empleo de productos y compuestos de origen orgánico con potencial antifúngico (González-Estrada *et al.*, 2019).

### **2.5.1 Estrategias alternativas.**

Las tendencias agrícolas actuales han involucrado el estudio y empleo de algunos compuestos de origen orgánico como alternativa sustentable al tratamiento de enfermedades fúngicas por métodos convencionales como el uso de agroquímicos y fungicidas sintéticos, donde en los últimos años se ha implementado el uso de tratamientos a base de antagonistas microbianos, quitosano y extractos vegetales, los cuales han demostrado tener un elevado efecto antifúngico (Velázquez-del Valle *et al.*, 2008). Diferentes estudios han relacionado la actividad antifúngica de algunos extractos vegetales con un elevado contenido de compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos y derivados de las ligninas, donde se sugiere el mayor efecto antifúngico de estos compuestos es debido a la producción de cambios ultra estructurales en las membranas citoplasmáticas del hongo, produciendo un estado de autofagia y dificultando la actividad enzimática de la célula, retardando o inhibiendo parcialmente algunas rutas metabólicas de adaptación y formación de estructuras miceliales por parte del hongo (Mohamed *et al.*, 2016; Veldhuizen, 2018). Un estudio previo por Omnia *et al.* en 2016 demostró que el empleo de quitosano como tratamiento preventivo de enfermedades fúngicas puede inducir la síntesis de compuestos bioactivos en algunos sistemas vegetales.

### **2.5.2. Quitosano.**

El quitosano es un polímero no tóxico, bioactivo con propiedades fungicidas e inductor de mecanismos de defensa en tejidos vegetales, obtenido a partir de la desacetilación de la quitina que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos y algunos hongos e insectos. Este biopolímero, se ha convertido en una alternativa efectiva para el tratamiento y prevención de algunas de las principales enfermedades fúngicas en periodos postcosecha debido a los diferentes mecanismos de acción como fungicida natural. Se ha comprobado que debido a su naturaleza policatiónica es capaz de detener el crecimiento micelial de algunos hongos en pruebas *in vitro* e *in vivo*, así como causar daños en las membranas plasmáticas y membranas nucleares de esporas, hifas y micelios. Otros posibles mecanismos de acción de su actividad antifúngica se relacionan con el efecto inhibitorio de la síntesis de algunas enzimas hidrolíticas producidas y excretadas por las células del hongo, tal como la celulasa, cutinasas, pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y pectatoliasa, además de la formación de recubrimientos que actúan como barreras estructurales que impiden la penetración del hongo en el hospedero y generar una atmosfera modificada con un alto contenido de CO<sub>2</sub> y un bajo contenido de O<sub>2</sub>. Los efectos antifúngicos del quitosano sobre diferentes fitopatógenos se han relacionado con el nivel de desacetilación de la molécula, el peso molecular del compuesto y la concentración aplicada entre otros factores (Gutierrez-Martinez *et al.*, 2013; Harshitha *et al.*, 2018; Gutierrez-Martinez *et al.*, 2018). Estudios previos han demostrado algunos efectos antifúngicos del quitosano sobre la morfología y desarrollo de *R. stolonifer*, donde las hifas de este hongo en contacto con quitosano presentan un desarrollo longitudinal de menor tamaño además de presentar cambios en su morfología como aumento en el volumen celular, bifurcación y distorsión (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a). Así mismo el quitosano se ha relacionado con la posible inducción de compuestos de defensa en plantas ante el ataque de patógenos, estimulando la producción de compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido P-cumárico y otros, ampliamente relacionados con una elevada capacidad antifúngica (Omnia *et al.*, 2016). Estudios previos han demostrado un alto contenido de estos compuestos fenólicos en la composición de algunos extractos vegetales con capacidad antifúngica (Šernaitė *et al.*, 2018).

### **2.5.3. Extractos vegetales.**

Actualmente el estudio y empleo de los extractos de algunas plantas y subproductos agrícolas, han resultado ser una alternativa viable en el control de algunas de las principales enfermedades postcosecha, esto debido a que en su mayoría están conformados por un conjunto de metabolitos secundarios sintetizados naturalmente por las plantas, en su mayoría de carácter aromático, siendo constituidos por fenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, flavonas, taninos, flavonoles, quinonas, flavonas y cumarinas (Ribeiro-da Silva *et al.*, 2013; Bancas-Benítez *et al.*, 2018; Fiore *et al.*, 2019); este conjunto de componentes orgánicos derivados principalmente del metabolismo secundario de las plantas se caracteriza por su ubicuidad en el reino vegetal y por su fuerte actividad antioxidante, la cual se ha relacionado con la capacidad de inhibir el desarrollo y proliferación de algunos de los principales fitopatógenos fúngicos (Ornelas-Paz *et al.*, 2012; Martirosyan & Miller, 2018). Un estudio realizado por Sernaite en 2018 recopila un conjunto de investigaciones sobre el uso de extractos naturales de diferentes géneros de plantas en el control biológico *in vitro* o *in vivo* de algunos organismos fitopatógenos, agentes causales de enfermedades postcosecha (Tabla 1), donde se sugiere que el conjunto de compuestos fenólicos tiene una alta eficacia contra algunos de los principales fitopatógenos debido a su actividad antioxidante y antimicrobiana.

Tabla 1. Recopilación de investigaciones previas sobre el efecto de diferentes extractos vegetales como antifúngicos naturales.

| Extracto vegetal  | Fitopatógeno   | Reducción de la Enfermedad | Referencia                         |
|---|--|----------------------------|------------------------------------|
| <i>Agapanthus africanus</i> (L.)  | <i>Botrytis cinerea</i><br><i>Sclerotium rolfisii</i><br><i>Rhizoctonia solani</i><br><i>Botryosphaeria dothidea</i><br><i>Mycosphaerella pinoides</i> | 97-100%                    | (Tegegne <i>et al.</i> , 2008)     |
| <i>Thymus kotschyanus</i><br><i>Bupleurum falcatum</i><br><i>Thymus daenensis</i><br><i>Stachys pubescens</i> | <i>Aspergillus flavus</i><br><i>Alternaria alternata</i><br><i>Fusarium oxysporum</i>  | 36-58%                     | (Mohamed <i>et al.</i> , 2016)     |
| <i>Thymus vulgaris</i><br><i>Lippia citriodora</i><br><i>Cinnamomum zeylanicum</i>                            | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i><br><i>Alternaria citrii</i><br><i>Botrytis cinerea</i><br><i>Penicillium digitatum</i>                           | 100%                       | (Combrinck <i>et al.</i> , 2011)   |
| <i>Cistus plant species</i>   | <i>Geotrichum citri-aurantii</i><br><i>Geotrichum candidum</i>   | 80-100%                    | (Karim <i>et al.</i> , 2017)       |
| <i>Allium sativum</i><br><i>Datura stramonium</i><br><i>Eucalyptus globules</i>                               | <i>Fusarium oxysporum</i><br><i>Rhizoctonia solani</i>   | 61-72%                     | (Cherkupally <i>et al.</i> , 2017) |

Esta actividad biológica supone el aprovechamiento integral de muchos subproductos de la industria agroalimentaria, debido a que la extracción de estos compuestos bioactivos con capacidad antifúngica involucra partes no consumibles de frutos y hortalizas dándole un valor agregado a esos tejidos residuales, los cuales han demostrado ser una fuente viable de compuestos bioactivos con una fuerte capacidad antifúngica y antioxidante (Andrade *et al.*, 2010; Pintos *et al.*, 2018). Uno de los principales residuos orgánicos del estado de Nayarit y de algunas regiones costeras del mundo es el mesocarpio de coco (*C. nucifera*), el cual se ha comprobado tiene un alto contenido de compuestos bioactivos con actividad antifúngica (Verma *et al.*, 2012).

#### **2.5.4. Extracto de mesocarpio de coco (*C. nucifera*).**

Una investigación previa sobre la capacidad antimicrobiana de los tejidos fibrosos de coco por Verma *et al.* en 2012 identificó mediante HPLC comparando con estándares auténticos la presencia de algunos agentes bioactivos enlazados a la matriz fibrosa del mesocarpio de coco, siendo el tocoferol, el cicloartenol, el  $\beta$ -sitosterol y el alcohol de palmitoleico los principales compuestos ligados. Posteriormente un estudio fitoquímico realizado por Lima *et al.* en 2015 sobre la composición de los extractos etanólicos y acuosos de la fibra de coco (mesocarpio) detectaron un alto contenido de bioactivos como fenoles, taninos, triterpenos, esteroides, leucoantocianina, flavonoides y alcaloides. Un estudio similar por Cortés-Rivera en 2019 identificó mediante HPLC-DAD-MS un alto contenido de compuestos fenólicos de la familia de los ácidos hidroxicinámicos y de los flavonoides en la fracción soluble del mesocarpio y exocarpio de coco, donde mediante pruebas *in vitro* los extractos acuosos de mesocarpio demostraron tener un alta efectividad antifúngica en concentraciones bajas (1.0, 5.0 y 10% v/v) contra el fitopatógeno del limón persa (*Citrus latifolia*) *Penicillium italicum*, con una inhibición del crecimiento micelial de entre el 75-83%, reduciendo significativamente el proceso de esporulación del hongo e inhibiendo la germinación de las esporas, conteniendo la dispersión del hongo en un radio controlado (Cortés-Rivera *et al.*, 2019). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el uso de extractos

crudos de algunos subproductos agrícolas, puede tener un efecto positivo en la conservación de los principales parámetros de calidad en frutos y hortalizas, aumentando la vida útil de consumo y disminuyendo la velocidad de maduración de frutos tratados (Tabassum *et al.*, 2018), la actividad biológica de algunos componentes bioactivos presentes en residuos agrícolas, puede emplearse para la mejora sustancial de algunos recubrimientos con actividad antifúngica, favoreciendo la conservación y estabilidad del perfil fitoquímico y nutricional de frutos en etapas postcosecha.

#### **2.5.5. Recubrimientos enriquecidos.**

En los últimos años, se ha sugerido el uso de recubrimientos enriquecidos con compuestos de origen orgánico para la conservación de las principales características de calidad en frutos y hortalizas en postcosecha, permitiendo una mejora en la estabilidad del perfil fitoquímico y nutricional de los alimentos durante los periodos de almacenamiento, comercialización y consumo; debido a esto se ha evaluado el uso de algunos biopolímeros en combinación con extractos vegetales sobre la conservación de estos parámetros de calidad (Kore *et al.*, 2017). Los principales compuestos asociados a esta actividad biológica en algunos extractos vegetales son aquellos que presentan una fuerte actividad antioxidante, los cuales pueden producir un efecto protector sobre los principales nutrientes y componentes oxidables de los alimentos, extendiendo de esta forma su vida útil de consumo; este grupo de compuestos incluyen moléculas tales como carotenoides, flavonoides y compuestos fenólicos. Sin embargo, la aplicación de estos compuestos implica ciertas desventajas debido su baja estabilidad en presencia de altas temperaturas, en presencia de luz y debido a su alta volatilidad y limitada solubilidad. Este conjunto de características da como resultado una pérdida en la funcionalidad de estos compuestos al aplicarse como tratamiento preventivo para el deterioro de calidad, en este sentido algunos materiales poliméricos pueden aliviar efectivamente este tipo de deficiencias (Ayala-Zavala *et al.*, 2008; Fang & Bhandari, 2010). Un estudio previo por Nasrin *et al.* en 2018 demostró que la aplicación de recubrimientos a base de quitosano al 1.0%, incorporados con aceite de coco, tuvieron un efecto significativo sobre la conservación del contenido de ácido ascórbico en fruto durante el almacenamiento, mejorando la estabilidad en un 70% durante un periodo de 16

días a temperatura ambiente, en cambio, frutos sin recubrimiento mantuvieron el contenido de ácido ascórbico en un 45.56%, así mismo se reporta una mejora sustancial en la estabilidad de los compuestos bioactivos asociados al sabor y aroma en frutos con recubrimiento, y mayor aceptabilidad de los parámetros de firmeza y color. Wissam Zam en 2019 evaluó la aplicación de recubrimientos de quitosano al 1.0% enriquecidos con extracto de hojas de oliva (*Olea europaea*) sobre frutos de cereza (*Prunus avium L.*) en periodo postcosecha, los cuales demostraron retardar los procesos de maduración y aumentar el contenido de antocianinas en cutícula por un periodo de 20 días bajo condiciones de almacenamiento, mientras que el contenido de ácido ascórbico en pulpa y el contenido de compuestos fenólicos totales en frutos de cereza con recubrimientos enriquecidos mantuvieron una mejor estabilidad durante el periodo de almacenamiento a diferencia de frutos no tratados. Actualmente el uso de recubrimientos enriquecidos con compuestos bioactivos sobre frutos en etapas postcosecha, ha demostrado una mejora sustancial en la conservación de los principales compuestos fitoquímicos y nutricionales asociados a sabor, color y aroma, retardando los procesos de maduración y oxidación durante el almacenamiento de estos productos agrícolas; sin embargo, es necesario comprender a fondo el efecto que tienen este tipo de tratamientos a nivel bioquímico y molecular en frutos y hortalizas.

### CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN.

México es el principal productor de guanábana (*A. muricata*) a nivel mundial y en los últimos años se ha observado un incremento en el consumo y demanda de este producto, debido a sus características nutricionales y asociación con compuestos bioactivos como las acetogeninas capaces de prevenir diferentes padecimientos crónicos mediante su consumo. Esto ha generado una expectativa de crecimiento económico para la región agrícola del estado de Nayarit, donde la principal problemática es la pérdida del fruto por infecciones con fitopatógenos fúngicos y el deterioro de las características sensoriales del mismo durante su almacenamiento. Siendo el hongo *R. stolonifer* el principal agente causal de la pudrición blanda en frutos de guanábana en periodos postcosecha, produciendo grandes pérdidas debido a su ciclo de desarrollo y a su resistencia contra fungicidas convencionales. Debido a esto se plantea aprovechar las propiedades antifúngicas de algunas fuentes alternativas como el quitosano comercial de alto peso molecular (QC) y los extractos acuosos de mesocarpio de coco (*C. nucifera*) (EAC) para el control de las enfermedades producidas por la infección con *R. stolonifer*, mediante la evaluación “*in vitro*” de ambos tratamientos a diferentes concentraciones, para posteriormente evaluar las combinaciones de quitosano y extracto acuoso más efectivas en pruebas “*in vivo*” sobre frutos de guanábana (*A. muricata*) para el control de la enfermedad y conservación de los parámetros de calidad del fruto durante su almacenamiento.

## CAPÍTULO 4. OBJETIVOS.

### 4.1. Objetivo General.

Evaluar el efecto fungicida de una solución a base de un extracto acuoso de mesocarpio de coco (*C. nucifera*) y quitosano comercial en el control de la enfermedad producida por el hongo *R. stolonifer* y el deterioro en la calidad de frutos de guanábana (*A. muricata*) durante la postcosecha.

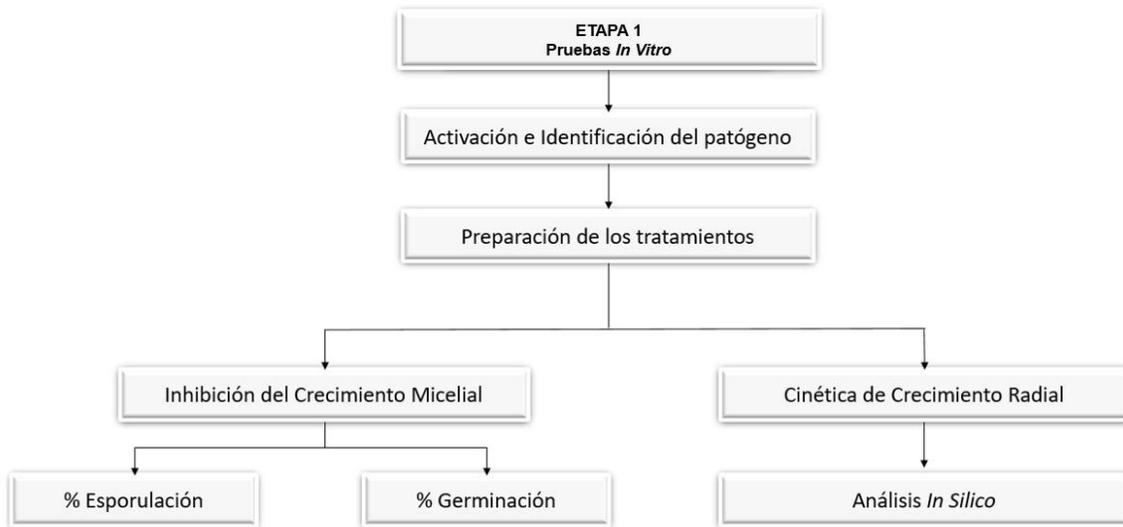
### 4.2. Objetivos específicos.

- ✓ Evaluar la actividad antifúngica “*in vitro*” de los tratamientos (QC y EAC) de forma individual y en combinación a diferentes concentraciones mediante pruebas de inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas de *R. stolonifer*.
- ✓ Evaluar el efecto de los tratamientos *in vitro* sobre los parámetros cinéticos de crecimiento radial en *R. stolonifer*.
- ✓ Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la morfología externa de micelio y conidios de *R. stolonifer* mediante microscopía óptica.
- ✓ Evaluar el efecto “*in vivo*” de la aplicación de una solución de EAC y QC en el control de la enfermedad por *R. stolonifer* en frutos inoculados de guanábana (*A. muricata*) a temperatura ambiente (25 °C) y de refrigeración (15 °C).
- ✓ Evaluar el efecto “*in vivo*” de una solución de EAC y QC sobre parámetros de calidad postcosecha (°Brix, acidez, color, firmeza, SST y vida útil máxima) en frutos de guanábana (*A. muricata*) durante su almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C) y de refrigeración (15 °C).

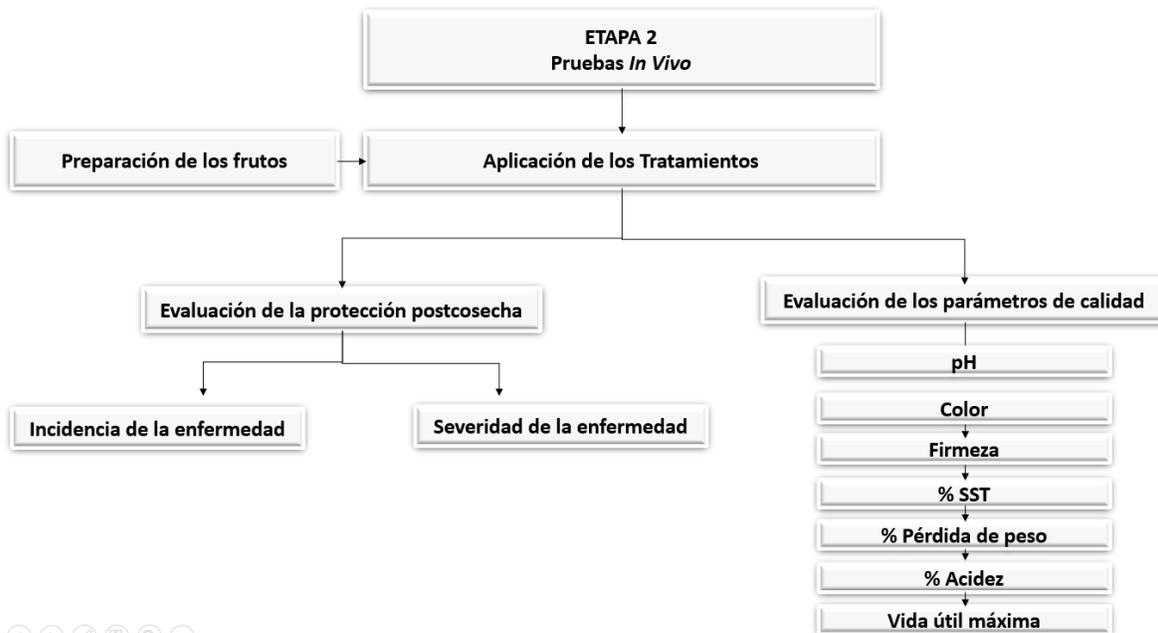
# CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

## 5.1. Plan general.

En los siguientes esquemas se detalla el plan general:



Esquema 1. Plan general etapa 1 (Pruebas *in vitro*).



## **5.2. Primera Etapa Evaluaciones “*In vitro*”.**

### **5.2.1. Preparación del extracto acuoso de mesocarpio de coco (*C. nucifera*).**

La preparación del EAC se realizó siguiendo la metodología descrita por Cortés-Rivera *et al.* en 2019 con algunas modificaciones, donde el mesocarpio de coco se adquirió en el municipio de San Blas, Nayarit, con productores locales; seleccionando muestras con etapas de madurez homogénea, sin daños por insectos o por manipulación durante la cosecha, posteriormente las muestras se trasladaron al Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA) dentro del Instituto Tecnológico de Tepic y se les aplicó un primer lavado con agua corriente para remover partículas sólidas e impurezas, posteriormente se lavaron con agua destilada y se sometieron a secado en un horno convencional con sistema digital de temperatura (NOVATECH, Modelo: HS60 AID E.E. U.U.) por 24 h a 70 °C; las muestras secas fueron pulverizadas con ayuda de un equipo NUTRIBULLET (Modelo: NBR-0804B, E.E. U.U.) y tamizadas con una malla de 0.5 micras hasta obtener un polvo fino homogéneo, del cual se suspendieron 500 mg en 20 mL de agua destilada estéril empleando un tubo de 50 mL, la suspensión se agitó durante 2 h con ayuda de un Agitador orbital (Heidolph, Reax 2, E.E. U.U.), se centrifugó (HERMLE, Z326 K, E.E. U.U.) a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Los extractos obtenidos se filtraron con ayuda de Acrodiscos estériles (Unidad de filtración Millex-HN; 0.45 µm, nylon, 33 mm) y se almacenaron en tubos estériles de 25 mL en refrigeración a 4 °C.

### **5.2.1. Preparación del quitosano.**

La preparación del QC se realizó siguiendo la metodología descrita por (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2019) con algunas modificaciones, donde para los diferentes tratamientos se prepararon concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5% (p/v) de quitosano

de alto peso molecular (American Foods, Functional Ingredients, Zapopan, Jalisco, México) y se solubilizaron en agua destilada estéril con vinagre (Member 's Mark, México) al 10% (v/v). Las soluciones se sometieron a agitación constante por 24 h, y el pH se ajustó a 5.6 con una solución de NaOH 1N, adicionando 0.1 mL de Tween 80.

### **5.2.2. Reactivación de *Rhizopus stolonifer*.**

La cepa de *R. stolonifer* se aisló previamente de guanábana infectada. El cultivo de *R. stolonifer* se activó agregando 40  $\mu$ L de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esporas/mL) en placas de Petri con medio enriquecido con guanábana, el medio se preparó mezclando 24 g de agar bacteriológico (MCD LAB <sup>TM</sup>) con 56 g de guanábana fresca por litro de agua destilada e incubando a  $27 \pm 2$  °C durante 8 días.

### **5.2.3. Preparación de los tratamientos para su evaluación *in vitro*.**

Para la preparación de los tratamientos a base de extracto acuoso de mesocarpio de coco, se empleó la metodología de agar envenenado descrita por Balouiri *et al.*, (2016) con algunas modificaciones, donde los extractos se incorporaron en el medio enriquecido con guanábana estéril a concentraciones de 1.0, 5.0 y 10% (v/v) y se vaciaron en placas de Petri. Para la preparación de los tratamientos a base de quitosano, se utilizó la metodología descrita por (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a) con algunas modificaciones donde se agregaron 5 mL del quitosano en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5% en medio enriquecido con guanábana e integrándose mediante agitación y vaciando en placas de Petri de 100x15 mm. El control negativo consistió en placas con medio enriquecido de guanábana sin tratamiento.

### **5.2.4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (% ICM).**

Se empleó el método de dilución en agar descrito por (Gonzalez-Estrada *et al.*, 2017), con algunas modificaciones donde se evaluaron los diferentes tratamientos: QC (0.5, 1.0 y 1.5% p/v), EAC (1.0, 5.0 y 10% v/v) y su combinación (QC 0.5% + EAC 1.0%, QC 1.0% + EAC 5.0 % y QC 1.5% + EAC 10.0%). Las placas con tratamiento fueron inoculadas con un disco de agar de 10 mm de diámetro de

cultivos de *R. stolonifer* con 72 h de crecimiento. Las placas de agar se incubaron a 27 °C durante 48 h. El control consistió en medio de guanábana sin tratamiento. Se realizaron mediciones cada 24 h utilizando un equipo vernier (Calibrador Vernier Digital, Truper 14388, EE.UU.) hasta que el control tocara las paredes de la placa Petri. La actividad antifúngica se expresó en términos de porcentaje de inhibición del desarrollo micelial y se calculó de acuerdo con la ecuación 1.

$$\%ICM = \left( \frac{(DC - Di) - (DT - Di)}{(DC - Di)} \right) * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

IDM= Inhibición del crecimiento micelial.

DC= Diámetro del control.

DT= Diámetro del tratamiento.

Di= Diámetro inicial (10 mm).

Todas las pruebas se realizaron por triplicado, y cada experimento se repitió dos veces.

### **5.2.5. Cinética del crecimiento radial.**

Se empleó la técnica descrita por (Ochoa-Velasco *et al.*, 2016) con algunas modificaciones donde las placas empleadas en las pruebas de % ICM fueron fotografiadas y medidas utilizando un equipo vernier (Calibrador Vernier Digital, Truper 14388, EE.UU.) hasta la colonización completa de la placa. Las mediciones se tomaron cada 4 h hasta que la colonia se desarrollara por toda la placa o su desarrollo fuera constante; se realizaron tomas del radio de crecimiento con una cámara fotográfica profesional marca Nikon (Nikon D500 DSLR, EE.UU.) y con ayuda del software Adobe photoshop (Adobe, CC 2018, White Lion, EE.UU.) se convirtieron en imágenes binarizadas (blanco y negro) realizando su fraccionamiento en círculos concéntricos de crecimiento progresivo. La cinética de crecimiento radial de la colonia se ajustó mediante el Software Find Graph (UNIPIZ

Lab, 1.960, EE.UU.) ajustando las curvas a un modelo modificado de Gompertz mediante la ecuación 2.

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = A \exp\left(-\exp\left(V_{max} * \frac{e}{A} (\lambda - t) + 1\right)\right) \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

$N_t$ = Crecimiento en el tiempo (t).

$N_0$ =Crecimiento en el tiempo (0).

$V_{max}$ = Tasa de crecimiento máxima específica.

$A$ = Crecimiento máximo en la fase estacionaria.

$\lambda$ = Duración de la fase de latencia.

### 5.2.6. Esporulación.

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la esporulación se empleó la metodología descrita por (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a) con algunas modificaciones, donde se preparó una suspensión de esporas a partir de las placas de Petri empleadas en la evaluación del desarrollo micelial, añadiendo 10 mL de una solución de NaCl al 0.8% estéril y realizando un raspado de la superficie con una varilla de vidrio estéril a fin de romper la estructura micelial y liberar las esporas formadas, posteriormente se filtraron las suspensiones con gasas estériles sobre un embudo de vidrio estéril, depositando la suspensión de esporas en tubos de 50 mL. Se determinó la concentración de esporas por mL mediante conteo sobre la cámara de Neubauer depositando 14  $\mu$ L de cada tratamiento, y visualizando a través del microscopio óptico (Motic BA300, EE.UU.) mediante el objetivo 40X hasta determinar el número de esporas por mL mediante la ecuación 3.

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{N}{10} * 25 * 10^4 * F \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

N: Suma total de células contadas en 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer.

25: Número total de cuadrantes.

$10^4$ : Factor de conversión (Número de células por cuadrante a número de células por mL).

F: Factor de dilución.

### 5.2.7. Porcentaje de Germinación.

Se determinó el porcentaje de germinación de esporas mediante la metodología descrita por (Ramos Guerrero *et al.*, 2018a) con algunas modificaciones, donde se obtuvo una suspensión madre de esporas utilizando un cultivo de *R. stolonifer* con 72 h de crecimiento, añadiendo 10 mL de una solución de NaCl al 0.8% estéril a la placa de Petri para posteriormente realizando un raspado de la superficie con una varilla de vidrio, filtrar la suspensión con gasas estériles sobre un embudo de vidrio estéril y depositarla en un tubo de 50 mL. Se ajustó la concentración de esporas a  $1 \times 10^5$  esporas/mL. El cálculo de la concentración en la suspensión de esporas se realizó mediante un conteo en la cámara de Neubauer depositando una alícuota de 14  $\mu$ L y visualizando a través del microscopio óptico (Motic BA300, EE.UU.) mediante el objetivo 40X hasta determinar el número de esporas por mL mediante la ecuación 3. Posteriormente se tomaron alícuotas de 100 mL y se depositaron en discos de medio enriquecido con guanábana adicionados con los tratamientos: QC (0.5, 1.0 y 1.5%), EAC (1.0, 5.0 y 10.0 %) y los tratamientos combinados (QC 0.5% + EAC 1.0 %, QC 1.0 % + EAC 5.0 %, y QC 1.5 % + EAC 10 %). El conteo de esporas germinadas se realizó a las 4 h de incubación usando un microscopio óptico (Motic BA300, EE.UU.) con el objetivo 40X. Para determinar el número de esporas germinadas, se consideraron germinadas las esporas con un tubo germinativo del doble de su tamaño. El porcentaje de germinación se calculó utilizando la ecuación 4.

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{Esporas germinadas}}{\text{Esporas totales}} * 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

### 5.2.8. Simulación de las interacciones entre tratamientos.

Se simularon interacciones entre las principales cargas orgánicas presentes en el extracto acuoso de mesocarpio (Ácido clorogénico y galocatequina) con el quitosano, empleándose moléculas de quitosano en formato PDB de la base de datos “PolySac3DB” (<http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/db-connect.php?number=76>) y moléculas de los compuestos fenólicos de la base de datos “Human Metabolome Database” (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003164>). Las estructuras fueron optimizadas mediante cálculos de dinámica molecular MMFF94 y MM2, y se determinó la densidad de carga total por el cálculo de Huckel mediante el software para Windows Chem3D (17.0, PerkinElmer Informatics Inc, EE.UU.). Posteriormente se empleó el software para Autodock 4.2 (Versión 1.5.6) para agregar cargas parciales de Gasteiger e hidrógenos necesarios en las moléculas de quitosano, así como valores de torsión en las moléculas de ácido clorogénico y galocatequina exportándose como archivos pdbqt. y mediante el software PyMOL (Versión 2.3.4, Windows) se visualizaron interacciones de carácter polar entre las moléculas.

### **5.3. Segunda Etapa Evaluaciones “*In vivo*”.**

#### **5.3.1. Inoculación del patógeno en frutos de guanábana (*A. muricata*).**

La inoculación del hongo en el fruto se realizó empleando la metodología descrita por (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018a), donde todos los frutos de guanábana se lavaron y desinfectaron con una solución con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.0% (v/v) durante 2 min, y se secaron a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente se realizaron 10 heridas de 3 mm de profundidad en diferentes zonas del fruto con ayuda de una jeringa de insulina con aguja estéril calibre 31. Cada herida fue inoculada con el patógeno de interés administrando 10 µL de una suspensión de esporas previamente ajustada ( $1 \times 10^6$  esporas /mL).

#### **5.3.2. Aplicación de los tratamientos *In vivo*.**

La aplicación de los tratamientos se realizó empleando la metodología descrita por (Rodríguez-Pereida, 2018) y (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018b) con algunas modificaciones. Los frutos previamente inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente en una atmósfera estéril durante 8 h con el fin de que las esporas

inoculadas se desarrollaran sobre la cutícula del fruto. Transcurrido el tiempo de germinación, se aplicaron los tratamientos de QC (0.5, 1.0 y 1.5% p/v), EAC (1.0, 5.0 y 10.0 % v/v) y su combinación (QC 0.5% + EAC 1.0%, QC 1% + EAC 5% y QC 1.5% + EAC 10%) mediante inmersión del fruto durante 5 min. El tratamiento control consistió en agua destilada estéril.

### **5.3.2.1. Incidencia de la enfermedad.**

La incidencia de la enfermedad se determinó por el método descrito por (Andrades *et al.*, 2009) con algunas modificaciones, calculando la relación entre el número de heridas infectadas por fruto con el número de heridas totales empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{Número de Heridas infectadas}}{\text{Número de Heridas totales}} * 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

### **5.3.2.2. Severidad de la enfermedad.**

El porcentaje de severidad de la enfermedad se determinó empleando la metodología descrita por (Rodríguez-Pereida, 2018) con algunas modificaciones donde con ayuda de un vernier (Calibrador Vernier Digital, Truper 14388, EE.UU.) se midió el crecimiento diametral de las heridas inoculadas, los resultados se expresaron en mm y la severidad se calculó utilizando la ecuación 6.

$$\% \text{ Severidad} = \frac{\text{Diámetro promedio de las lesiones de las heridas control}}{\text{Diámetro promedio de las lesiones de las heridas tratadas}} * 100 \quad \text{Ec. (6)}$$

### **5.3.3. Color.**

Se evaluaron los cambios en el color siguiendo la metodología reportada por (Gonzalez-Estrada *et al.*, 2017) midiendo la diferencia de color mediante las variables L\*H\*C\* con el uso de un equipo colorímetro (PCE-CSM 1, PCE-INSTRUMENTS, EE.UU.) a diferentes tiempos.

### **5.3.4. Firmeza.**

La determinación de la firmeza se realizó empleando el método descrito por (Dang *et al.*, 2016) empleando un texturómetro (TA.XT Plus, EE.UU.) mediante la penetración a lo largo del fruto con cáscara. Los resultados se expresaron en Newtons (N).

#### **5.3.6. Pérdida fisiológica de peso (PFP).**

La pérdida de peso fisiológico de las frutas se determinó por la metodología reportada por (Kaur, 2016) y los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso empleando la ecuación 7.

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{\text{Peso Inicial} - \text{Peso Final}}{\text{Peso Inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. (7)}$$

#### **5.3.7. Sólidos solubles totales (SST).**

Para la determinación de los SST se empleó la metodología reportada por la (AOAC, 2000) usando un refractómetro digital (PAL-COFFEE, Atago, EE.UU.).

#### **5.3.8. Acidez titulable.**

La acidez titulable se determinó siguiendo la metodología descrita por (Khan & Singh, 2008) tomando muestras de los diferentes tratamientos cada 24 h. Los resultados se expresaron como porcentaje de acidez mediante la ecuación 8.

$$\% \text{ Acidez: } \frac{\text{Normalidad del NaOH} \times \text{Vol. de NaOH (mL)} \times \text{meq}}{\text{g muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. (8)}$$

#### **5.3.9. Vida útil máxima.**

La vida útil se determinó empleando la metodología descrita por (Tabassum *et al.*, 2018) con algunas modificaciones, donde los frutos de guanábana se lavaron y

desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.0% (v/v) durante 2 min, y se dejaron secar a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente se trataron con QC (0.5, 1.0 y 1.5% p/v), EAC (1.0, 5.0 y 10.0 % v/v) y su combinación (QC 0.5% + EAC 1.0%, QC 1% + EAC 5% y QC 1.5% + EAC 10%) mediante inmersión, posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente (25 °C) y de refrigeración (15 °C); y se registró el número de días durante los cuales las frutas tratadas se mantuvieron en buen estado, tomando como parámetros cambios en la textura, color, pérdida de peso y susceptibilidad a enfermedades fúngicas. El promedio de días hasta la senescencia del fruto se registró como la viabilidad.

#### **5.4. Análisis estadístico.**

Se empleó un diseño factorial  $2^3$  completamente aleatorizado para la determinación de diferencias significativas entre tipo de factores: Tipo de tratamiento (EAC, QC y EAC + QC) y tipo de concentración por tratamiento, todas las pruebas de la etapa *in vitro* se expresaron calculando la media y la desviación estándar por cada determinación, y se empleó el Software Minitab 18.1 para Windows (Minitab®, Inc., EE. UU.) con una prueba F de Fisher con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

Todos los análisis de la etapa "*in vivo*" se realizaron por triplicado con dos repeticiones, calculando la media y la desviación estándar por cada determinación. Se empleó un diseño de bloques, donde la variable de interés fue el tipo de tratamiento (EAC, QC y EAC + QC) y las variables de bloqueo fueron los días de prueba y las temperaturas de almacenamiento (15 y 25 °C); se empleó el Software Statistica 10.0 para Windows (STATISTICA®,STATSOFT Inc., EE. UU.) con un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño factorial 3x2 y con una prueba LSD de Fisher para comparación de medias con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1.1. Identificación morfológica de *Rhizopus stolonifer*.

Al finalizar el periodo de incubación de 72 h a 25 °C en placas de Petri previamente inoculadas con *R. stolonifer* se observó una colonia algodonosa homogénea con pequeños puntos oscuros, característicos de este patógeno, posteriormente se visualizó la morfología de los cultivos con ayuda del microscopio óptico (Motic BA300, EE.UU.), identificando mediante claves taxonómicas al patógeno, observando la presencia de un micelio con hifas cenocíticas carentes de septos, así como la presencia de esporangios redondos de color oscuro y esporas corrugadas de forma ovalada (Fig. 4).

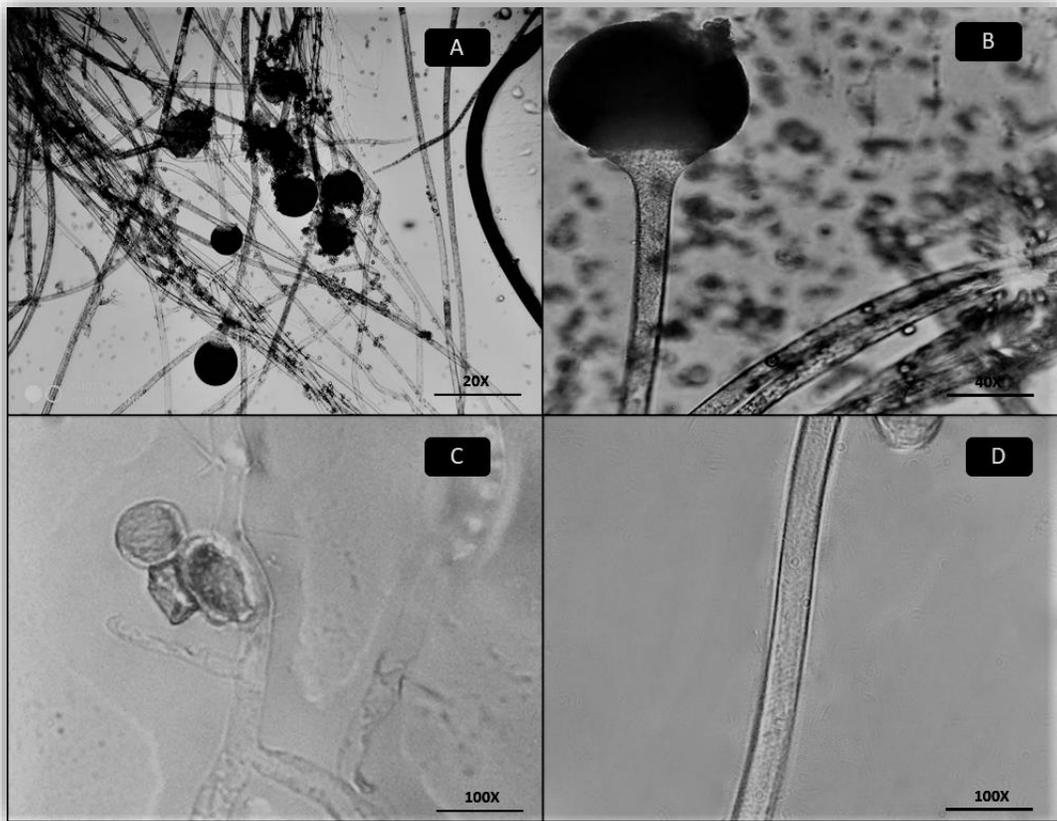


Figura 4. Micrografías de *Rhizopus stolonifer* A) Micelio 20x, B) Esporangio 40x, C) Esporas 100x, D) Hifa 100x.

Estas características concuerdan con lo reportado por Pitt & Hocking en 2009 y Ramos-Guerrero *et al.*, en 2018a, confirmando la presencia de *R. stolonifer* agente causal de la pudrición blanda en frutos tropicales.

### **6.1.2. Inhibición del crecimiento micelial.**

El crecimiento micelial de *R. stolonifer* fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) dependiendo del tipo de tratamiento utilizado dentro de las 36 h posteriores a la incubación (Tabla 2). En comparación con el control, todas las concentraciones del EAC tuvieron un efecto en la reducción del desarrollo del micelio de *R. stolonifer* (Fig. 5), observándose un mejor resultado a concentraciones del 10% ( $58.81 \pm 6.48\%$  de inhibición). Investigaciones previas de Bautista-Baños *et al.* (2000) y Medda *et al.*, (2014) evaluaron la efectividad *in vitro* de los extractos acuosos de veinte subproductos agrícolas en el crecimiento micelial de *R. stolonifer* sin obtener efectos significativos ( $< 10\%$ ), estas diferencias en la efectividad *in vitro* de los extractos acuosos podrían deberse a las diferencias en el perfil fitoquímico de los tejidos utilizados para realizar la extracción. En este sentido, Cortés-Rivera *et al.*, (2019) han informado de la presencia mayoritaria de ácido clorogénico y galocatequina en los EAC, investigaciones anteriores sugieren que el posible mecanismo de acción de estos compuestos orgánicos podría deberse a su capacidad para interactuar con la parte polar de la membrana fúngica, causando su permeabilización, así como la interrupción de procesos metabólicos vitales como la absorción de nutrientes, síntesis de ácidos grasos, producción de toxinas, reducción de la actividad del trifosfato de adenosina (ATP), inhibición de las bombas de eflujo y síntesis de ARN / ADN o síntesis de proteínas mediante la formación de complejos entre las enzimas a cargo de estos procesos y los compuestos bioactivos presentes en extractos de plantas (Aguilar & Contreras, 2007; Castillo *et al.*, 2012; Cerqueira *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2017; Shreya *et al.*, 2014).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de los diferentes tratamientos durante 36 h a 28 °C.

| Tratamiento                          | % ICM                   |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Control                              | 0.0±0.0 <sup>a</sup>    |
| EAC 1.0% <sup>1</sup>                | 48.32±6.77 <sup>b</sup> |
| EAC 5.0% <sup>1</sup>                | 51.13±6.48 <sup>c</sup> |
| EAC 10% <sup>1</sup>                 | 58.81±6.48 <sup>c</sup> |
| QC 0.5% <sup>2</sup>                 | 67.12±7.45 <sup>d</sup> |
| QC 1.0% <sup>2</sup>                 | 83.27±2.90 <sup>e</sup> |
| QC 1.5% <sup>2</sup>                 | 87.77±3.10 <sup>f</sup> |
| QC 0.5%+<br>EAC 1.0% <sup>1,2</sup>  | 79.44±3.32 <sup>e</sup> |
| QC 1.0% +<br>EAC 5.0% <sup>1,2</sup> | 91.10±1.84 <sup>f</sup> |
| QC 1.5%+<br>EAC 10% <sup>1,2</sup>   | 94.68±2.15 <sup>g</sup> |

Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a un riesgo del 5%. Letras minúsculas comparativas entre tratamientos. Medias de al menos seis réplicas  $\pm$  desviación estándar.<sup>1</sup> Evaluación del extracto acuoso en proporción (v/v). <sup>2</sup> Evaluación del quitosano en proporción (p/v).

Sin embargo, los tratamientos de QC demostraron ser más efectivos siendo la concentración de 1.5% (p/v) la que produjo una mayor inhibición (87.77  $\pm$  3.1%). Ramos-Guerrero *et al.*, (2018a) evaluaron la aplicación de quitosano de mediano peso molecular sobre el desarrollo micelial de *R. stolonifer* observando una inhibición del 100% a concentraciones del 1.5% (p/v), según Hernández-Lauzardo *et al.*, (2008) *R. stolonifer* es más susceptible al quitosano con bajo peso molecular debido a una mayor cantidad de grupos amino disponibles en las moléculas cortas de quitosano, las cuales podrían tener una mayor interacción con las células del patógeno. Investigaciones previas han sugerido que la actividad antifúngica puede ser causada por la interacción de los grupos amino y los grupos OH presentes en la molécula de quitosano con las membranas celulares del patógeno, produciendo su

permeabilización y afectando procesos como la homeostasis, respiración fúngica, absorción de nutrientes, síntesis de proteínas y la inhibición de las principales reacciones enzimáticas del patógeno por la absorción de metales esenciales, causando graves alteraciones bioquímicas y morfológicas en las células (Guerra-Sánchez *et al.*, 2010; González-Estrada *et al.*, 2019; Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018).

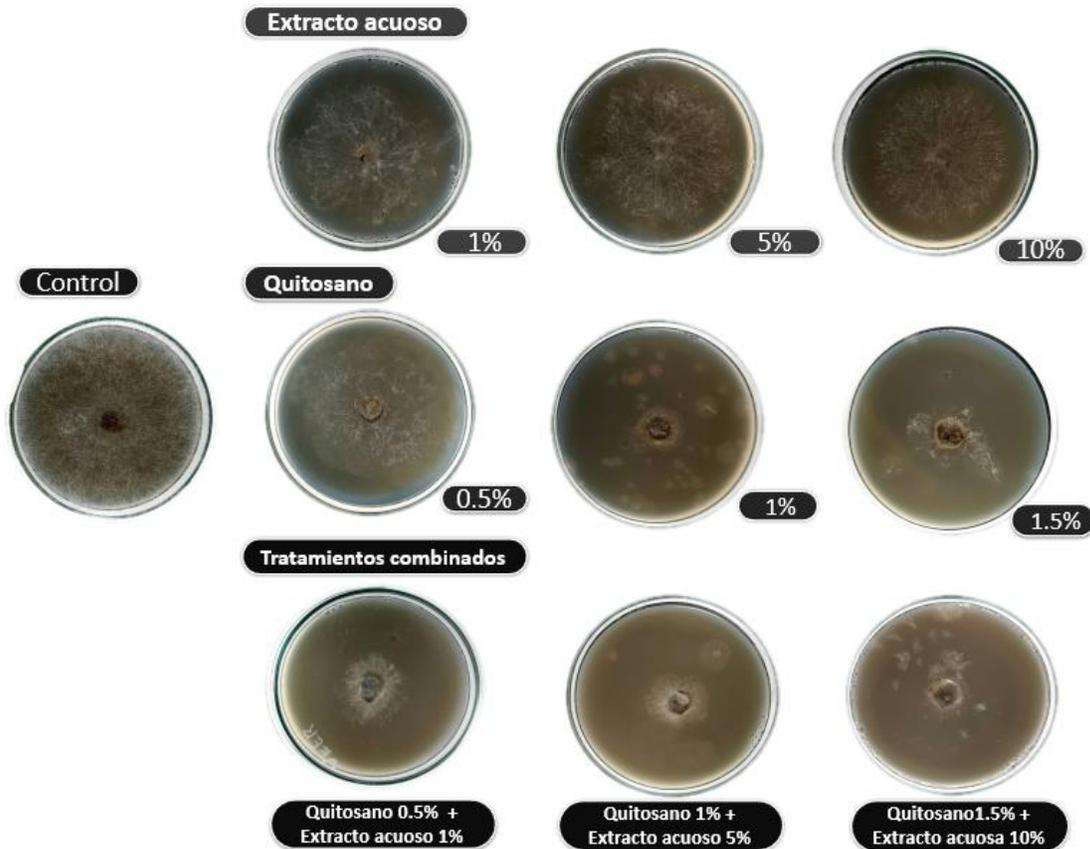


Figura 5. Desarrollo micelial de *Rhizopus stolonifer* en los diferentes tratamientos durante 36 h a 28 °C.

El EAC y el QC no demostraron ser completamente efectivos en aplicaciones individuales, sin embargo, la combinación de ambos tratamientos demostró ser más efectiva con valores de inhibición de hasta 94% al aplicar QC al 1.5% con EAC al 10%. Esto podría deberse a una posible interacción entre las moléculas de quitosano con las principales cargas orgánicas presentes en el extracto acuoso (ácido clorogénico y galocatequina) generando un mejor efecto antifúngico (Cortés-Rivera *et al.*, 2019; Niaounakis, 2014), en la Fig. 6 se observan cambios en la

morfología de las hifas y la formación de poros en la membrana fúngica al interactuar con la combinación de tratamientos (QC 1.5% + EAC 10%) en comparación con el control, estas alteraciones morfológicas concuerdan con los mecanismos de acción descritos para los tratamientos individuales (Cerqueira *et al.*, 2015 ; González-Estrada *et al.*, 2020; Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2017).

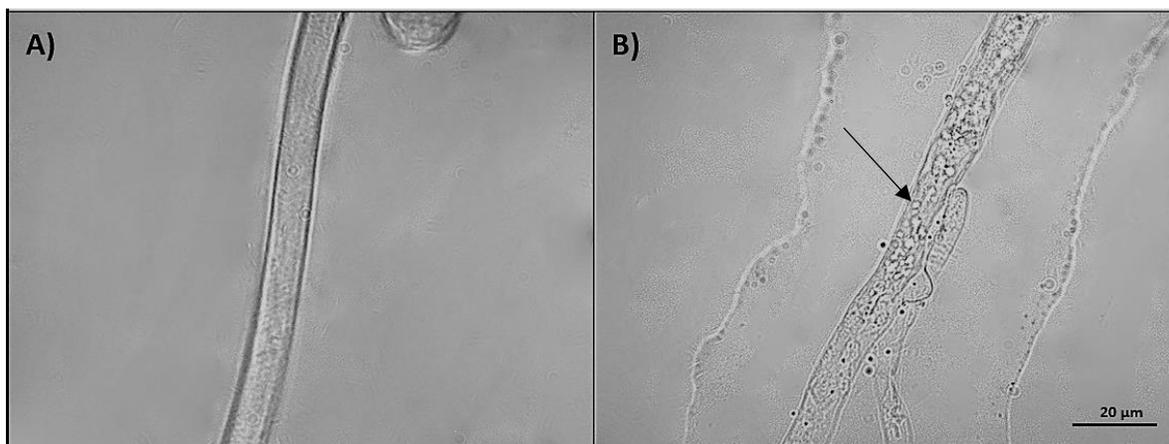


Figura 6. Microfotografía de una hifa de *Rhizopus stolonifer* a 100X. A) Control, B) Combinación quitosano-extracto acuoso.

Investigaciones previas han sugerido que la asociación de quitosano con moléculas antioxidantes puede producir una mejora sustancial en las propiedades funcionales del polímero, así como una mayor estabilidad de los ingredientes activos incorporados en la matriz de quitosano por interacciones entre el grupo carboxilo de ácidos fenólicos y grupos amino del quitosano (Aytekin *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Woranuch & Yoksan, 2013; Woranuch *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014, Zhu & Zhang, 2014).

### 6.1.3. Esporulación.

La producción de esporas en *R. stolonifer* fue significativamente diferente entre tratamientos ( $P < 0.05$ ) después de 72 h de incubación, en la tabla 3 se muestra el contenido de esporas por tratamiento. Todas las concentraciones de extracto acuoso demostraron ser efectivas con valores superiores al 90% de inhibición. Bautista-Baños *et al.*, (2000) sugieren que la aplicación de extractos acuosos ricos en ácidos fenólicos puede tener un mayor efecto inhibitorio en la esporulación en *R. stolonifer*, esto podría deberse a un posible daño estructural a las membranas

celulares y así como alteraciones en la actividad enzimática celular relacionadas con los procesos de adaptación y producción de estructuras formadoras de esporas (Karim *et al.*, 2017; Mohamed *et al.*, 2016). Sin embargo, los tratamientos con quitosano fueron más efectivos con valores cercanos al 100% de inhibición. Guerra-Sánchez *et al.*, (2010) observaron una reducción similar en la producción de esporas en *R. stolonifer* al aplicar quitosano de alto peso molecular a concentraciones de 1.5 y 2.0%.

Tabla 3. Esporulación de *R. stolonifer* sometido a los diferentes tratamientos durante 72 h a 28 °C.

| Tratamiento                          | (Esporas/mL)                            |
|--------------------------------------|---|
| Control                              | 2.85x10 <sup>6</sup> ±0.53 <sup>a</sup> |
| EAC 1.0% <sup>1</sup>                | 1.4x10 <sup>5</sup> ±1.01 <sup>b</sup>  |
| EAC 5.0% <sup>1</sup>                | 0.85x10 <sup>5</sup> ±0.81 <sup>c</sup> |
| EAC 10% <sup>1</sup>                 | 0.55x10 <sup>5</sup> ±0.6 <sup>d</sup>  |
| QC 0.5% <sup>2</sup>                 | 0.45x10 <sup>5</sup> ±0.64 <sup>d</sup> |
| QC 1.0% <sup>2</sup>                 | 0.35x10 <sup>5</sup> ±0.41 <sup>d</sup> |
| QC 1.5% <sup>2</sup>                 | 0.2x10 <sup>5</sup> ±0.25 <sup>d</sup>  |
| QC 0.5% +<br>EAC 1.0% <sup>1,2</sup> | 0.15x10 <sup>5</sup> ±0.23 <sup>d</sup> |
| QC 1.0%<br>+ EAC 5.0% <sup>1,2</sup> | 0.1x10 <sup>5</sup> ±0.21 <sup>d</sup>  |
| QC 1.5% +<br>EAC 10% <sup>1,2</sup>  | 0.05x10 <sup>5</sup> ±0.15 <sup>d</sup> |

Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a un riesgo del 5%. Letras minúsculas comparativas entre tratamientos. Medias de al menos seis réplicas ± desviación estándar.<sup>1</sup> Evaluación del extracto acuoso en proporción (v/v). <sup>2</sup> Evaluación del quitosano en proporción (p/v).

No se observaron diferencias significativas (P>0.05) entre concentraciones del 1.5% de QC y las diferentes combinaciones de EAC con QC.

#### 6.1.4. Germinación de esporas.

La germinación de esporas en *R. stolonifer* fue significativamente diferente entre los tratamientos (P<0.05) posterior a las 4 h de incubación (Tabla 4). La concentración del 10% de EAC fue la que causó un mayor efecto (70.5±2.16% de inhibición) sobre

la germinación de esporas de *R. stolonifer*, Karim *et al.*, (2017) y Vidhyasekaran (2006) sugieren que los extractos acuosos ricos en fenólicos como el ácido clorogénico pueden producir una mayor inhibición de los procesos de germinación al suprimir la transducción de señales e interferir en la actividad enzimática de las esporas dependiendo de la concentración empleada. En general, todos los tratamientos con QC y las combinaciones con EAC inhibieron la germinación de esporas (>99%). Guerra-Sánchez *et al.*, (2010), Hernández-Lauzardo *et al.*, (2008) y Ramos-Guerrero *et al.*, (2018a) reportaron una inhibición significativa en la germinación de esporas (Mayor a 99%) de *R. stolonifer* mediante el uso de quitosano de diferentes pesos moleculares, esto podría deberse a que los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) presentes en el quitosano tienen la capacidad de interactuar con las cargas negativas en la membrana celular de la espora, causando cambios en la permeabilidad y retardando los procesos de germinación (González-Estrada *et al.*, 2020).

Tabla 4. Inhibición de la germinación de *Rhizopus stolonifer* sometido a los diferentes tratamientos durante 36 h a 28 °C.

| Tratamiento           | % Inhibición de Germinación |
|-----------------------|-----------------------------|
| Control               | 0.0±0.0 <sup>a</sup>        |
| EAC 1.0%              | 48.5±6.53 <sup>b</sup>      |
| EAC 5.0%              | 66.33±6.12 <sup>c</sup>     |
| EAC 10%               | 70.5±2.16 <sup>d</sup>      |
| QC 0.5%               | 98.66±1.75 <sup>e</sup>     |
| QC 1.0%               | 99.33±0.81 <sup>e</sup>     |
| QC 1.5%               | 99.66±0.51 <sup>e</sup>     |
| EAC 1.0%+<br>QC 0.5%  | 99.66±0.51 <sup>e</sup>     |
| EAC 5.0%<br>+ QC 1.0% | 99.83±0.40 <sup>e</sup>     |
| EAC 10%+<br>QC 1.5%   | 99.83±0.40 <sup>e</sup>     |

Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a un riesgo del 5%. Letras mayúsculas comparativa entre tipo de tratamiento, letras minúsculas comparativa entre concentraciones de un mismo tratamiento. Medias de al menos seis réplicas ± desviación estándar.

No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las combinaciones de extracto acuoso con quitosano (Fig. 7).

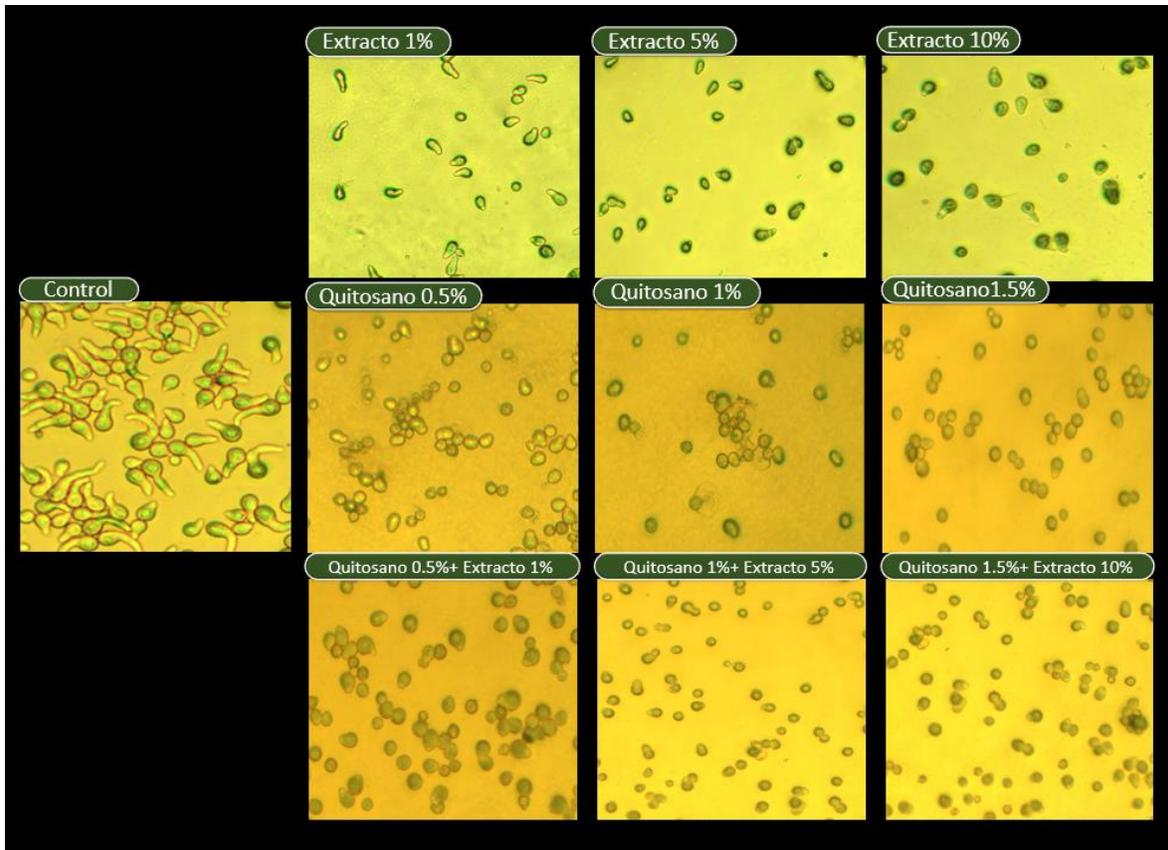


Figura 7. Germinación de esporas de *R. stolonifer* sometidas a los diferentes tratamientos durante 4 h, 40 X.

### 6.1.5. Cinética de crecimiento en medio sólido homogéneo.

La ecuación modificada de Gompertz mostró un buen ajuste en la descripción del desarrollo micelial de *R. stolonifer* sobre los diferentes tratamientos, observándose un coeficiente de determinación promedio ( $R^2$ ) de  $0.997 \pm 0.005$  para ambas temperaturas ( $15\text{ }^\circ\text{C}/25\text{ }^\circ\text{C}$ ). Debido a que *R. stolonifer* presenta un crecimiento lineal a partir de  $40\text{ }\mu\text{m}$  de longitud del tubo germinativo, este modelo matemático puede determinar de manera adecuada las principales variables involucradas en la cinética de desarrollo de este patógeno (Nikkhah et al., 2017; Pitt & Hocking, 2009). El análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las variables de velocidad máxima ( $V_{\max}$ ) y periodo de latencia ( $\lambda$ ) dependiendo el tipo de tratamiento aplicado (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros modificados del modelo de Gompertz para las curvas de crecimiento de *Rhizopus stolonifer* sometido a diferentes tratamientos y temperaturas.

| Tratamiento | Parámetros de Gompertz |
|-------------|------------------------|
|-------------|------------------------|

|                     | $V_{max}$ (mm/h)        |                         | $\lambda$ (h)           |                         | Variabilidad (R <sup>2</sup> adj.) |       |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------|
|                     | 15 °C                   | 25 °C                   | 15 °C                   | 25 °C                   | 15 °C                              | 25 °C |
| Control             | 0.067±0.02 <sup>a</sup> | 0.266±0.09 <sup>a</sup> | 1.271±0.42 <sup>a</sup> | 0.022±0.01 <sup>a</sup> | 0.991                              | 0.994 |
| EAC 1%              | 0.060±0.01 <sup>b</sup> | 0.230±0.05 <sup>c</sup> | 2.620±0.61 <sup>b</sup> | 0.825±0.06 <sup>b</sup> | 0.997                              | 0.986 |
| EAC 5%              | 0.057±0.01 <sup>b</sup> | 0.218±0.04 <sup>d</sup> | 2.818±0.74 <sup>c</sup> | 1.025±0.09 <sup>c</sup> | 0.996                              | 0.981 |
| EAC 10%             | 0.056±0.00 <sup>c</sup> | 0.212±0.02 <sup>d</sup> | 3.002±0.83 <sup>c</sup> | 1.193±0.14 <sup>c</sup> | 0.997                              | 0.984 |
| QC 0.5%             | 0.063±0.02 <sup>b</sup> | 0.245±0.07 <sup>b</sup> | 2.069±0.64 <sup>b</sup> | 0.692±0.11 <sup>b</sup> | 0.995                              | 0.991 |
| QC 1%               | 0.062±0.02 <sup>c</sup> | 0.239±0.06 <sup>b</sup> | 2.525±0.41 <sup>b</sup> | 0.766±0.21 <sup>c</sup> | 0.996                              | 0.990 |
| QC 1.5%             | 0.060±0.01 <sup>c</sup> | 0.228±0.05 <sup>c</sup> | 2.546±0.31 <sup>b</sup> | 0.954±0.18 <sup>c</sup> | 0.988                              | 0.988 |
| EAC 1%+<br>QC 0.5%  | 0.057±0.02 <sup>c</sup> | 0.226±0.09 <sup>c</sup> | 2.640±0.38 <sup>c</sup> | 1.401±0.23 <sup>c</sup> | 0.996                              | 0.983 |
| EAC 5%<br>+ QC 1%   | 0.056±0.01 <sup>d</sup> | 0.217±0.04 <sup>d</sup> | 2.916±0.42 <sup>c</sup> | 1.945±0.28 <sup>d</sup> | 0.996                              | 0.986 |
| EAC 10%+<br>QC 1.5% | 0.054±0.00 <sup>d</sup> | 0.202±0.01 <sup>e</sup> | 3.020±0.78 <sup>c</sup> | 2.272±0.33 <sup>d</sup> | 0.998                              | 0.982 |

Los valores en una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a un riesgo del 5%. Letras minúsculas comparativas entre tratamientos. Medias de al menos seis réplicas. A: Crecimiento máximo en la fase estacionaria,  $V_{max}$ : Tasa de crecimiento máxima específica,  $\lambda$ : Duración de la fase de latencia.

Las concentraciones más altas del EAC (10%) y QC (1.5%) produjeron un mayor aumento sobre la fase de latencia ( $\lambda$ ) del patógeno, así como una mayor reducción en la tasa de crecimiento máximo ( $V_{max}$ ), sin embargo, los tratamientos combinados de extracto con quitosano demostraron ser más efectivos al reducir estos parámetros al mínimo para ambas temperaturas. Aún existen pocos informes que describen el efecto de los antimicrobianos naturales usando modelos matemáticos, pero se ha sugerido que la aplicación de activos naturales de manera combinada produce un mayor rango de acción sobre *R. stolonifer* al modificar los principales parámetros cinéticos asociados con desarrollo ( $\lambda$ ,  $V_{max}$ ) (Ochoa-velasco *et al.*, 2017). Aunque los mecanismos asociados con la adaptación y el desarrollo de *R. stolonifer* al interactuar con compuestos fenólicos no se encuentran totalmente esclarecidos, estos podrían implicar alteraciones en de transporte y/o cambios en los mecanismos celulares que conducen a la incorporación de material en la zona de extensión hifal (Suwanamornlert *et al.*, 2018). De igual forma, investigaciones previas han informado sobre la capacidad del quitosano para afectar variables como la tasa de

crecimiento máxima de *R. stolonifer*, así como prolongar la fase de latencia ( $\lambda$ ) debido a modificaciones en el plasma celular y alteraciones graves en membrana que conducirían a un aumento en los periodos de adaptación y diferenciación del patógeno (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; García-Rincón *et al.*, 2010). La temperatura influyó en mayor medida sobre la dinámica de crecimiento de *R. stolonifer*, sin embargo, todos los tratamientos demostraron tener un efecto fungistático al aplazar la curva de desarrollo del patógeno (Figura 8), esta adaptación a temperaturas bajas y presencia de compuestos antifúngicos se podría manifestar como cambios en las características morfológicas y estructurales como la presencia de hifas coenocíticas carentes de septos, capaces de permitir una translocación rápida de organelos y una mayor absorción de nutrientes, permitiendo el desarrollo de *R. stolonifer* en condiciones de estrés (Pitt & Hocking, 2009; Sardella *et al.*, 2018).

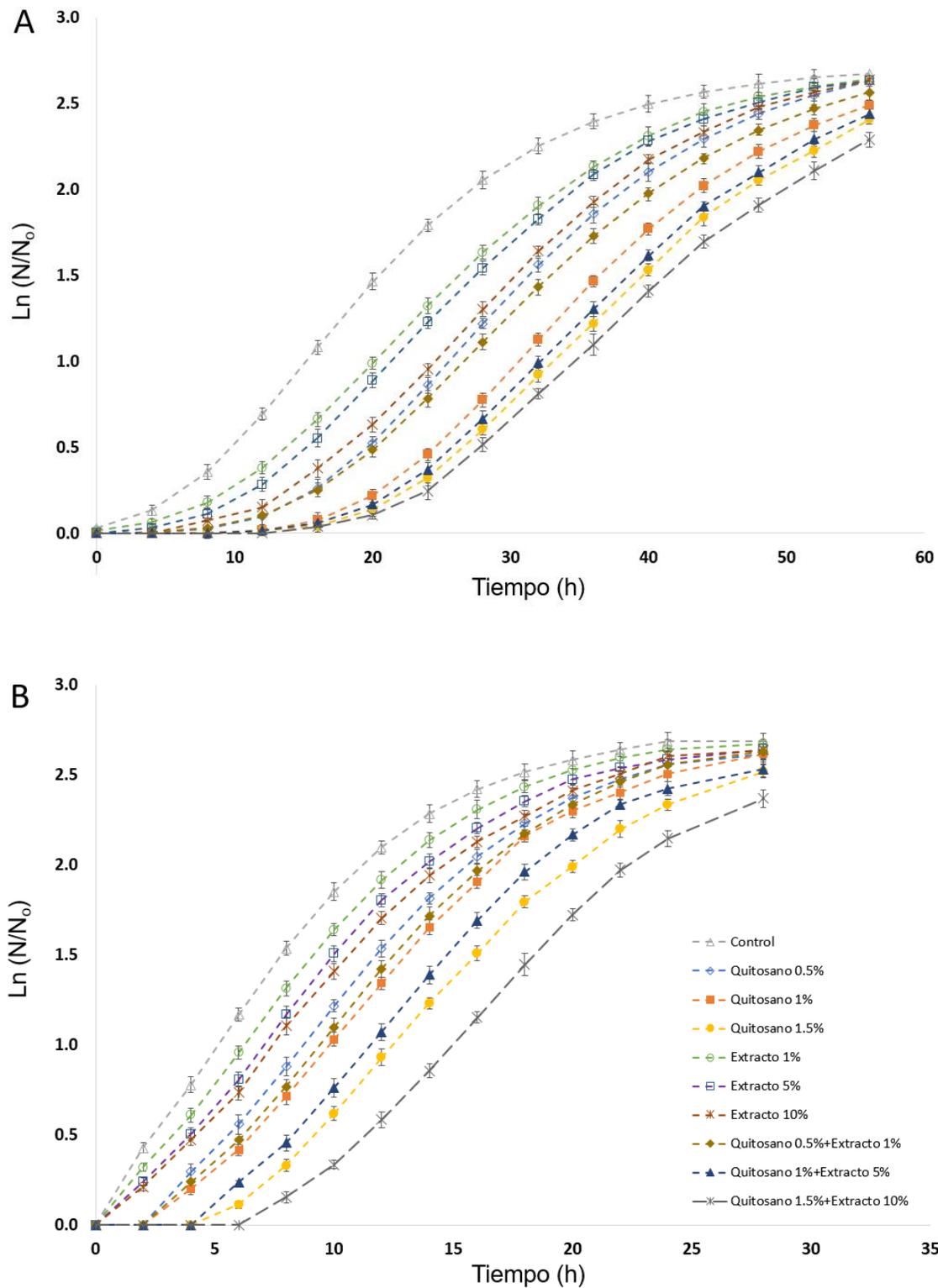


Figura 8. A) Efecto de los diferentes tratamientos sobre la cinética de crecimiento de *R. stolonifer* a 15 °C. B) Efecto de los diferentes tratamientos sobre la cinética de crecimiento de *R. stolonifer* a 25

°C. N= Diámetro promedio de la colonia en el tiempo t, N<sub>0</sub>= Diámetro de la colonia en el tiempo 0.  
Q= Quitosano, M= Extracto acuoso.

#### **6.1.6. Interacción entre tratamientos.**

En la figura 9 se muestran las representaciones estructurales y conformaciones tridimensionales del quitosano y de las principales moléculas activas presentes en el extracto acuoso (Ácido clorogénico y galocatequina), así como las superficies de densidad de carga por molécula, denotando las zonas de color rojo como los espacios aceptores de electrones por presencia de grupos oxígeno o carboxilo y las zonas de color azul como los espacios que pueden donar un electrón a través de la pérdida de hidrógeno por la presencia de grupos hidroxilo o grupos amino (Tabla 6). Debido a la abundancia de grupos polares en las cadenas de quitosano este polímero tiene la capacidad de interactuar con algunos compuestos fenólicos mediante interacciones físicas como interacciones hidrofóbicas, apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , enlaces múltiples de hidrógeno o uniones covalentes entre los grupos reactivos del quitosano (Rohn *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011). Aunque se ha sugerido una composición mayoritaria de ácido clorogénico y galocatequina en los extractos acuoso de mesocarpio de coco (*C. nucifera*), se ha reportado la presencia de otros ácidos fenólicos como el ácido gálico, ferúlico, p-cumárico, hidroxibenzoico y cafeico (Dey *et al.*, 2005; Cortés-Rivera, 2019), en este sentido, Delmonte & Estefan en 2016 evaluaron *in silico* la capacidad del quitosano para interactuar y formar complejos estables con diferentes compuestos fenólicos como el ácido gálico, ferúlico, p-cumárico y cafeico, sugiriendo una alta afinidad entre los grupos carboxilo de los fenoles con los grupos amino del quitosano que permitiría una asociación de estas moléculas con el polímero.

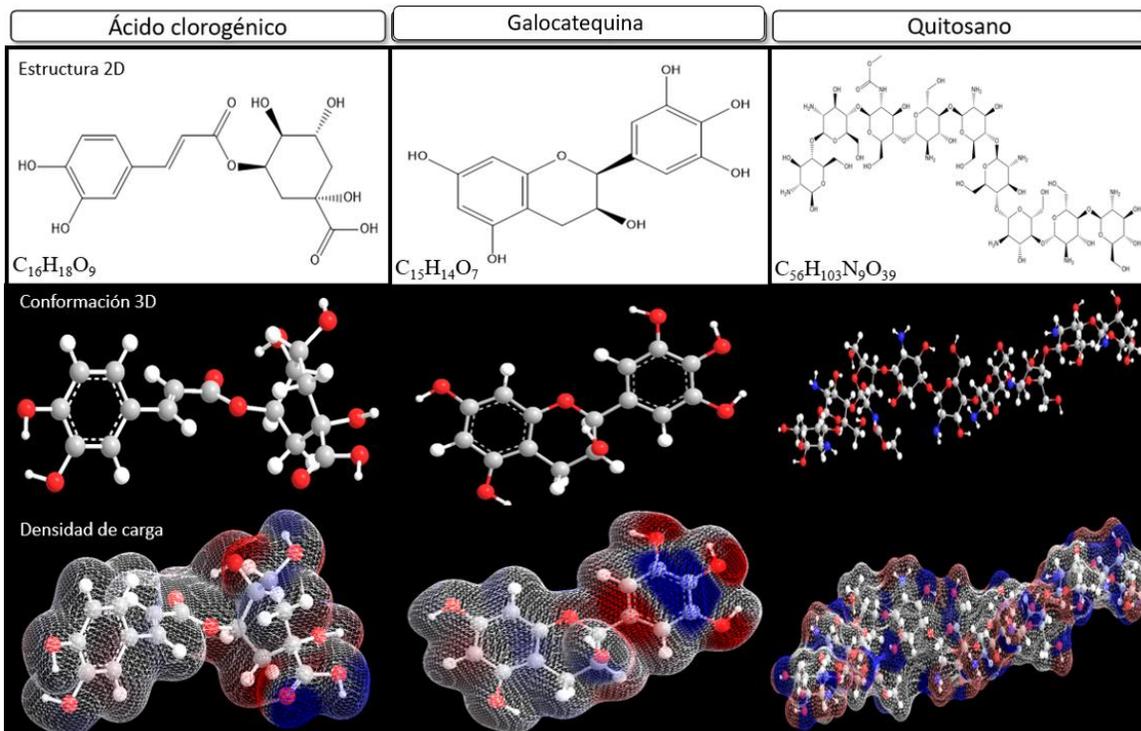


Figura 9. Estructura química, conformación tridimensional y distribución de cargas por cálculo de Huckel de las principales moléculas orgánicas presentes en los tratamientos.

En el apartado C de la figura 10, se puede observar la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo carboxilo (-COOH) del ácido clorogénico con el segundo grupo amino (-NH<sub>2</sub>) de la cadena de quitosano. Zihao & Yanxiang en 2016 evaluaron la conjugación de ácido clorogénico con quitosano sugiriendo que los grupos carboxilo presentes en el ácido clorogénico pueden reaccionar a través de interacciones físicas no covalentes con los grupos amino e hidroxilo del quitosano, produciendo complejos estables y con una mayor capacidad antioxidante.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del quitosano, ácido clorogénico y galocatequina.

| Compuesto         | Peso Molecular (g/mol) | Donadores de hidrógeno | Aceptores de hidrógeno |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Quitosano         | 1525.635               | 29                     | 46                     |
| Ácido clorogénico | 354.095                | 6                      | 8                      |
| Galocatequina     | 306.073                | 6                      | 7                      |

De igual forma en el apartado D de la figura 10 se observa la formación de dos enlaces de hidrógeno entre el cuarto grupo hidroxilo (-OH) de la molécula de

galocatequina con el quinto grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y el octavo oxígeno (-O-) presentes en la cadena de quitosano. Aunque los mecanismos de interacción entre la galocatequina y el quitosano no se encuentran del todo estudiados, Zhang & Kosaraju en 2007 sugieren que la interacción entre quitosano y catequina puede ser mediada por la formación de enlaces de carácter covalente entre los grupos amino del quitosano y los grupos hidroxilo de la catequina, de igual forma Siripatrawan & Harte en 2010 evaluaron la incorporación de extractos de té verde en películas de quitosano, sugiriendo que los compuestos fenólicos presentes en el extracto como la galocatequina podrían formar enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes dentro de la matriz de quitosano por interacciones entre los grupos amino e hidroxilo del polímero, mejorando las características antioxidantes y fisicoquímicas de la película.

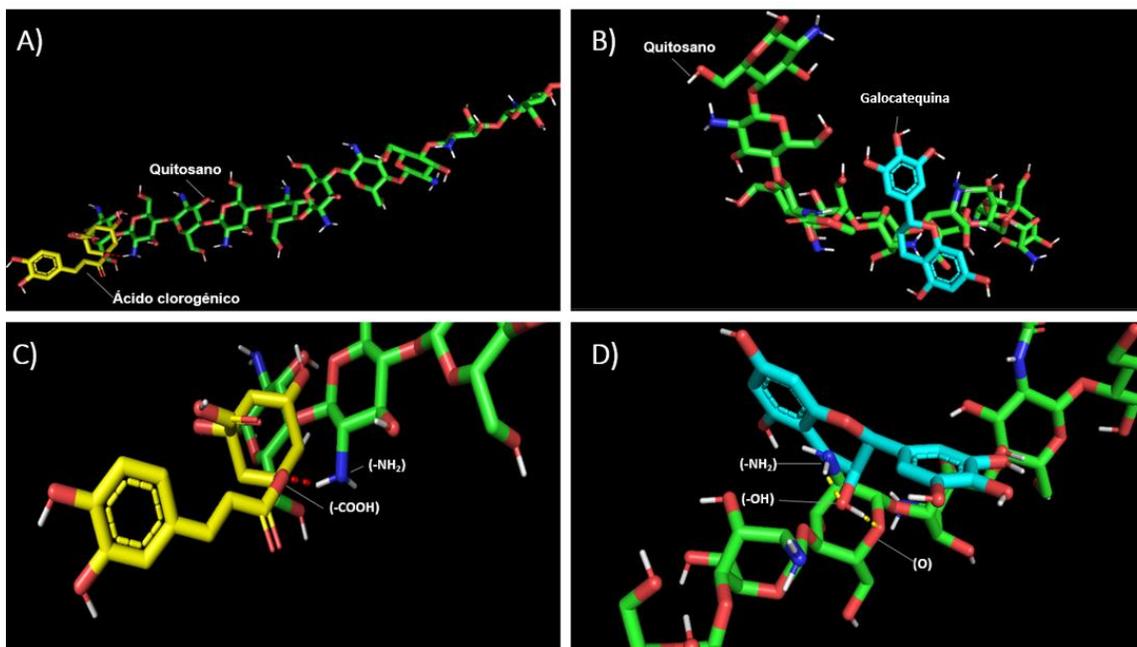


Figura 10. Interacciones moleculares entre componentes presentes en los tratamientos: A) Interacción ácido clorogénico-quitosano. B) Interacción galocatequina-quitosano. C) Interacción entre grupos funcionales ácido clorogénico-quitosano. D) Interacción entre grupos funcionales galocatequina-quitosano.

### 6.2.1. Pruebas de patogenicidad.

Todos los tratamientos tuvieron un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre la severidad e incidencia de infección de *Rhizopus stolonifer* en frutos de guanábana inoculados

artificialmente, esta reducción fue observada en ambas temperaturas de almacenamiento (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de severidad e incidencia de infección por *R. stolonifer* sobre frutos de guanábana inoculados artificialmente a 15 °C y 25 °C.

| Tratamiento          | Severidad Externa          |                            | Incidencia                 |                            |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                      | 15 °C                      | 25 °C                      | 15 °C                      | 25 °C                      |
| Control              | 100±0.0                    | 100±0.0                    | 100±0.0                    | 100±0.0                    |
| EAC 1%               | 69.60 ± 0.49 <sup>Aa</sup> | 75.94 ± 1.65 <sup>Aa</sup> | 70.83 ± 1.17 <sup>Aa</sup> | 72.5 ± 3.53 <sup>Aa</sup>  |
| EAC 5%               | 67.23 ± 1.79 <sup>Aa</sup> | 71.5 ± 2.37 <sup>Ab</sup>  | 59.16 ± 3.53 <sup>Ab</sup> | 62.77 ± 3.92 <sup>Bb</sup> |
| EAC 10%              | 66.55 ± 2.02 <sup>Ab</sup> | 69.91 ± 3.98 <sup>Ab</sup> | 50.08 ± 4.83 <sup>Ab</sup> | 54.44 ± 1.57 <sup>Ab</sup> |
| QC 0.5%              | 64.33 ± 1.45 <sup>Ab</sup> | 68.34 ± 2.05 <sup>Ab</sup> | 50.83 ± 3.53 <sup>Ab</sup> | 56.66 ± 4.71 <sup>Ab</sup> |
| QC 1%                | 56.91 ± 3.46 <sup>Ac</sup> | 59.67 ± 4.22 <sup>Ac</sup> | 46.16 ± 1.64 <sup>Ab</sup> | 52.25 ± 1.17 <sup>Ac</sup> |
| QC 1.5%              | 49.81 ± 1.82 <sup>Ad</sup> | 52.92 ± 3.23 <sup>Ad</sup> | 39.83 ± 2.35 <sup>Ac</sup> | 43.33 ± 4.94 <sup>Ad</sup> |
| QC 0.5% +<br>EAC 1%  | 59.39 ± 1.94 <sup>Ac</sup> | 62.85 ± 1.02 <sup>Ac</sup> | 47.5 ± 1.18 <sup>Ab</sup>  | 51.66 ± 2.35 <sup>Ac</sup> |
| QC 1% +<br>EAC 5%    | 52.12 ± 2.33 <sup>Ad</sup> | 55.22 ± 2.99 <sup>Bd</sup> | 41.66 ± 2.58 <sup>Ac</sup> | 45.83 ± 1.18 <sup>Ad</sup> |
| QC 1.5% +<br>EAC 10% | 43.2 ± 3.17 <sup>Ae</sup>  | 46.1 ± 2.19 <sup>Be</sup>  | 32.5 ± 3.53 <sup>Ad</sup>  | 37.54 ± 3.53 <sup>Ae</sup> |

Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a un riesgo del 5%. Letras mayúsculas comparativa entre temperaturas, letras minúsculas comparativa entre tratamientos. Medias seis réplicas ± desviación estándar.

Comparado con el control, todas las concentraciones del EAC redujeron de manera significativa ( $P < 0.05$ ) el desarrollo de la infección por *R. stolonifer* (Fig.11-13), mejores resultados se observaron a partir de concentraciones del 10% en temperatura de refrigeración (15 °C) con una mayor disminución en la severidad ( $66.36 \pm 6.10\%$ ) e incidencia ( $50.08 \pm 6.04\%$ ) de la enfermedad.

Investigaciones previas, han señalado el control *in vivo* de *R. stolonifer* (20-90%) al aplicar extractos acuosos de diferentes especies vegetales en frutos postcosecha durante su almacenamiento (Bashir *et al.*, 2020; Bautista-Baños *et al.*, 2000; Bautista-Baños *et al.*, 2003; Feliziani *et al.*, 2013; Romanazzi *et al.*, 2013; Tijjani *et*

al., 2019). El mecanismo antifúngico de los extractos vegetales no se encuentra totalmente esclarecido, sin embargo, se ha sugerido una mayor susceptibilidad *in vivo* en *R. stolonifer* al interactuar con extractos ricos en compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, quinonas y alcaloides (Bautista-Baños *et al.*, 2014; Bhagwat & Datar, 2014; Manenji *et al.*, 2017; Yang & Jiang, 2015), el potencial antifúngico de estos metabolitos secundarios se ha relacionado con la presencia de anillos aromáticos y grupos reactivos capaces de interactuar con las moléculas polares presentes en la membrana fúngica, causando posibles daños y alteraciones que dificultarían los procesos de infección del patógeno (Cerqueira *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2017; Masih *et al.*, 2014; Zaker, 2016). En este sentido, investigaciones previas han señalado la presencia de compuestos de carácter aromático como ácidos hidroxicinámicos, ácido clorogénico, flavonoides y algunos alcoholes en los extractos acuosos de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera L.*) relacionados con potencial antifúngico y actividad antioxidante (Aguilar-Mendez *et al.*, 2019; Cortés-Rivera, 2019; Cortés-Rivera *et al.*, 2019; Dey *et al.*, 2015).

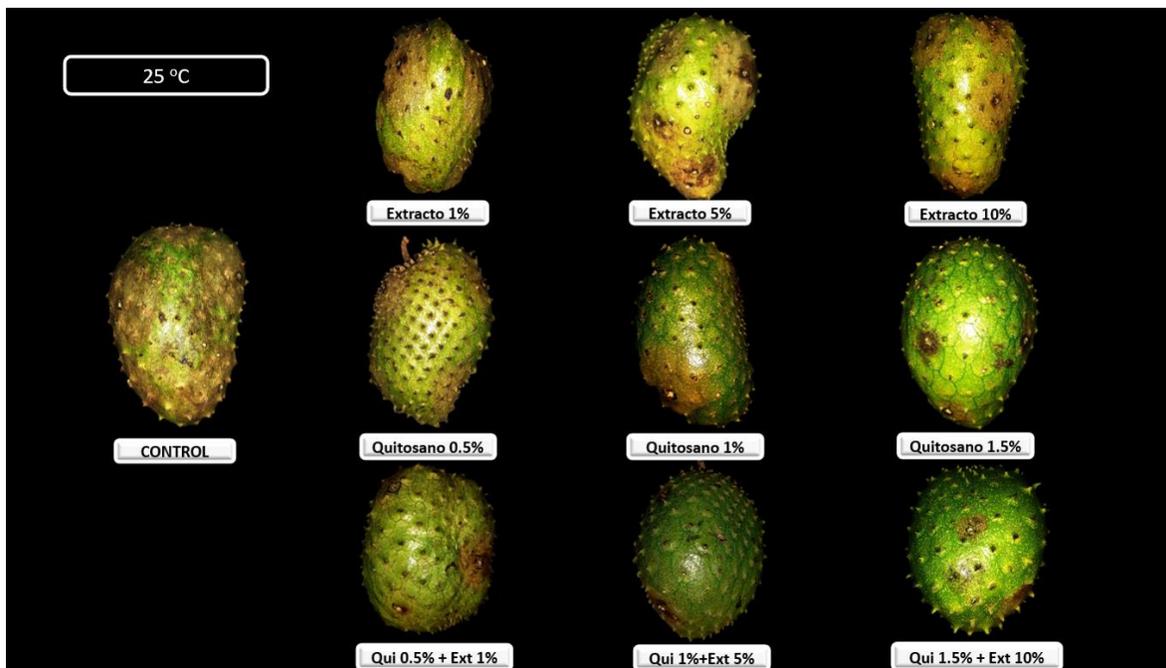


Figura 11. Severidad e incidencia exterior de la infección por *R. stolonifer* en frutos inoculados de guanábana tras 5 días de almacenamiento a 25 °C.

Todas las concentraciones del extracto produjeron una reducción en la severidad en el daño interno en los frutos infectados (Fig. 12,14), observándose un mejor efecto bajo refrigeración (15 °C) y concentraciones altas (5-10%). Aunque se ha reportado que temperaturas de almacenamiento por debajo de los 15 °C solo

producen un retraso en los procesos de infección por *R. stolonifer* (Bautista-Baños *et al.*, 2014), la presencia de compuestos bioactivos sobre la superficie del fruto podrían tener un efecto en las principales enzimas hidrolíticas relacionadas con los procesos de penetración del patógeno, retrasando los procesos de infección y desarrollo de la enfermedad (Mohamed *et al.*, 2016; Yehia & Saleh, 2016; Zaker, 2016). De igual forma, se ha observado que el almacenamiento postcosecha de guanábana a temperaturas de 15 °C puede prolongar la vida útil del fruto sin producir alteraciones fisiológicas o daños en su calidad (Berumen-Varela *et al.*, 2020; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017).



Figura 12. Severidad del daño al interior de frutos de guanábana inoculados con *R. stolonifer* tras 5 días de almacenamiento a 25 °C.

Un patrón similar fue observado al aplicar quitosano, todas las concentraciones produjeron un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre el control del patógeno, observándose una mayor reducción en la severidad ( $49.57 \pm 5.03\%$ ) e incidencia ( $40.83 \pm 7.81\%$ ) de la enfermedad a concentraciones del 1.5% en temperatura de refrigeración (15 °C). Anteriormente, se ha reportado una reducción similar en la incidencia y severidad de *R. stolonifer* sobre frutos de guanabana tratados con quitosano grado reactivo (Peso molecular medio) a partir de concentraciones del 1% (Ramos-Guerrero en 2018b). Investigaciones previas, sugieren que la efectividad antifúngica del quitosano esta relacionada con el peso molecular, la concentración aplicada y la sensibilidad del patógeno con el que interactúa

(Hernandez-Lauzardo *et al.*, 2008; Ramos-Guerreros *et al.*, 2020; Sharif *et al.*, 2018), de igual forma, se ha observado una efectividad diferencial al aplicar diferentes productos de quitosano comercial con características similares a una misma concentración (Feliziani *et al.*, 2013). Aunque existen variaciones en el mecanismo de acción del quitosano que no se han esclarecido en su totalidad (Romanazzi *et al.*, 2018), la actividad antifúngica se ha relacionado con su carácter policatiónico, capaz de interactuar con las cargas negativas expuestas en la pared celular del patógeno modificando la permeabilidad de la membrana y generando graves alteraciones a nivel intracelular (González-Estrada *et al.*, 2020; Guerra-Sanchez *et al.*, 2010), de la misma manera, se ha sugerido que parte de la eficacia antifúngica del quitosano (30-40%) en el control postcosecha se podría deber a la inducción de los mecanismos naturales de defensa del fruto, mejorando la resistencia al deterioro fúngico (Badawy & Rabea, 2016; El Hadrami *et al.*, 2010; Romanazzi *et al.*, 2016).

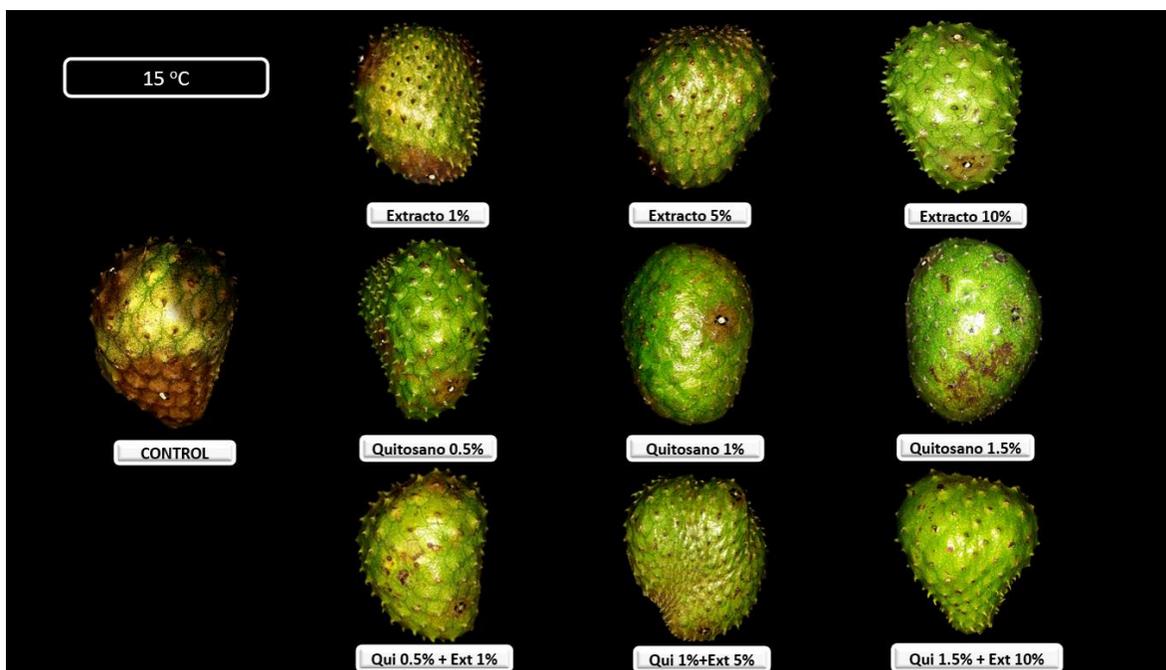


Figura 13. Severidad e incidencia exterior de la infección por *R. stolonifer* en frutos inoculados de guanábana tras 8 días de almacenamiento a 15 °C.

El quitosano aplicado en temperaturas de refrigeración mostró un mayor control en la severidad de los daños en el interior del fruto (Fig.14). Anteriormente, se ha observado que la aplicación de quitosano y el almacenamiento a bajas temperaturas (<15 °C) puede relentizar los procesos fisiológicos en frutos postcosecha y reducir la patogenicidad de *R. stolonifer* en comparación con frutos almacenados a

temperatura ambiente (Obianom *et al.*, 2019; Sadiq & Majid, 2020; Vasconcelos *et al.*, 2014; Vilaplana *et al.*, 2020). No obstante, al comparar el control con todas las combinaciones de quitosano con extracto acuoso se observó un mayor efecto sobre el desarrollo de la infección ( $p < 0.05$ ), mejores resultados se obtuvieron aplicando concentraciones altas de ambos tratamientos (Quitosano 1.5% + Extracto 10%) y almacenando a 15 °C con una mayor reducción en la incidencia ( $32.5 \pm 6.36\%$ ) y severidad de la enfermedad ( $35.03 \pm 5.09\%$ ).

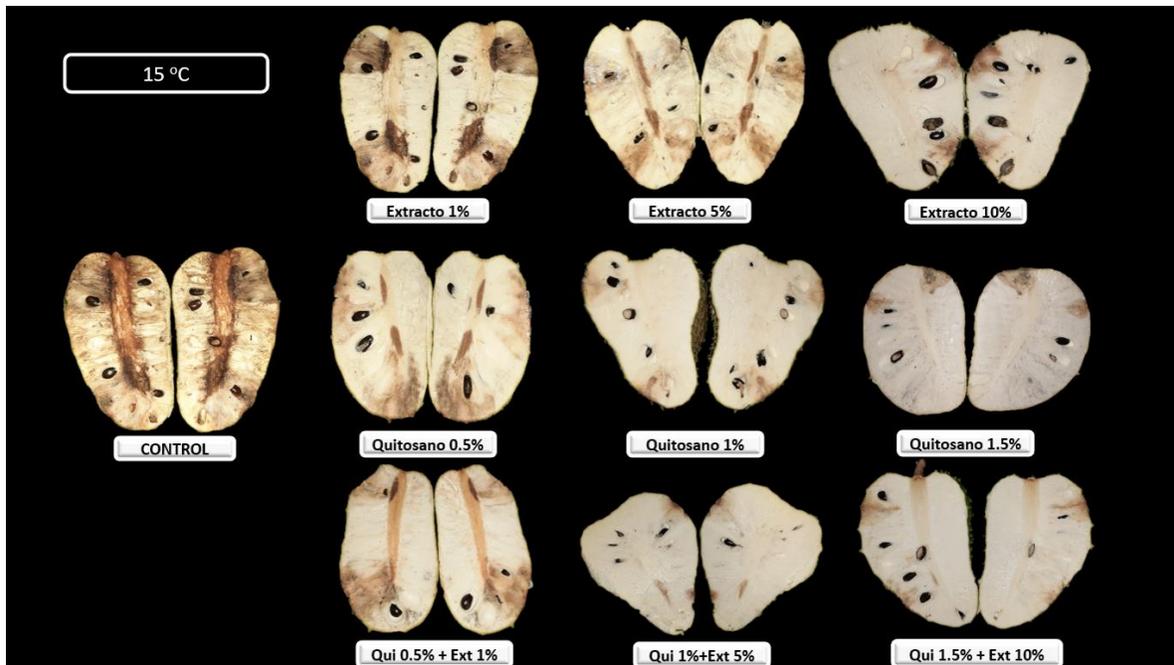


Figura 14. Severidad al interior de frutos de guanábana inoculados con *R. stolonifer* tras 5 días de almacenamiento a 25 °C.

Investigaciones previas, sugieren que la interacción entre quitosano y algunos extractos vegetales pueden conllevar la incorporación de compuestos fenólicos procedentes del extracto a la matriz de este polímero, mejorando las propiedades antioxidantes, físicas y antimicrobianas del quitosano como recubrimiento postcosecha (Bonilla & Sobral, 2016; Lauriano *et al.*, 2017; Muhammad *et al.*, 2019). Aunque el mecanismo de acción de este tipo de combinaciones no se encuentra totalmente esclarecido, se ha informado de interacción aditiva o sinergia entre las propiedades antifúngicas y antioxidantes de ambos tratamientos (Niaounakis, 2014; Talón *et al.*, 2017; Sabaghi *et al.*, 2015; Siripatrawan & Harte, 2010; Wang *et al.*, 2019), esta alta biocompatibilidad con diferentes activos naturales por parte del

quitosano se ha relacionado con sus características policatiónicas y estructurales (Elshoky *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2020; Romanazzi *et al.*, 2018), permitiendo la formación de enlaces múltiples de hidrógeno o interacciones electrostáticas entre los grupos reactivos del quitosano y los grupos polares de los compuestos fenólicos (Jiao *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2014), de igual forma, la aplicación de antifúngicos naturales de manera combinada ha demostrado un mejor espectro de acción sobre el desarrollo de *R. stolonifer* (Ochoa-velasco *et al.*, 2017). Todos los tratamientos demostraron un efecto control sobre el patógeno en ambas temperaturas de almacenamiento, sin embargo, el proceso de infección no fue inhibido en su totalidad.

### **6.2.2. Parámetros de calidad.**

Todos los tratamientos tuvieron un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre la calidad del fruto de guanábana en comparación con los frutos no tratados al finalizar el periodo de almacenamiento (Fig. 15). Mejores resultados se obtuvieron utilizando temperatura de refrigeración (15 °C) con una menor disminución en la pérdida de peso de los frutos no tratados ( $13.45 \pm 0.94\%$ ) respecto a los almacenados a temperatura ambiente ( $15.46 \pm 0.47\%$ ). Investigaciones previas, han reportado una menor pérdida en la masa postcosecha del fruto de guanábana durante su almacenamiento a 15 °C sin deshidratación o daños por frío en pulpa (Berumen-Varela *et al.*, 2020; Ceballos *et al.*, 2012; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). De igual forma, la aplicación del extracto acuoso a concentraciones del 10% bajo refrigeración mostró una mejor efectividad ( $11.09 \pm 0.5\%$ ) en comparación

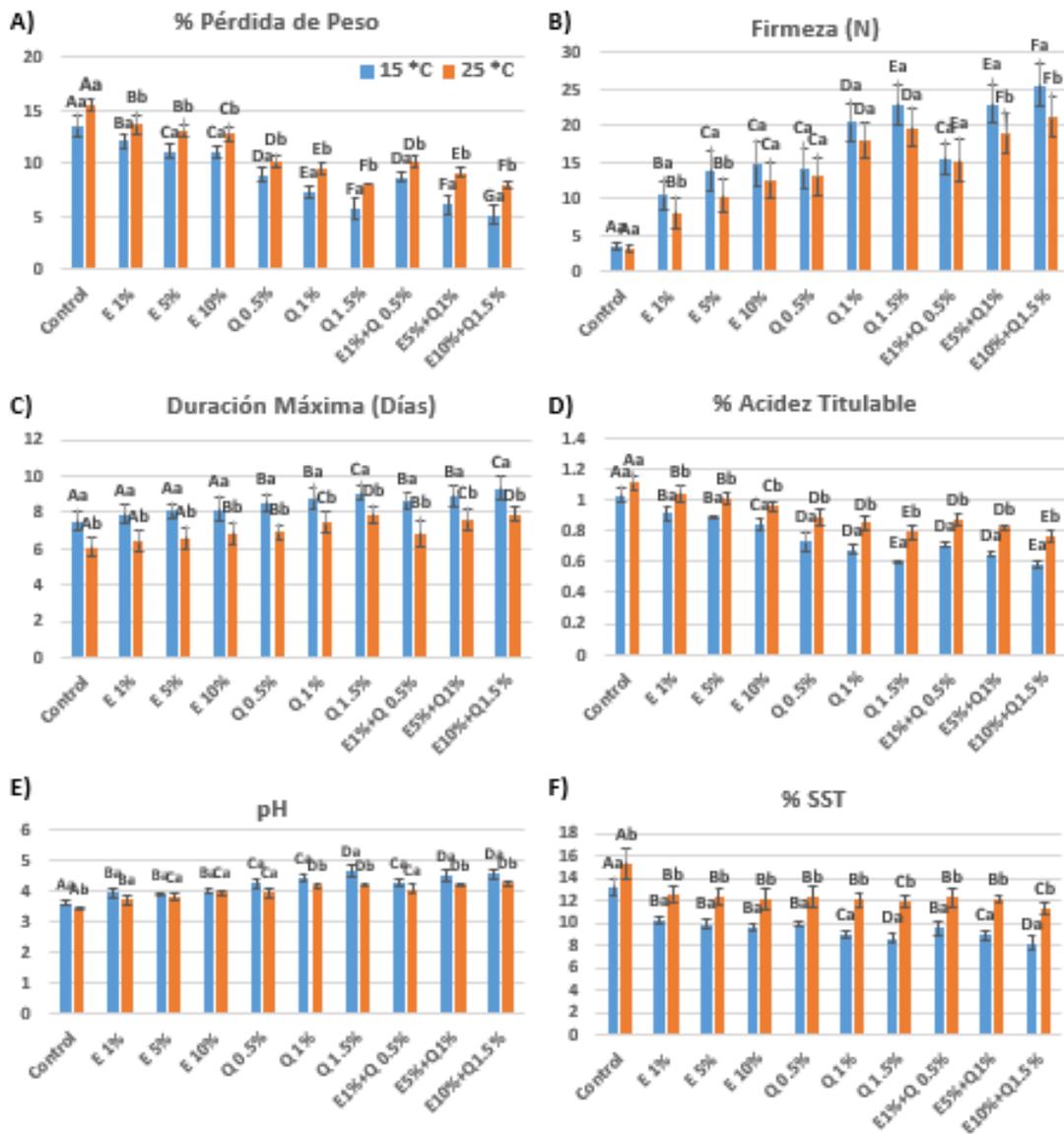


Figura 15. Parámetros de calidad de frutos de guanábana tratados con los diferentes tratamientos almacenados a 25 °C (6 días de almacenamiento) y 15 °C (8 días de almacenamiento). E=Extracto acuoso, Q= Quitosano. Letras mayúsculas comparativa entre temperaturas, letras minúsculas comparativa entre tratamientos. Medias de diez réplicas  $\pm$  desviación estándar.

con su aplicación a temperatura ambiente ( $12.71 \pm 0.63$  %), aunque el mecanismo de acción de los extractos vegetales sobre la conservación del peso postcosecha no se encuentra totalmente esclarecido, se ha sugerido un posible efecto sobre los procesos de degradación de pectina y conversión del almidón, retrasando la liberación de agua durante la maduración del fruto (Guerreiro *et al.*, 2015; Gupta & Jain, 2012; Tabassum *et al.*, 2018; Synowiec *et al.*, 2014). No obstante, las aplicaciones de quitosano resultaron ser más efectivas en el control de la pérdida

de peso del fruto ( $P < 0.05$ ), mejores resultados se obtuvieron a concentraciones del 1.5% bajo refrigeración ( $5.71 \pm 0.96\%$ ) y a temperatura ambiente ( $8.01 \pm 0.54\%$ ). Ramos-Guerrero *et al.*, 2020 reportó una pérdida de peso similar ( $8.06 \pm 0.05\%$ ) en frutos de guanábana tratados con quitosano (Medio peso molecular) a partir de concentraciones del 0.5% a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Debido a que la pérdida de peso postcosecha está asociada con los valores de presión de vapor de agua entre el interior del fruto y la atmósfera de almacenamiento, se ha sugerido el bloqueo de estomas por acción filmogénica del quitosano como el principal mecanismo responsable en la conservación de la humedad interna en frutos tratados con el biopolímero (Bautista-Baños *et al.*, 2014; Khaliq *et al.*, 2017; Ncama *et al.*, 2018; Romanazzi *et al.*, 2018). No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) sobre la pérdida de peso entre las aplicaciones de quitosano de manera individual y en combinación con el extracto acuoso (Fig. 5-A), sin embargo, frutos tratados con las combinaciones de ambos tratamientos exhibieron una menor pérdida de firmeza al finalizar el periodo de almacenamiento (Fig. 5-B). Todas las concentraciones de extracto y quitosano tuvieron efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre la fuerza de penetración aplicada respecto a los frutos no tratados ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}=3.12\pm 0.53\text{ N}$ ,  $15\text{ }^{\circ}\text{C}=3.51\pm 0.45\text{ N}$ ), mejores resultados se obtuvieron empleando concentraciones altas de manera combinada (Quitosano 1.5%+Extracto 10%) bajo refrigeración ( $25.43\pm 2.95\text{ N}$ ) respecto a sus aplicaciones individuales (Quitosano 1.5%=  $22.80\pm 2.77\text{ N}$ , Extracto 10%=  $14.70\pm 3.06\text{ N}$ ). Anteriormente, se ha reportado una mejora en las propiedades mecánicas y antioxidantes del quitosano al combinarse con extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos (Ferreira *et al.*, 2014; Siripatrawan & Harte, 2010; Woranuch *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014, Zhu & Zhang, 2014), en este sentido, la aplicación de activos naturales y recubrimientos compuestos de manera combinada ha demostrado un mejor espectro de acción sobre los procesos de maduración relacionados con la pérdida de vapor de agua postcosecha, sugiriéndose una mayor disminución en la actividad metabólica a nivel de pared celular y de biosíntesis de etileno ligados con los mecanismos de ablandamiento y senescencia durante el almacenamiento (Khaliq *et al.*, 2019; Ncama *et al.*, 2018; Ramos-Guerrero *et al.*, 2020; Xiao-Jing *et al.*, 2019). Estas modificaciones en la actividad metabólica del fruto pueden estar relacionadas con la prolongación de la vida útil máxima, frutos tratados con las diferentes

concentraciones de quitosano y sus combinaciones con extracto exhibieron un mayor tiempo de almacenamiento (7-9 días) respecto a los frutos no tratados (6-7 días) en ambas temperaturas (Fig. 15-C). Mejores resultados se obtuvieron al aplicar quitosano al 1.5% bajo refrigeración ( $9.08 \pm 0.45$  días), anteriormente, se ha reportado un alargamiento similar en la vida útil del fruto de guanábana (8-9 días) mediante el almacenamiento en frío ( $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y la aplicación de quitosano (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017; Minh *et al.*, 2019; Pareek *et al.*, 2019; Ramos-Guerreros *et al.*, 2020). Esta reducción en la senescencia al aplicar bajas temperaturas ( $>15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se ha relacionado con una reducción en la actividad enzimática de la polifenol oxidasa y la pectín metil esterasa en frutos de guanábana durante su almacenamiento postcosecha (Berumen-Varela *et al.*, 2019; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2006; Moreno-Hernandez *et al.*, 2014), de igual forma, se ha demostrado la capacidad del quitosano para alargar el periodo de almacenamiento en frutos tropicales mediante la creación de atmósferas modificadas capaces de reducir o ralentizar el metabolismo del etileno durante la postcosecha (González-Estrada *et al.*, 2019; Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018; Ramos-Guerrero *et al.*, 2020; Romanazzi *et al.*, 2016; Romanazzi *et al.*, 2018). La aplicación de extracto de manera individual no demostró diferencias significativas en la vida útil máxima del fruto ( $P > 0.05$ ) en ambas temperaturas de almacenamiento, sin embargo, la aplicación de concentraciones altas (10%) a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  demostró un efecto significativo ( $P < 0.05$ ) sobre los parámetros fisicoquímicos del fruto (Acidez=  $0.84 \pm 0.03\%$ , SST= $9.68 \pm 0.33\%$ , pH= $4.01 \pm 0.07$ ) en comparación con los frutos no tratados (Acidez=  $1.03 \pm 0.05\%$ , SST= $13.24 \pm 0.77\%$ , pH= $3.63 \pm 0.06$ ). Anteriormente, se ha reportado una mejora similar sobre los parámetros fisicoquímicos de algunos frutos en postcosecha tratados con diferentes tipos de extractos vegetales (Das *et al.*, 2013; Ncama *et al.*, 2018; Tabassum *et al.*, 2018; Tesfay & Magwaza, 2017). Una mejor conservación en los parámetros fisicoquímicos se observó al aplicar quitosano (1.5%) bajo refrigeración (Acidez=  $0.60 \pm 0.01\%$ , SST= $8.67 \pm 0.47\%$ , pH= $4.64 \pm 0.19$ ), estos resultados concuerdan con lo reportado por Ramos-Guerrero *et al.*, 2020, quienes sugieren la capacidad del polímero para reducir los procesos de maduración del fruto mediante la alteración de los procesos de producción y maduración de etileno, estas modificaciones pueden estar vinculadas con la disminución de los procesos de hidrólisis de almidón y la actividad de ciertas

enzimas como la  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas, y la producción de moléculas orgánicas relacionadas con un aumento en la acidez y el pH del fruto durante su maduración (Feliziani *et al.*, 2015; Moreno-Hernández *et al.*, 2014; Romanazzi *et al.*, 2016). No se observaron diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos mediante la aplicación individual del quitosano y en combinación con el extracto ( $P > 0.05$ ). Frutos almacenados a 15 °C presentaron una mejor conservación del color ( $L^*C^*h^*$ ) en cascara, en comparación con frutos almacenados a 25 °C al llegar al estado de madurez de consumo (Tabla 8).

Tabla 8. Cambios en color ( $L^*C^*h^*$ ) de frutos de guanábana tratados con los diferentes tratamientos durante su almacenamiento a 15 °C y 25 °C.

| Tratamiento         | $\Delta L^*$            |                         | $\Delta C^*$            |                         | $\Delta h^*$            |                         |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                     | 15 °C                   | 25 °C                   | 15 °C                   | 25 °C                   | 15 °C                   | 25 °C                   |
| Control             | 2.95±0.21 <sup>Aa</sup> | 3.92±0.38 <sup>Ba</sup> | 2.29±0.41 <sup>Aa</sup> | 2.94±0.32 <sup>Ba</sup> | 4.71±0.35 <sup>Aa</sup> | 4.84±0.28 <sup>Aa</sup> |
| EAC 1%              | 2.86±0.33 <sup>Aa</sup> | 3.26±0.52 <sup>Ab</sup> | 2.23±0.26 <sup>Aa</sup> | 2.71±0.25 <sup>Ba</sup> | 4.57±0.37 <sup>Aa</sup> | 4.59±0.14 <sup>Aa</sup> |
| EAC 5%              | 2.78±0.23 <sup>Aa</sup> | 3.17±0.45 <sup>Ab</sup> | 2.13±0.27 <sup>Aa</sup> | 2.78±0.36 <sup>Ba</sup> | 4.38±0.32 <sup>Aa</sup> | 4.55±0.39 <sup>Aa</sup> |
| EAC 10%             | 2.41±0.25 <sup>Ab</sup> | 3.15±0.53 <sup>Bb</sup> | 2.02±0.37 <sup>Aa</sup> | 2.56±0.29 <sup>Aa</sup> | 4.14±0.28 <sup>Ab</sup> | 4.49±0.39 <sup>Aa</sup> |
| QC 0.5%             | 2.5±0.24 <sup>Ab</sup>  | 2.92±0.42 <sup>Ab</sup> | 1.94±0.26 <sup>Aa</sup> | 2.30±0.4 <sup>Ab</sup>  | 3.97±0.19 <sup>Ab</sup> | 4.38±0.22 <sup>Bb</sup> |
| QC 1%               | 2.19±0.23 <sup>Ac</sup> | 2.85±0.38 <sup>Bc</sup> | 1.93±0.35 <sup>Aa</sup> | 2.19±0.43 <sup>Ab</sup> | 3.71±0.21 <sup>Ac</sup> | 4.25±0.31 <sup>Bb</sup> |
| QC 1.5%             | 1.90±0.23 <sup>Ac</sup> | 1.93±0.52 <sup>Ad</sup> | 1.51±0.3 <sup>Ab</sup>  | 1.98±0.46 <sup>Ab</sup> | 3.51±0.38 <sup>Ac</sup> | 4.1±0.28 <sup>Bb</sup>  |
| EAC 1%+<br>QC 0.5%  | 2.34±0.26 <sup>Ab</sup> | 2.83±0.53 <sup>Ab</sup> | 2.05±0.28 <sup>Aa</sup> | 2.17±0.25 <sup>Ab</sup> | 3.81±0.18 <sup>Ab</sup> | 4.34±0.34 <sup>Bc</sup> |
| EAC 5%<br>+ QC 1%   | 2.27±0.19 <sup>Ac</sup> | 2.5±0.34 <sup>Ac</sup>  | 1.71±0.21 <sup>Ab</sup> | 1.83±0.37 <sup>Aa</sup> | 3.69±0.29 <sup>Ac</sup> | 4.16±0.24 <sup>Bc</sup> |
| EAC 10%+<br>QC 1.5% | 1.52±0.36 <sup>Ad</sup> | 1.58±0.55 <sup>Ad</sup> | 1.41±0.38 <sup>Ab</sup> | 1.54±0.25 <sup>Ac</sup> | 3.37±0.37 <sup>Ac</sup> | 3.7±0.23 <sup>Ad</sup>  |

Aunque la temperatura de almacenamiento puede modificar la actividad enzimática asociada con el pardeamiento del fruto (Oey *et al.*, 2008), las bajas temperaturas solo pueden reducir el ritmo de oscurecimiento de la cáscara y la pulpa de manera natural (Tran *et al.*, 2020). En este sentido, la aplicación de QC al 1.5% de manera

individual y en combinación con EAC al 10% redujo en mayor medida los cambios en la luminosidad ( $\Delta L^*$ ), cromaticidad ( $\Delta C^*$ ) y ángulo de matiz ( $\Delta h^*$ ) de la cáscara del fruto a temperaturas de 15 °C posterior a 8 días de almacenamiento. Anteriormente, se ha reportado que la aplicación de recubrimientos de mucilago de roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sobre frutos de guanábana puede reducir los cambios de color del fruto de manera significativa tras el almacenamiento, esta conservación en el color postcosecha al aplicar recubrimientos puede indicar una menor degradación de la clorofila y carotenoides presentes en cáscara, relacionados con una menor actividad enzimática de la polifenol oxidasa y peroxidasa (Badrie & Schauss, 2010; Castro *et al.*, 2008). En este sentido, Ramos-Guerrero en 2018 sugiere que la aplicación de recubrimientos de quitosano a partir de concentraciones del 1% de manera individual y en combinación con otros activos naturales pueden generar una mayor reducción en la actividad enzimática de la polifenol oxidasa y peroxidasa del fruto de guanábana durante su almacenamiento postcosecha reduciendo los cambios en color durante la maduración. La aplicación de quitosano y extracto acuoso no alteraron de manera negativa los parámetros fisicoquímicos de calidad durante el almacenamiento postcosecha del fruto de guanábana.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.

1. La combinación de los tratamientos (Extracto acuoso+Quitosano) produce un mayor efecto negativo/inhibitorio sobre el desarrollo micelial, esporulación y germinación de esporas de *R. stolonifer* que mediante la aplicación individual de los mismos.
2. Las concentraciones más altas de cada tratamiento y su combinación tienen un mayor efecto en la modificación de los parámetros cinéticos de crecimiento  $V_{max}$  y  $\lambda$  en *R. stolonifer*.
3. Todos los tratamientos producen un efecto fungistático sobre *R. stolonifer* y las combinaciones de los tratamientos muestran un comportamiento sinérgico de manera *in vitro*.
4. Las concentraciones más altas de cada tratamiento y sus combinaciones tienen un mayor efecto control sobre la severidad e incidencia de infección por *R. stolonifer* sobre frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) almacenados a 15 °C y 25 °C.
5. Los tratamientos a base de quitosano tienen un mejor efecto sobre la conservación de los parámetros de calidad en frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) almacenados a 15 °C y 25 °C.

### CONCLUSION GENERAL

El tratamiento de la fruta de guanábana con combinaciones de extracto acuoso de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera* L.) y quitosano comercial puede reducir el proceso de infección por *R. stolonifer* sin causar alteraciones en la fisiología y calidad del fruto durante su almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C) y de refrigeración (15 °C).

## CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.

1. A.O.A.C. (2000). Official Method of Analysis of the Association of Agricultural Chemist. 14th Edition. Washington D.C.
2. Aguilar C.N., Rodríguez R., Gutiérrez-Sánchez G., Augur C., Favela-Torres E., Prado-Barragán L.A., Ramírez-Coronel A. & Contreras-Esquivel J.C. (2007). Microbial tannases: Advances and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol 76. pp:47-59.
3. Aguilar-Méndez M.A., Campos-Arias M.P., Quiroz-Reyes C.N., Ronquillo-de Jesús E. & Cruz-Hernández M.A. (2019). Fruit peels as sources of bioactive compounds with antioxidant antimicrobial properties. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCUYO. Vol. 50. pp:1-12.
4. Andrade P.J.M., Aparecida S.E. & Ferreira O.D. (2010). Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. Crop Protection. Vol. 29. pp: 838-842.
5. Andrades I., Yender F., Labarca J., Ulacio D., Paredes C. & Marin Y. (2009). Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum sp.*) en guanábana (*Annona muricata L.*) tipo Gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela. Revista UDO Agrícola. Vol. 9. pp:148-157.
6. Anjala A.K. (2017). Ravages, reasons and solutions for unintentional poisonings of agrochemicals: a review. Imperial Journal of Interdisciplinary Research. Vol. 3. pp: 936-938.
7. Ayala-Zavala J., Soto-Valdez H., González-León A., Álvarez-Parrilla E., Martín-Belloso O. & González-Aguilar G. (2008). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in -cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. Vol. 60. pp: 359–368.
8. Aytakin A. O., Morimura S. & Kida, K. (2011). Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 111. pp: 212–216.
9. Badawy M. & Rabea I. (2016). Chitosan and its derivatives as active ingredients against plant pests and diseases en (eds) S. Bautista-Baños, G.

- Romanazzi & A. Jiménez-Aparicio *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. pp:179–219. Amsterdam: Elsevier.
10. Badrie N. & Schauss A. (2010). Soursop (*Annona muricata* L.): composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology en (Eds) Watson R.R. & Preeedy V.R., *Bioactive food in promoting health: fruits and vegetables*. Oxford: Elsevier Inc. pp: 621-643.
  11. Bajic M., Rocnik T., Oberlintner A., Scognamiglio F., Novak U. & Likozar B. (2019). Natural plant extracts as active components in chitosan-based films: A comparative study. *Food Packaging and Shelf Life*. Vol 21. pp: 1-8.
  12. Bashir L. U., Abdulkadir A., Shah M. M., Hamisu A., Sharif U. & Kamaly A. A. (2020). Phytochemical screening and antifungal potentials of *Citrus limon* peels against *Fusarium oxysporum* and *Rhizopus stolonifer* causing rots in water melon (*Citrullus lanatus* L.). *Journal of experimental sciences*. Vol. 11. pp: 17-21.
  13. Balouiri M., Sadiki M. & Ibsouda S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol. 6. pp: 71–79.
  14. Bautista-Baños S., Bosquez-Molina E. & Barrera-Necha L. L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot) en (Eds) Bautista-Baños S., *Postharvest Decay*. pp: 1-44. San Diego: Academic Press.
  15. Bautista-Baños S., García-Domínguez E., Barrera-Necha L.L., Reyes-Chilpa R. & Wilson C.L. (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 Biology and Technology*. Vol.29, pp:81–92.
  16. Bautista-Baños S., Hernández-López M., Díaz-Pérez J.C. & Cano-Ochoa C.F. (2000). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of 'ciruela' fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 20. pp: 99–106.
  17. Bautista-Baños S., Velaquez-Del Valle M.G., Hernández-Lauzardo A.N. & Essaïd-Ait B. (2008). The *Rhizopus stolonifer*:Tomato interaction en (Eds) Barka E.A. & Clément C., *Plant-microbe interactions*. pp: 269-289. Thiruananthapuram: Research Signpost.

18. Bhagwat M. K. & Datar A. G. (2014). Antifungal activity of herbal extracts against plant pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. Vol. 47. pp: 959-965.
19. Blancas-Benitez F.J., Pérez-Jiménez J., Montalvo-González E., González-Aguilar G.A & Sáyago-Ayerdi S.G. (2018). *In vitro* evaluation of the kinetics of the release of phenolic compounds from guava (*Psidium Guajava L.*) fruit. *Journal of Functional Foods*. Vol. 43. pp:139–145.
20. Berumen-Varela G., Hernández-Oñate M.A. & Tiznado-Hernández M.E. (2019). Utilization of biotechnological tools in soursop (*Annona muricata L.*). *Scientia Horticulturae*. Vol. 245. pp:269-273.
21. Berumen-Varela G., Palomino-Hermosillo Y.A., Bautista-Rosales P.U., Peña-Sandoval G.R., López-Gúzman G.G. & Balois-Morales R. (2020). Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in different developmental stages and under refrigeration conditions in soursop fruits (*Annona muricata L.*). *Scientia Horticulturae*. Vol. 260. pp:1-6.
22. Bonilla J. & Sobral P.J.A. (2016). Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience*. Vol. 16. pp:17-25.
23. Cambero-Ayón C.B., Luna-Esquivel G., Rios-Velasco C., Díaz-Heredia M., Rodríguez-Palomera M., Betancourt-Aranguré A. & Cambero-Campos O.J, (2019). Causal agents of rot in soursop fruit (*Annona muricata L.*) in Nayarit, México. *Revista BioCiencias*. Vol. 6. pp:3-11.
24. Castillo F., Hernández D., Gallegos G., Rodríguez R. & Aguilar C.N. (2012). Antifungal properties of bioactive compounds from plants en (eds) Dhanasekaran D., Thajuddin N., Panneerselvam A., en: *Fungicides for plant and animal diseases*. pp:82-106. London: IntechOpen.
25. Ceballos A.M., Giraldo G.A. & Orrego C.E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering*. Vol. 111. pp:360-365.
26. Cerqueira M.D., Barcellos H., Machado P., Aires J. & Dummer D. (2016). Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol.1. pp:26-31.

27. Chen G.C. & Johnson B.R. (1983). Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wood decay fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 46. pp:13-16.
28. Cherkupally R., Srinivasa R.K., Hindumathi A. & Bhumi N.R. (2017). *In vitro* antifungal potential of plant extracts against *Fusarium Oxysporum*, *Rhizoctonia Solani* and *Macrophomina Phaseolina*. *Annals of Plants Science*. Vol. 54. pp:1676-1680.
29. Combrinck S., Regnier T & Kamatou G.P.P. (2011). *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops & Products*. Vol. 9. pp: 344–349.
30. Cortés-Rivera, H.J. (2019). Extracción e identificación de compuestos bioactivos presentes en residuos de coco (*C. nucifera*) mesocarpio y exocarpio, y su potencial antifúngico. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tepic. Tepic, Nayarit, México. pp:1-47.
31. Cortés-Rivera H.J., Blancas-Benítez F.J., Romero-Islas L.C., Gutiérrez-Martinez P. & González-Estrada R.R. (2019). *In vitro* evaluation of residues of coconut (*Cocos nucifera* L.) aqueous extracts, against the fungus *Penicillium italicum*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. Vol. 31. pp: 613-617.
32. Das E.K., Dutta H. & Mahanta L.H. (2013). Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. *Food Science and Technology*. Vol. 50. pp:272-278.
33. Delmondes P.H. & Stefani R. (2016). Computational Study of Natural Phenolic Acid Solubility and Their Interactions with Chitosan. *MOL2NET*. Vol. 2. pp:1-13. URL: <http://sciforum.net/conference/mol2net-02>.
34. De los Santos-Santos M.A., Balois-Morales R., Jiménez-Zurita J.O., Alia-Tejacal, I., López-Guzmán G.G., Palomino-Hermosillo Y.A. & García-Paredes J.D. (2020). Edible Coating Based on Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Mucilage Applied to Soursop Fruits in Postharvest Storage. *Journal of Food Quality*. Vol. 2020. pp: 1-12.

35. Dey G., Chakraborty M. & Mitra A. (2005). Profiling C6-C3 and C6-C1 phenolic Metabolites in *Cocos Nucifera*. *Journal of Plant Physiology*. Vol.4. pp:375–381.
36. El-Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I. & Daayf F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*. Vol. 8. pp: 968–987.
37. Elshoky H.A., Salaheldin T.A., Ali M.A. & Gaber M.H. (2018). Ascorbic acid prevents cellular uptake and improves biocompatibility of chitosan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 115. pp: 358-366.
38. Fang Z. & Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 21. pp: 510–523.
39. Feliziani E., Landi L. & Romanazzi G. (2015). Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 132. pp:111-117.
40. Feliziani E., Romanazzi G., Margosan D.A., Mansour M.F., Smilanick J.L., Gu S., Gohil H.L. & Rubio-Ames Z. (2013a). Preharvest fungicide, potassium sorbate, or chitosan use on quality and storage decay of table grapes. *Plant Disease*. Vol. 97. pp:307–314.
41. Feliziani E., Santini M., Landi L. & Romanazzi G. (2013b). Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*. Vol.78. pp: 133–138.
42. Ferreira A.S., Nunes C., Castro A. & Ferreira P. (2014). Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 113. pp:490-499.
43. Fiore A., Cigic B. & Verardo V. (2019). Bioactive Compounds from Food Byproducts. *Journal of Food Quality*. Vol. 2019. Pp: 1-2.
44. González-Estrada R.R., Ascencio-Valle F.J., Ragazzo-Sánchez J.A. & Calderón-Santoyo M. (2017). Use of a marine yeast as a biocontrol agent of the novel pathogen *Penicillium citrinum* on Persian lime. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. Vol. 29. pp: 114-122.

45. González-Estrada R., Blancas-Benítez F., Velázquez-Estrada R.M., Montaña-Leyva B., Ramos-Guerrero A., Aguirre-Güitrón L., Moreno-Hernández C., Coronado-Partida L., Herrera-González J.A., Rodríguez-Guzmán C.A., Ángel-Cruz J.A., Rayón-Díaz E., Cortés-Rivera H.J., Santoyo-González M.A. & Gutierrez-Martinez P. (2019). Alternative Eco-Friendly Methods in the Control of Post-Harvest Decay of Tropical and Subtropical Fruits. en (Eds) Ibrahim Kahramanoglu Modern Fruit Industry. pp:1-22. London :IntechOpen.
46. González-Estrada R.R., Vega-Arreguin J., Robles-Villanueva B.A., Velázquez-Estrada R.M., Ramos-Guerrero A. & Gutiérrez-Martinez P. (2020). *In vitro* evaluation of non-conventional chemicals for *Penicillium citrinum* control. Polibotánica. 49: 161-172.
47. Guerra-Sánchez M.G., Sandoval-Escobar L.A., Amora-Lazcano E., Vásquez-Méndez L., Velázquez del Valle M.G. & Hernández-Lauzardo A.N. (2010). Efecto del quitosano en el desarrollo *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. en dos medios de cultivo. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 12. pp: 214-222.
48. Guerreiro A.C., Gago C.M.L., Faleiro M.L., Miguel M.G.C & Antunes M.D.C. (2015). The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. Postharvest Biology and Technology. Vol. 100. pp: 226-233.
49. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L. & Li P. (2008). The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. Carbohydrate Polymers. Vol. 71. pp: 694-697.
50. Gupta N. & Jain S.K. (2012). Storage behavior of mango as affected by post harvest application of plant extracts and storage conditions. Journal of Food Science and Technology. Vol. 51. pp. 2499–2507.
51. Gutiérrez-Martínez P., Bautista-Baños S. & Barrera-Necha L.L. (2013). Uso potencial de extractos vegetales, aceites esenciales y quitosano para reducir el daño causado por hongos postcosecha en productos hortofrutícolas, en (Eds) Ramírez-de León J.A., Uresti-Marín R.M., Aldana M.L., Flavia-Loarca M.G. Avances de ciencia y tecnología alimentaria en México. pp: 559-571. Mexico:Plaza y Valdez.

52. Gutiérrez-Martínez, P., Ledezma-Morales, A., Romero-Islas, L. C., Ramos-Guerrero, A., Romero-Islas, J., Rodríguez-Pereida, C., Casas-Junco, P., Coronado-Partida, L. & González-Estrada, R. R. (2018). Antifungal activity of chitosan against postharvest fungi of tropical and subtropical fruits. En Dongre, R. S. (Ed.) *Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology*. (pp. 311-322) London: IntechOpen.
53. Harshitha M.V., Shruthi-Eshwar, Supriya-Manvi, Sriwastava B.K. & Vipin-Jain. (2018). Antifungal efficacy of water soluble chitosan based denture cleanser an *in vitro* study. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. Vol. 4. pp: 157-160.
54. Hernández-Fuentes L.M., Gómez-Jaimes R. & Andrés-Agustín J. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. pp:1-98. ISBN: 978-607-37-0010-8.
55. Hernández-Lauzardo A.N., Bautista-Baños S., Velázquez-del Valle M.G., Méndez-Montealvo M. G., Sánchez-Rivera M. M. and Bello-Pérez L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 73. pp:541-547.
56. Hernández-Lauzardo A.N., Vega-Perez J., Velazquez-del Valle M.G., Sanchez N., Antonio-Pena & Guerra-Sanchez G. (2011) Changes in the Functionality of Plasma Membrane of *Rhizopus stolonifer* by Addition of Chitosan. *Journal Phytopathology*. Vol. 159. pp:563–568.
57. Jiménez-Zurita J.O., Balois-Morales R., Alia-Tejacal I., Sánchez-Herrera L.M., Jiménez-Ruiz E.I., Bello-Lara J.E., García-Paredes & Juárez-López P. (2017). Cold Storage of Two Selections of Soursop (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Journal of Food Quality*. Vol. 2017. pp:1-9.
58. Karim H., Boubaker H., Askarne L. Cherifi K., Lakhtar H., Msanda F., Boudyach E.H. & Ben-Aoumar A. (2017). Use of Cistus Aqueous Extracts as Botanical Fungicides in the Control of Citrus Sour Rot. *Microbial Pathogenesis*. Vol. 104. pp:263–267.
59. Kaur P. (2016). Shelflife enhancement studies in guava (*Psidium guajava* L.) cv. shweta. Tesis de Maestria. Punjab Agricultural University, Ludhiana. pp:1-

63.

60. Khan S.A. & Singh Z. (2008). 1-Methylcyclopropene application and modified atmospheric packaging affect ethylene biosynthesis, fruit softening and quality of 'Tegan Blue' japanese plum during cold storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 133. pp: 290–299.
61. Khaliq G., Nisa M.U., Ramzan M. & Koondhar N. (2017). Textural properties and enzyme activity of mango (*Mangifera indica* L.) fruit coated with chitosan during storage. *Journal of Agricultural Studies*. Vol. 5. pp: 32-50.
62. Khaliq G., Ramzan M. & Baloch A.H. (2019). Effect of *Aloe vera* gel coating enriched with *Fagonia cretica* plant extract on physicochemical and antioxidant activity of sapodilla fruit during postharvest storage. *Food Chemistry*. Vol. 286. pp:346-353.
63. Konradsen F., van der-Hoek W., Cole D.C., Hutchinson G., Daisley H., Singh S. & Eddleston M. (2003). Reducing acute poisoning in developing countries options for restricting the availability of pesticides. *Journal of Toxicology*. Vol. 192. pp: 249-261.
64. Kore V.T., Tawade S.S. & Kabir J. (2017). Application of edible coatings on fruits and vegetables. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*. Vol. 3. pp: 591-603.
65. Lauriano S.V.G., Fernandoa A.L., Afonso J.R.P., Freitas P.R., Lopesb A.A.S., Braz F.M.F. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*. Vol. 107. pp: 565-572.
66. Lee D.S., Woo J.Y., Ahn, C.B. & Je J.Y. (2014). Chitosan–hydroxycinnamic acid conjugates: Preparation, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Chemistry*. Vol. 148. pp: 97- 104.
67. León-Fernández A.E., Sayago-Ayerdi S.G., Velazquez-Estrada R.M., Zepeda-Vallejo L.G., Yahia E. & Montalvo-González E. (2017). *In vitro* antioxidant capacity of crude extracts and acetogenin fraction of soursop fruit pulp. *Pharmaceutica Analytica Acta*. Vol. 8. pp: 1-7.
68. Lima E.B.C., Sousa C.N.S., Meneses L.N., Ximenes N.C. & Santos-Júnior M.A. (2015). *Cocos nucifera* ( L . ) ( Arecaceae ): A Phytochemical and Pharmacological Review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Vol.11. pp:1–12.

69. Lima M.A., Alves R.E. & Filgueiras H.A. (2006). Mudanças relacionadas ao amaciamento da graviola durante a maturação, ao pos-colheita. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Vol. 41. pp: 1707-1713.
70. Lucàs-Bautista J.A., Bautista-Baños S., Ventura-Aguilar R.I. & Gomez-Ramirez M. (2019). Determination of chitin in postharvest fungi and chitinases in fruit of papaya "Maradol". Mexican Journal of Phytopathology. Vol. 37. pp: 1-7.
71. Manenji B. T., Mudyiwa R. M., Midzi J. & Tsodzo A. (2017). Antifungal effects of botanical leaf extracts of *Lantana camara*, *Moringa oleifera*, and *Tagetes minuta* on *Rhizopus stolonifer* *in vitro*. Journal of Agruculture and Ecology Research International. Vol. 11. Pp: 1-8.
72. Martinez, G., Regente M., Jacobi S., Del Rio M., Pinedao M. & de la Canal L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 140. pp:30-35.
73. Martirosyan D. & Miller E. (2018). Bioactive Compounds: The Key to Functional Food. Bioactive Compounds in Health and Disease. Vol. 7. pp. 36-39.
74. Masih H., Peter J. K. & Tripathi P. A. (2014). Comparative evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts and chemical fungicides against four plant pathogens. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Vol. 3. pp:97-109.
75. Medda S., Hajra A., Dey U., Bose P. & Kumar-Mondal N. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloe vera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus sp.* and *Aspergillus sp.* Applied Nanoscience. Vol. 5. pp: 875-880.
76. Minh N.P., Vo T.S., Tram D.N., Nga H.N., Bang N.T. & Trinh M.T.D. (2019). Application of chitosan edible coating for soursop (*Annona muricata*) storage. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. Vol. 11. pp: 284-288.
77. Mishra S., Ahmad S., Kumar N. & Sharma B.K. (2013), *Annona muricata* (the cancer killer): A review. Global Journal Pharmacy. Vol. 2. pp:1613–1618.
78. Mohamed, Mahmoud S.M., Ahmed M.S., Ibrahim B., Abdel-Farid & El-naggar S.A. (2016). Growth, Hydrolases and Ultrastructure of *Fusarium Oxysporum* as Affected by Phenolic Rich Extracts from Several Xerophytic Plants.

Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 141. pp: 57-64.

79. Moreno-Hernandez C.L., Sáyago-Ayerdi S.G., García-Galindo H.S., Mata-Montes De Oca M. & Montalvo-González E. (2014). Effect of the Application of 1-Methylcyclopropene and Wax Emulsions on Proximate Analysis and Some Antioxidants of Soursop (*Annona muricata* L.). The Scientific World Journal. Vol. 2014. pp:1-7.
80. Muhammad M., Rania E. M., Garry K., Maher Z.E., Murat K., Jalel L. & Khalid M.K. (2018). Current advancements in chitosan-based film production for food technology: A review. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 121. pp: 889-904.
81. Nasrin T.A.A., Islam M.N., Rahman M.A., Arfin M.S. & Ullah M.A. (2018). Evaluation of postharvest quality of edible coated mandarin at ambient storage. International Journal of Agricultural Research Innovation & Technology. Vol. 8. pp:18-25.
82. Ncama K., Magwaza L.S., Mditshwa A. & Tesfay S.Z. (2018). Plant-Based edible coatings for managing postharvest quality of fresh horticultural produce: A review. Food Packaging and Shelf Life. Vol. 16. pp:157-167.
83. Niaounakis M. (2015). Chapter 12 - Manufacture of Biocomposites. En (Eds) Niaounakis M., Biopolymers: Processing and Products. EEUU: William Andrew Publishing. pp:411-430.
84. Obianom C., Romanazzi G. & Sivakumar D. (2019). Effects of chitosan treatment on avocado postharvest diseases and expression of phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and lipoxygenase genes. Postharvest Biology and Technology. Vol. 147. pp:214-221.
85. Oey I., Lille M., Van Loey A. & Hendrickx M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable based food products: a review. Trends in Food Science and Technology Vol. 19. pp: 320-328.
86. Ochoa-Velasco C.E., Navarro-Cruz A.R., Vera-López O., Palou E. & Avila-Sosa R. (2018). Growth modeling to control (*in vitro*) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 50. pp: 70-74.

87. Omoifo Charles. (2011), *Rhizopus stolonifer* exhibits dimorphism. African Journal of Biotechnology. Vol. 10. Pp : 4269-4275.
88. Ornelas-Paz J.J., Yahia E.M., Gardea-Béjar A.A., Pérez-Martínez J.D., Ibarra-Junquera V., Escalante-Minakata M.P., Ruiz-Cruz S. & Ochoa-Reyes. (2012). Actividad antioxidante y protectora de selectos compuestos bioactivos de frutas y hortalizas. En (Eds) Alvarez E.P., de la Rosa L.A., Aguilar G.A.G. & Ayala F.Z., Antioxidantes en alimentos y salud. D.F.: Editorial Clave. pp: 98-132.
89. Pintos B., Martín-Calvarro L., Piñón D., Esteban A., Tello M. L., Pérez-Urria E. & Gómez-Garay A. (2018). Antifungal effects of phenolic extract from industrial residues of *Aloe vera*. Spanish Journal of Agricultural Research. Vol. 16. pp: 1-8.
90. Pitt J.I. & Hocking A.D. (2009). Zygomycetes. en (Eds) Pitt J.I. & Hocking A.D., Fungi and Food Spoilage. Berlín:Springer. pp:145-168.
91. Qin Y., Li P. & Guo Z. (2020). Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: A review of structural optimization and applications. Carbohydrate Polymers. Vol. 236. pp: 1-17.
92. Ramos-Guerrero A., González-Estrada R. R., Hanako-Rosas G., Bautista-Baños S., Acevedo-Hernández G., Tiznado-Hernández M. E. & Gutiérrez-Martínez P. (2018a). Use of inductors in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: in vitro test. Food Science and Biotechnology. Vol. 27. pp: 755–763.
93. Ramos-Guerrero A., González-Estrada R.R., Montalvo-González E., MiMiranda-Castro S.P. & Gutiérrez-Martínez P. (2018b). Effect of the application of inducers on soursop fruit (*Annona muricata L.*): postharvest disease control, physiological behaviour and activation of defense systems. Emirates Journal of Food and Agriculture. Vol. 30. pp: 1019-1025.
94. Ramos-Guerrero A., González-Estrada R.R., Romanazzi G., Landi L. & Gutiérrez-Martínez P. (2020). Effects of chitosan in the control of postharvest anthracnose of soursop (*Annona muricata*) fruit. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 19. pp: 99-108.
95. Reyes-Montero J., Aceves-Navarro E., Caamal-Velázquez J.H. & Alamilla-Magaña J.C. (2018). Soursop (*Annona muricata L.*) production in high density

- planting as alternative for producers with reduced surfaces. *Agroproductividad*. Vol. 11. pp: 37-42.
96. Ribeiro-da Silva L.M., Teixeira-de Figueiredo E.A., Silva-Ricardo N.M.P, Pinto-Vieira I.G., Wilane-de Figueiredo R., Montenegro-Brasil I. & Gomez C.L. (2013). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. Vol. 143. pp. 398-404.
97. Rodríguez-Guzmán C.A., González-Estrada R.R., Bautista-Baños S. & Gutierrez-Martínez P. (2019). Efecto del quitosano en el control de *Alternaria* sp. en plantas de jitomate en invernadero. *TIP Revista Especializada en Químico-Biológicas*. Vol. 22. pp: 1-7.
98. Rodríguez-Pereida, C. (2018). Evaluación de un producto fungicida no contaminante para prevenir el deterioro fúngico en frutos tropicales en postcosecha. Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic. Tepic, Nayarit, México. pp:1-88.
99. Rodríguez-Pérez S., Crescencia-Arone M.A., Soria-Calzadillo J., Aguilera-Rodríguez I.A. & Serrat-Díaz M.J. (2017). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *Revista de química teórica y aplicada*. Vol. 74. pp. 60-67.
100. Romanazzi G., Feliziani E., Santini M. & Landi L. (2013). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* Vol. 75. pp: 24–27.
101. Romanazzi G., Sanzani S.M., Bi Y., Tian S., Gutierrez-Martinez P. & Alkan N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology Technology*. Vol. 122. pp:82–94.
102. Romanazzi G., Feliziani E. & Sivakumar D. (2018) Chitosan, a Biopolymer With Triple Action on Postharvest Decay of Fruit and Vegetables: Eliciting, Antimicrobial and Film-Forming Properties. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 9. pp:27-45.
103. Sabaghi M., Maghsoudlou Y., Khomeiri M. & Ziaifar A.M. (2015). Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 110. pp: 224-228.

104. Sadiq S. & Hashmi M.S. (2020). Chitosan–aloe vera gel coating delays postharvest decay of mango fruit. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. Vol. 61. pp:279–289.
105. Sardella D., Gatt R. & Valdramidis V.P. (2018). Modelling the growth of pear postharvest fungal isolates at different temperatures. *Food Microbiology*. Vol. 76. pp:450-456.
106. Sekhotha M.M., Monyeki K.D. & Sibuyi M.E. (2015). Exposure to agrochemicals and cardiovascular disease: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 13. pp: 1-12.
107. Šernaitė Lina. (2018). Plant Extracts : Antimicrobial and Antifungal Activity and Appliance in Plant Protection ( Review ). Scientific works of the institute of horticulture. *Sodininkystė ir Darzininkystė*. Vol. 36. pp: 58-68.
108. Shreya M., Amita H., Uttiya D., Paulomi B. & Naba K. M., (2015) Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus sp.* and *Aspergillus sp.* *Applied Nanoscience*. Vol. 5. pp: 875-880.
109. SIAP. (2018). Anuario Estadístico de la producción Agrícola, Producción Nacional y Estatal de Guanábana. URL: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/2018>. Consultado: 03 de Noviembre de 2019.
110. Singh J., Bhatnagar S.K. & Tomar A. (2019). Study on fungicidal effect of plant extracts on plant pathogenic fungi and the economy of extract preparation and efficacy in comparison to synthetic/chemical fungicides. *Journal of Applied and Natural Science*. Vol. 11. pp: 333-337.
111. Siripatrawan U. & Harte B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. Vol. 24. pp: 770–775.
112. Suwanamornlert P., Sangchote S., Chinsirikul W., Sane A. & Chonhenchob V. (2018). Antifungal activity of plant-derived compounds and their synergism against major postharvest pathogens of longan fruit *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol.271. pp:8-14.
113. Synowiec A., Gniewosz M., Kraśniewska K., Przybył J.L., Bączek, K. & Węglarz, Z. (2014). Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film

- containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23, 171–181.
114. Tabassum P., Ahmed S., Uddin K., Siddiqua M. & Sultana S., (2018). Effect of guava leaf and lemon extracts on postharvest quality and shelf life of banana cv . S abri (*Musa sapientum L.*). *Journal of Bangladesh Agricultural University*. Vol. 16. pp:337–342.
115. Talón E., Trifkovic T.K., Nedovic V.A., Bugarski B.M., Vargas M., Chiralt A. & González-Martínez C. (2017). Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 157. pp: 1153-1161.
116. Tegegne G., Pretorius J.C. & Swart W.J. (2008). Antifungal properties of *Agapanthus africanus L.* extracts against plant pathogens. *Crop Protection*. Vol. 27. pp: 1052-1065.
117. Tesfay S.Z. & Magwaza L.S. (2017). Evaluating the efficacy of moringa leaf extract, chitosan and carboxymethyl cellulose as edible coatings for enhancing quality and extending postharvest life of avocado (*Persea americana Mill.*) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*. Vol. 11. pp: 40-48.
118. Tijjani A., Usman G.U., Gurama A.U., Babura S.R., Aliyu M. & Adamu A.D. (2019). Fungicidal activity of crude extracts from some indigenous medicinal plants against *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer* causing wet rot disease on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. Vol. 12. pp: 12-18.
119. Tran N.Y.T., Nhan N.P.T., Thanh V.T., Chinh N.D., Tri D.L., Nguyen D.V., Vy T.A., True T.T. & Thinh P.V. (2020). Effect of storage condition on color, vitamin C content, polyphenol content and antioxidant activity in fresh soursop pulp (*Annona muricata L.*). *Materials Science and Engineering*. Vol. 736. pp: 1-6.
120. Valenzuela C., Tapia C., López L., Bunger A., Escalona V. & Abugoch L. (2015). Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 18. pp: 1-6.

121. Vasconcelos C.E.O., Magnani M., de Sales C.V., Sousa A.L.P., Campos-Takaki G.M., Montenegro T.C.S. & de Souza E.L. (2014). Effects of post-harvest treatment using chitosan from *Mucor circinelloides* on fungal pathogenicity and quality of table grapes during storage. *Food Microbiology*. Vol. 44. pp: 211-219.
122. Velázquez-del Valle M.G., Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo N.H., Guerra-Sánchez M.G. & Amora-Lazcano E. (2008). Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 26. pp: 13-34.
123. Veldhuizen E.J.A., Tjeerdsma-Van Bokhoven J.L.M., Zweijtzer C., Burt S.A. & Haagsman H. (2006). Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54. pp: 1874-1879.
124. Verma V., Bhardwaj A., Rathi S. & Raja R.B. (2012). A potential antimicrobial agent from *Cocos nucifera* mesocarp extract; development of a new Generation Antibiotic. *ISCA Journal of Biological Sciences*. Vol. 2. pp: 48-54.
125. Vidhyasekaran P. (2006). Evasion and detoxification of secondary metabolites. En (Eds) Vidhyasekaran P., *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops*. Florida:Taylor & Francis Group. pp: 395-455.
126. Vilaplana R., Guerrero K., Guevara J. & Valencia-Chamorro S. (2020). Chitosan coatings to control soft mold on fresh blackberries (*Rubus glaucus* Benth.) during postharvest period. *Scientia Horticulturae*. Vol. 262. pp:1-6.
127. Virgen-Ceceña L.J., Anaya-Esparza L.M., Coria-Téllez A.V., García-Magaña M.L. & García-Galindo S. (2013). Evaluation of nutritional characteristics and bioactive compounds of soursop yoghurt and soursop-frozen dessert. *Food Science and Biotechnology*. Vol. 22. pp: 4-12.
128. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J. & Pérez-Álvarez J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.) mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis*

- L.) essential oils. *Food Control*. Vol. 19. pp:1130-1138.
129. Wang Y., Liu J., Chen F. & Zhao G. (2013). Effects of molecular structure of polyphenols on their noncovalent interactions with oat  $\beta$ -glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol.19. pp: 4533–4538.
130. Wang X., Yong H., Gao L., Li L., Jin M. & Liu J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant and pH-sensitive films based on chitosan and black soybean seed coat extract. *Food Hydrocolloids*. Vol. 89. pp: 56-66.
131. Watrelot A.A., Bourvellec C.L., Imberty A. & Renard C.M.G.C. (2013). Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules*, Vol. 14. pp: 709–718.
132. Wink M. & Schimmer O. (2010). Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. *Annual Plant Reviews*. Vol. 39. pp: 21–161.
133. Wissam Zam. (2019). Effect of Alginate and Chitosan Edible Coating Enriched with Olive Leaves Extract on the Shelf Life of Sweet Cherries (*Prunus avium L.*). *Journal of Food Quality*. Vol. 2019. pp: 1-7.
134. Woranuch S. & Yoksan R. (2013). Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 96. pp: 495-502.
135. Woranuch S., Yoksan R. & Akashi M. (2015). Ferulic acid-coupled chitosan: Thermal stability and utilization as an antioxidant for biodegradable active packaging film. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 115. pp: 744-751.
136. Wu Z., Li H., Ming J. & Zhao G. (2011). Optimization of adsorption of tea polyphenols into oat  $\beta$ -glucan using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 59. pp:378–385.
137. Yang X. & Jiang X. (2015). Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. Vol. 37. pp:1463-1472.
138. Xiao-Jing F., Bin Z., He Y., Jun-Tao F., Zhi-Qing M. & Xing Z. (2019). Effect of lotus leaf extract incorporated composite coating on the postharvest quality of fresh goji (*Lycium barbarum L.*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 148. pp: 132-140.

139. Xie M.H., Hu B., Wang Y. & Zeng, X. (2014). Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 62. pp: 9128–9136.
140. Zaker M. (2016). Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control- a review. *The Agriculturists*. Vol 14. pp: 134-141.
141. Zhang L. & Kosaraju S.L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*. Vol. 43. pp: 2956-2966.
142. Zihao W. & Yanxiang G. (2016). Evaluation of structural and functional properties of chitosan-chlorogenic acid complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 86. pp: 376-382.
143. Zelonkova K., Havadej S., Verebová V., Holeckova B., Ulicny J. & Stanicova J. (2019). Fungicide tebuconazole influences the structure of human serum albumin molecule. *Molecules*. Vol. 24. pp: 1-15.
144. Zorofchian M.S., Fadaeinasab M., Nikzad S., Mohan G., Mohd A.H. & Kadir H.A. (2015). *Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities*. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 16. pp: 15625-15658.

## CAPÍTULO 9. ANEXOS.

### Anexo 1. Artículo publicado: Evaluación de quitosano comercial y extractos acuosos de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera* L.) para el control de *Rhizopus stolonifer* aislado de guanábana (*Annona muricata* L.): Pruebas *in vitro*.

© 2021 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 24: 1-11, 2021.  
<https://doi.org/10.22201/revista.23958723e.2021.0.293>

### Evaluación de quitosano comercial y extractos acuosos de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera* L.) para el control de *Rhizopus stolonifer* aislado de guanábana (*Annona muricata* L.): Pruebas *in vitro*

Héctor Javier Cortés-Rivera<sup>1</sup>, Ramsés Ramón González-Estrada<sup>1</sup>,  
José Ángel Huerta-Ocampo<sup>2</sup>, Francisco Javier Blancas-Benítez<sup>1</sup>  
y Porfirio Gutiérrez-Martínez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Laboratorio de Biotecnología/División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México/L. T. Tepic, Av. Tecnológico #2595, Col. Lagos del Country, Tepic 63175, Nayarit, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Lab. de Bioquímica de Proteínas y Glúcidos, Hermosillo 83304, Sonora, México. E-mail: \*pgutierrez@ittepic.edu.mx

#### RESUMEN

La eficacia antifúngica de los extractos acuosos de mesocarpio de coco (*Cocos nucifera* L.) (EAC) y el quitosano comercial (QC) aplicados de manera individual y en combinación se evaluó contra *Rhizopus stolonifer* en términos de crecimiento micelial, esporulación y germinación de las esporas, así como la obtención de los modelos de crecimiento primario en dos temperaturas de almacenamiento (15-25 °C). La aplicación de los EAC al 10% redujo significativamente el crecimiento micelial de *R. stolonifer* (58.81 ± 6.48%); por otro lado, el QC (1.5%) mostró un efecto de control de hasta un 87%, sin embargo, la combinación de los EAC (10%) con el QC (1.5%) fue más efectiva al reducir el crecimiento micelial (> 93 %). Todos los tratamientos fueron efectivos para disminuir la producción de esporas (> 94 %) en comparación con el control (agar). El QC al combinarse con los EAC fue más efectivo inhibiendo la elongación del tubo germinal (> 98 %) comparado con los tratamientos individuales (< 48 %). El modelo modificado de Gompertz mostró un ajuste adecuado para ambos rangos de temperatura (> 98-99 %) observándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las variables de velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y periodo de latencia ( $\lambda$ ), no obstante, todos los tratamientos mostraron un efecto fungistático sobre el desarrollo micelial de *R. stolonifer*. La combinación de los EAC y el QC puede ser una alternativa eco-amigable contra la pudrición suave de los frutos de guanábana.

**Palabras clave:** biopolímero, mesocarpio, *Cocos nucifera*, fitopatógeno, antifúngico.

#### Evaluation of commercial chitosan and aqueous extracts of coconut shell (*Cocos nucifera* L.) for the control of *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop (*Annona muricata* L.): *In vitro* tests

#### ABSTRACT

The antifungal effectiveness of aqueous extracts of coconut mesocarp (*Cocos nucifera* L.) (AEC) and commercial chitosan (CQ) applied individually and in combination was evaluated against *Rhizopus stolonifer* in terms of mycelial growth, sporulation, spore germination, as well the primary growth models at two storage temperatures (15-25 °C) was obtained. The use of AEC applied individually, significantly reduced the mycelial growth of *R. stolonifer* (> 45 %); on the other hand, CQ (1.5 %) showed up to 87 % of control, however, the combination of AEC (10 %) with CQ (1.5 %) was more effective in reducing mycelial growth (> 93 %). All treatments were effective in inhibiting spore production (> 94 %) compared to control (agar). CQ combined with AEC was more effective by inhibiting the germ tube elongation (> 98 %) compared to the individual treatments (< 48 %). The modified Gompertz model showed an adequate fit for both temperature ranges (> 98-99 %), observing significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the variables maximum speed ( $V_{max}$ ) and latency period ( $\lambda$ ), however all treatments showed a fungistatic effect on the mycelial development of *R. stolonifer*. The combination of AEC and CQ can be an eco-friendly alternative against soft rot in soursop fruits.

**Keywords:** biopolymer, mesocarp, *Cocos nucifera*, phytopathogen, antifungal.

Artículo recibido el 21 de agosto del 2020.

Artículo aceptado el 03 de febrero del 2021.

## INTRODUCCIÓN

**L**a guanábana (*Annona muricata* L.) es uno de los cultivos con mayor importancia en algunas regiones tropicales del planeta (Mishra, Ahmad, Kumar & Sharma, 2013), caracterizada por su pulpa con alto contenido de azúcares y compuestos bioactivos promotores de la salud (Zorofchian *et al.*, 2015). Actualmente, el estado de Nayarit es considerado como el principal productor de guanábana en México, al generar grandes expectativas de crecimiento dentro del sector agrícola (SIAP, 2019), sin embargo, la alta susceptibilidad a infecciones fúngicas ha sido una limitante para su comercialización a nivel nacional e internacional (Berumen-Varela, Hernández-Oñate, Tiznado-Hernández, 2019). *Rhizopus stolonifer* es un hongo filamentoso del orden de los Mucorales identificado como el principal agente causal del deterioro fúngico durante el periodo postcosecha del fruto de guanábana dentro del estado de Nayarit (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018). Este tipo de enfermedades han sido relacionadas con una alta dependencia al uso de fungicidas químicos, representando un grave riesgo para la salud humana y el ambiente (Singh & Sharma, 2018). Debido a lo anterior, se ha buscado el desarrollo de alternativas no contaminantes que permitan el control de estos fitopatógenos y que sean seguras para el consumidor (González-Estrada *et al.*, 2020; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017).

En la última década, el quitosano surgió como una opción potencial para la prevención y el tratamiento de algunas de las principales enfermedades fúngicas asociadas a frutos tropicales (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018). Este polisacárido alcalino con propiedades fungicidas, filmogénicas e inductoras (Romanazzi, Feliziani & Sivakumar, 2018), es obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina presente en algunos hongos y exoesqueletos de crustáceos mediante extracción química o enzimática (Betchem, Nana & Wang, 2019).

Anteriormente, se reportó la aplicación del quitosano grado reactivo con diferentes pesos moleculares ( $1.74 \times 10^4$  -  $3.07 \times 10^4$  Da) para la inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* (30-99 %), destacándose su elevado costo de aplicación y su limitada escalabilidad en campo (Hernández-Laurzado *et al.*, 2008; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018). Aunque no existen suficientes estudios que comparen la actividad antifúngica entre distintos productos y grados de pureza del polímero (Feliziani *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019), sin embargo, la aplicación del quitosano grado comercial ha demostrado ser una alternativa económica y efectiva para la protección de los productos agrícolas en postcosecha (Pagliarulo *et al.*, 2015; Xing *et al.*, 2018). De igual forma, la biocompatibilidad del quitosano con otros antifúngicos naturales, como podrían ser los compuestos bioactivos presentes en algunos extractos vegetales (Bajic *et al.*, 2019; Siripatrawan & Harte, 2010), puede generar un mejor espectro de acción antifúngico mediante la mejora de las propiedades

funcionales del polímero, así como una mayor estabilidad de los compuestos activos incorporados en su matriz polimérica (Nallamuthu, Devi & Khanum, 2015; Singh & Sharma, 2018; Woranuch, Yoksan & Akashi, 2014; Xie, Hu, Wang & Zeng, 2014). El aprovechamiento de los subproductos agrícolas como fuente de compuestos bioactivos con potencial antifúngico puede representar una alternativa sustentable para el control de las principales enfermedades fúngicas en frutos tropicales (Fiore & Cigic, 2019; Ribeiro-da Silva *et al.*, 2014). En este sentido, se han reportado la presencia del ácido clorogénico, flavonoides, alcoholes y otros compuestos orgánicos derivados del metabolismo secundario en plantas y en los extractos acuosos del mesocarpio del coco (*Cocos nucifera* L.) (Aguilar-Méndez, Campos-Arias, Quiroz-Reyes & Ronquillo-de Jesús 2019; Cortés-Rivera, González-Estrada & Blancas-Benitez, 2019a; Dey, Chakraborty & Mitra, 2005). Estos compuestos bioactivos se han asociado ampliamente con la capacidad de inhibir el desarrollo y la proliferación de algunos patógenos fúngicos importantes como *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *P. digitatum* y *R. stolonifer* (Corato, Salimbeni, De Pretis, Avella & Patruno, 2017; Lagrouh, Dakka & Bakri, 2017). En un estudio reciente, se reportó la reducción del desarrollo micelial de *P. italicum* en un 80 %, así como la disminución en la esporulación en un 98 % y la germinación de esporas en un 99 % mediante la aplicación del extracto acuoso del mesocarpio del coco *in vitro* (Cortés-Rivera, Blancas-Benitez, Romero-Islas, Gutiérrez-Martínez & González-Estrada, 2019b). El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto antifúngico del quitosano y los extractos acuosos del mesocarpio de *C. nucifera* aplicados individualmente y en combinación sobre el desarrollo *in vitro* de *R. stolonifer*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

El mesocarpio del coco (*Cocos nucifera* L. var. Criollo) fue adquirido en la ciudad de San Blas, Nayarit, México (21°32'23"N 105°17'08"O) con productores locales; seleccionando muestras con madurez de consumo y sin presencia de daños durante la cosecha. Las muestras se procesaron en polvo fino de acuerdo con el procedimiento descrito por Cortés-Rivera *et al.* (2019a). Se usó quitosano comercial (PM =  $> 3.01 \times 10^4$  Da, cp = 200, 90 % de desacetilación, América Alimentos S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco, México) para los ensayos.

### Preparación del extracto acuoso y soluciones de quitosano

Las extracciones acuosas del mesocarpio se llevaron a cabo mediante el método propuesto por Cortés-Rivera *et al.*, (2019a) con algunas modificaciones, 500 mg de mesocarpio en polvo se añadieron en 25 mL de agua destilada estéril y se mantuvo bajo agitación constante a 300 rpm durante 1 h, el extracto se centrifugó (Hermle Z326 K, EE. UU.) a 6,000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes.

Los extractos obtenidos se filtraron usando un filtro de jeringa estéril (Unidad de filtro Millex-HN; 0,45 µm de diámetro de poro) y las soluciones se almacenaron en tubos estériles a 4 °C. Las soluciones de QC se prepararon en concentraciones de 0,5, 1,0 y 1,5 % (p/v) empleando una solución de vinagre blanco como disolvente y 7% de ácido acético (Member's Mark, México) al 10 % (v/v), las soluciones se sometieron a agitación constante durante 24 h, y el pH se ajustó a 5,6 con una solución de NaOH 1 N, añadiendo 0,1 mL de Tween 80 (Sigma-Aldrich, MO, USA) como tensoactivo. Las interacciones consistieron en mezclas detalladas a continuación: QC 0,5 % + EAC 1 %, QC 1 % + EAC 5 % y QC 1,5 % + EAC 10 %, las soluciones se esterilizaron por separado en autoclave durante (15 min, a 121 °C, 15 PSI) posteriormente se mezclaron usando un vórtice (Vortex Genie 2, Scientific Industries, EE. UU.) hasta obtener una mezcla homogénea.

### Reactivación de *Rhizopus stolonifer*

*R. stolonifer* fue aislado de los tejidos de la guanábana infectados e identificado por ensayo molecular mediante la amplificación de las regiones ARNr 18s y 28s (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018), posteriormente fue reactivado agregando 40 µL de una suspensión de esporas (1x10<sup>6</sup> esporas/mL) en cajas Petri y en un medio enriquecido con guanábana, las cajas fueron incubadas a 25 ± 2 °C durante 8 días, el medio de cultivo se preparó mezclando 24 g de agar bacteriológico (MCD LAB<sup>MR</sup>) con 56 g de cáscara y pulpa de guanábana en madurez de consumo por litro (L) de agua destilada estéril.

### Inhibición del crecimiento micelial

Para la realización de esta prueba se cortaron discos de 10 mm de diámetro de cultivos de *R. stolonifer* con 4 días de desarrollo y se depositaron en cajas de Petri que contenían los tratamientos con diferentes concentraciones de EAC (1, 5, 10 % v/v), QC (0,5, 1,0 y 1,5 % w/v) y las combinaciones (QC 0,5 % + EAC 1 %, QC 1 % + EAC 5 % y QC 1,5 % + EAC 10 %). Las cajas se incubaron a 25 ± 2 °C durante 2 días, las placas control (agar) consistieron solo en agar enriquecido con guanábana. Se empleó un control positivo utilizando un fungicida regional para el tratamiento de la guanábana, Tiabendazol a 300 ppm (MERTECT® 340 F, ADAMA Ltd., México) y un control negativo empleando vinagre al 10 % ajustado a un pH de 5,6 con NaOH 1N. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en comparación con el control (Agar).

### Inhibición de la esporulación

El efecto de los tratamientos en el proceso de esporulación se evaluó usando las cajas de Petri como el medio en donde se midió el crecimiento del micelio, se añadieron 10 mL de agua destilada estéril, y se realizó una ruptura por frotación del micelio usando una varilla de vidrio estéril para liberar las esporas. La suspensión se filtró en una gasa estéril y la concentración de esporas se determinó mediante un recuento

microscópico utilizando un hemocitómetro (Paul Marienfeld GmbH & Co., Alemania). Para cada tratamiento, se realizaron 100 observaciones utilizando un microscopio óptico (Motic Instruments Inc. BA300, Canadá). Los resultados se expresaron como número de esporas/mL.

### Germinación de las esporas

La germinación de las esporas se evaluó depositando 100 µL de una suspensión con las esporas (1x10<sup>5</sup> esporas/mL) en discos de medio de guanábana adicionados con los tratamientos. Las muestras se incubaron a 25 ± 2 °C durante 4 h y se observaron microscópicamente, se analizaron 100 esporas por disco. Las esporas se consideran germinadas cuando el tubo germinal tiene al menos el doble del diámetro de una espora (Ramos-Guerrero *et al.*, 2018). Los resultados se expresaron en porcentajes.

### Modelo de crecimiento

Se modeló el desarrollo radial de *R. stolonifer* sobre los diferentes tratamientos utilizando los rangos de temperatura reportados para el almacenamiento del fruto de guanábana. Se empleó el método descrito por Ochoa-Velasco, Navarro-Cruz, Vera-López, Palou & Avila-Sosa (2017) con algunas modificaciones utilizando cajas Petri en un medio de cultivo de guanábana adicionado con las diferentes concentraciones de los EAC, el QC y sus combinaciones. Las cajas Petri fueron inoculadas en el centro con 100 µL de la suspensión con esporas (1x10<sup>5</sup> esporas/mL) y se almacenaron a temperatura de almacenamiento (25 °C) y de refrigeración a 15 °C. Se tomaron fotografías del crecimiento radial en periodos de 2 horas y las capturas fueron binarizadas y fraccionadas en imágenes de círculos concéntricos de crecimiento progresivo hasta la colonización completa de la caja Petri. La cinética de crecimiento radial fue ajustada con el Software Find Graph (UNIPIZ Lab, 1960, EE. UU.) ajustando las curvas a un modelo modificado de Gompertz mediante la siguiente ecuación:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = A \exp \left( -\exp \left( V_{\max} \frac{t}{A} (\lambda - t) + 1 \right) \right)$$

Donde:

$N_t$  = Crecimiento en el tiempo (t).

$N_0$  = Crecimiento en el tiempo (0).

$V_{\max}$  = Tasa de crecimiento máxima específica.

$A$  = Crecimiento máximo en la fase estacionaria.

$\lambda$  = Duración de la fase de latencia.

Los parámetros del modelo se estimaron mediante un análisis de regresión utilizando el software Statística 10.0 para Windows. El valor del error cuadrático medio (MSE) y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) se usaron para determinar la fiabilidad del ajuste del modelo.

### Análisis estadístico

Se realizó un diseño unifactorial completamente al azar para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizados de EAC, QC y las combinaciones. Para las pruebas de inhibición del crecimiento micelial, modelado de crecimiento y esporulación se utilizaron cinco cajas de Petri y cinco discos de agar en las pruebas de germinación de las esporas. Los experimentos se repitieron dos veces de manera independiente. El ANOVA (análisis de varianza) de los datos se aplicó utilizando el software Statistica versión 10.0 para Windows. Las diferencias entre las medias de los datos se compararon mediante la prueba de Fisher LSD, las diferencias ( $p \leq 0.05$ ) se consideraron significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inhibición del crecimiento micelial

El crecimiento micelial de *R. stolonifer* fue significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) dependiendo del tipo de tratamiento utilizado después de 2 días de incubación (Tabla I). En comparación con el control (agar), todas las concentraciones de los EAC tuvieron un efecto en la reducción del desarrollo micelial de *R. stolonifer* (Figura 1). Se observó un mejor resultado a una concentración del 10 % ( $58.81 \pm 6.48$  % de inhibición). Estudios previos evaluaron la actividad antifúngica, de los extractos acuosos de diferentes subproductos agrícolas (hojas, tallos y semillas), sobre el crecimiento micelial de *R. stolonifer*, reportando una efectividad *in vitro* inferior al 10 % de inhibición (Bautista-Baños, Hernández-López, Díaz-Pérez & Cano-Ochoa, 2000; Medda, Hajra, Dey, Bose & Mondal, 2014), que podría estar relacionada a diferencias en el perfil fitoquímico de

los tejidos utilizados para realizar la extracción (Aqil *et al.*, 2010), sugiriéndose además una mayor susceptibilidad de *R. stolonifer* al interactuar con extractos ricos en compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos, alcoholes y alcaloides (Bhagwat & Datar, 2014; Manenji, Mudyiwa, Midzi & Tsodzo, 2017; Shreya, Hajra, Dey, Bose & Mondal, 2014; Yang & Jiang, 2015). En este sentido, se reportó un alto contenido en ácidos hidroxycinámicos, ácido clorogénico, galocatequina y algunos alcoholes de cadena corta relacionados con la actividad antifúngica en los EAC (Aguilar-Méndez *et al.*, 2019; Cortés-Rivera, 2019a; Dey *et al.*, 2005). Aunque el mecanismo de acción de estas moléculas orgánicas no se encuentra totalmente esclarecido, el potencial antifúngico de estos metabolitos secundarios se ha relacionado con la presencia de anillos aromáticos y grupos reactivos capaces de interactuar con las moléculas polares presentes en la membrana fúngica, produciendo su rápida permeabilización y generando alteraciones a nivel intracelular relacionadas con la inactivación de las enzimas del metabolismo basal y disrupción de la membrana mitocondrial (Cerqueira, Barcellos, Machado, Aires & Dummer, 2015; Martínez *et al.*, 2017; Mohamed, Saleh, Abdel-Farid & El-Naggar, 2016; Masih, Peter & Tripathi, 2014; Zaker, 2016).

No se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el control (Agar) y el control negativo (vinagre 10 %) descartando la actividad antifúngica del vinagre. El QC a concentraciones del 1.5 % mostró mayor inhibición ( $87.77 \pm 3.10$  %). Anteriormente, fue reportada la capacidad del quitosano para interactuar con las membranas fúngicas de

Tabla I. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación de las esporas de *R. stolonifer* expuesto a diferentes tratamientos por 2 días a  $25 \pm 2$  °C.

| Tratamientos        | Inhibición del crecimiento micelial (%) | Esporulación (esporas/mL)     | Inhibición de la germinación (%) |
|---------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|
| Control             | $0.0 \pm 0.0^a$                         | $2.85 \times 10^5 \pm 0.53^a$ | $0.0 \pm 0.0^a$                  |
| Vinagre 10 %        | $0.0 \pm 0.0^a$                         | $2.73 \times 10^5 \pm 0.48^a$ | $0.0 \pm 0.0^a$                  |
| Tiabendazol 300 ppm | $100.0 \pm 0.04^b$                      | $0.0 \pm 0.0^b$               | $100.0 \pm 0.01^b$               |
| EAC 1 %             | $48.32 \pm 6.77^c$                      | $1.4 \times 10^5 \pm 0.97^c$  | $48.5 \pm 6.53^c$                |
| EAC 5 %             | $51.13 \pm 6.48^c$                      | $0.85 \times 10^5 \pm 0.81^c$ | $66.33 \pm 6.12^d$               |
| EAC 10 %            | $58.81 \pm 6.48^d$                      | $0.55 \times 10^5 \pm 0.6^d$  | $70.5 \pm 2.16^e$                |
| QC 0.5 %            | $67.12 \pm 7.45^e$                      | $0.45 \times 10^5 \pm 0.64^d$ | $98.66 \pm 1.75^f$               |
| QC 1 %              | $83.27 \pm 2.90^f$                      | $0.35 \times 10^5 \pm 0.41^e$ | $99.33 \pm 0.81^f$               |
| QC 1.5 %            | $87.77 \pm 3.10^g$                      | $0.2 \times 10^5 \pm 0.25^f$  | $99.66 \pm 0.5^f$                |
| QC 0.5 % + EAC 1 %  | $79.44 \pm 3.32^f$                      | $0.15 \times 10^5 \pm 0.23^f$ | $99.66 \pm 0.51^f$               |
| QC 1 % + EAC 5 %    | $91.10 \pm 1.84^g$                      | $0.1 \times 10^5 \pm 0.21^f$  | $99.83 \pm 0.40^f$               |
| QC 1.5 % + EAC 10 % | $94.68 \pm 2.15^h$                      | $0.05 \times 10^5 \pm 0.15^f$ | $99.83 \pm 0.40^f$               |

Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes con un riesgo del 5%. Promedio de diez réplicas  $\pm$  desviación estándar.

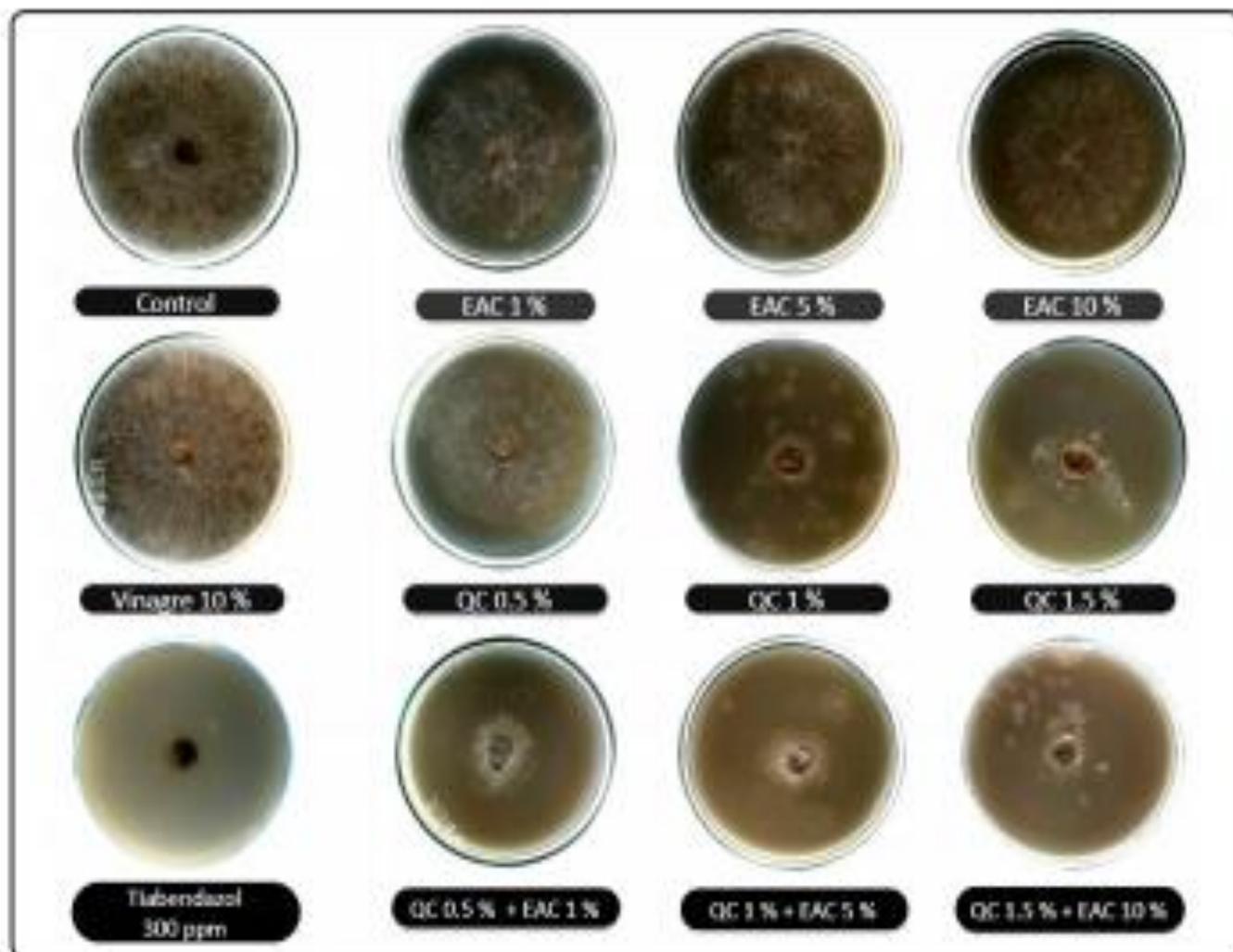


Figura 1. Crecimiento micelial de *R. solonifer* expuesto a diferentes tratamientos durante 2 días a 25 ± 2 °C.

*R. solonifer* produciendo permeabilización y pérdida del contenido celular (proteínas y aminoácidos), causando graves alteraciones bioquímicas y morfológicas que dificultan el proceso de infección y desarrollo de las hifas expuestas (García-Rincón *et al.*, 2010; Ghomoth, Anal, Aseel & Benhamou, 1992; González-Estrada *et al.*, 2020; Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2018).

Previas investigaciones concluyen que la aplicación del quitosano de bajo peso molecular ( $< 2.5 \times 10^4$  Da) puede producir un mayor efecto inhibitorio sobre el desarrollo micelial de *R. solonifer* (hasta 99%) a partir de concentraciones del 1.5 % (Hernández-Luzardo *et al.*, 2008; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018).

La efectividad del quitosano con base en el peso molecular se ha relacionado con el número de cargas positivas capaces de interactuar de manera electrostática con la pared del patógeno avanzando su actividad antifúngica (Romanuzzi *et al.*, 2018). El quitosano de alto peso molecular tiene una

menor presencia de grupos amino disponibles en sus cadenas largas debido a posibles entrelazamientos que explican su menor efectividad *in vitro* (Feliniani *et al.*, 2013; Nisaroukis, 2014). Los EAC y el QC no demostraron ser completamente efectivos en aplicaciones individuales en comparación con el control positivo ( $100 \pm 0.0$  % de inhibición), sin embargo, la combinación del QC al 1.5 % con los EAC al 10 % resultó ser más efectiva ( $94.68 \pm 2.15$  %). Se ha reportado el efecto aditivo o sinérgico de las propiedades funcionales del quitosano al ser combinado con diferentes extractos vegetales (Duman *et al.*, 2016; Khalifa, Barakat, El-Mansy & Soliman, 2017; Muzzahapo, Badolati, Chiappetta, Picci & Muzzahapo, 2020; Sahaghi, Maghsoodlou, Khemirci & Ziaifard, 2015). Las investigaciones realizadas mencionan una asociación estable del quitosano con algunos compuestos fenólicos mediante interacciones hidrofóbicas, apilamiento  $\pi-\pi$ , enlaces múltiples de hidrógeno u uniones covalentes entre los grupos reactivos del quitosano y los grupos polares de los compuestos fenólicos (Siripatrawan & Hartz, 2010; Xie *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2019).

La aplicación de tratamientos que reduzcan o inhiban el rápido desarrollo micelial de *R. stolonifer* puede ser una estrategia efectiva para el control de las pudriciones blandas en frutos; así como también la afectación de condiciones favorables para la captación de nutrientes se les relaciona con una disminución en la patogenicidad de este hongo (Petrasch *et al.*, 2019).

### Esporulación

La producción de esporas en *R. stolonifer* fue significativamente diferente entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) después de 2 días de incubación. En la Tabla I se muestra la concentración de esporas por tratamiento. No se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre el control (agar) y el control negativo (viragre 10 %). Los tratamientos de EAC y QC aplicados individualmente demostraron ser efectivos con valores superiores al 90 % de inhibición. En estudios previos se observó que la aplicación de los extractos acuosos ricos en ácidos fenólicos puede tener un mayor efecto sobre los procesos de esporulación en *R. stolonifer* (Bautista-Baños *et al.*, 2000; Bautista-Baños, Hernández-López & Bosquez-Molina, 2004). Esto puede deberse a un posible daño estructural en las membranas celulares, así como alteraciones en la actividad enzimática relacionada con los procesos de adaptación y diferenciación de las estructuras formadoras de esporas (Karim *et al.*, 2015; Mohamed *et al.*, 2016).

De igual forma, se observó una reducción similar en la capacidad de producción de las esporas de *R. stolonifer* (< 99 %) al entrar en contacto con el quitosano de alto peso molecular a partir de concentraciones de 0.5 % (García-Rincón *et al.*, 2010). Esto puede ser por la capacidad del quitosano para producir desequilibrios en la homeostasis iónica del  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  en la célula fúngica, produciendo el escape de los nucleótidos, fosfatos, sustratos de reacciones enzimáticas relacionados con la respiración, los procesos de diferenciación, así como a la producción de esporas (Bautista-Baños, Ventura-Aguilar, Correa-Pacheco & Corona-Rangel, 2017; Peña, Sánchez & Calhorra, 2013).

No se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las combinaciones de los EAC con el QC demostrando ser efectivas respecto al control positivo. La aplicación de tratamientos que permitan la inhibición de los procesos de esporulación en hongos filamentosos, es una estrategia importante en la ruptura del ciclo de infección de los patógenos fúngicos (Hee-Soe & Jae-Hyuk, 2012), en este sentido, la aplicación del QC y los EAC puede ayudar a reducir la virulencia de *R. stolonifer* sobre frutos susceptibles a su ataque.

### Germinación de las esporas

El porcentaje de germinación de las esporas en *R. stolonifer* fue significativamente diferente entre las concentraciones de los EAC ( $p \leq 0.05$ ) después de 4 h de incubación (Tabla I) y la

concentración del 10 % de EAC resultó ser más efectiva (70.5  $\pm$  2.16 % de inhibición). El proceso de germinación de las esporas es un evento importante para la infección por hongos, los extractos acuosos ricos en compuestos fenólicos como el ácido clorogénico podrían inducir a una mayor inhibición de los mecanismos de germinación, al suprimir la transducción de señales relacionada con la actividad enzimática de las esporas (Karim *et al.*, 2015; Mohamed *et al.*, 2016).

Todos los tratamientos con QC fueron más efectivos para inhibir el proceso de germinación de las esporas ( $\geq 98.66 \pm 1.75$  % de inhibición). Se conoce un patrón entre el peso molecular del quitosano y su efecto sobre los procesos de germinación de las esporas en algunos hongos filamentosos, por consiguiente la aplicación del quitosano de alto peso molecular demostró mejores resultados contra *R. stolonifer* (García-Rincón *et al.*, 2010; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018). Esta mayor inhibición se relaciona con la capacidad que tienen los grupos amino ( $-NH_2$ )<sup>+</sup> presentes en las moléculas del quitosano para interactuar con las cargas negativas de la membrana celular de la espóra, causando cambios en su permeabilidad y alteraciones a nivel intracelular dificultando el proceso de germinación (González-Estrada *et al.*, 2020). No se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las combinaciones del extracto acuoso con el quitosano.

La germinación de las esporas es considerada como la etapa más importante en la infección y propagación de un patógeno fúngico (Cortés-Rivera *et al.*, 2019b), la inhibición de este proceso puede representar un daño importante sobre los mecanismos y estrategias de proliferación de *R. stolonifer*.

### Modelo de crecimiento

La ecuación modificada de Gompertz mostró un buen ajuste en la descripción del desarrollo micelial de *R. stolonifer* sobre los diferentes tratamientos, observándose un coeficiente de determinación promedio ( $R^2$ ) de  $0.997 \pm 0.005$  para ambas temperaturas de almacenamiento (15 °C/25 °C). Debido a que *R. stolonifer* presenta un crecimiento lineal a partir de 40  $\mu$ m de longitud del tubo germinal, este modelo matemático puede determinar de manera adecuada las principales variables involucradas en la cinética de desarrollo de este patógeno (Nikkhah, Hashemi, Habibi & Farhosh, 2017; Pitt & Hocking, 2009). El análisis estadístico demostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las variables de velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y el periodo de latencia ( $\lambda$ ) dependiendo del tipo de tratamiento aplicado (Tabla II). Las concentraciones más altas de los EAC (10 %) y el QC (1.5 %) produjeron un mayor aumento sobre la fase de latencia ( $\lambda$ ) del patógeno, así como una mayor reducción en la tasa de crecimiento máximo ( $V_{max}$ ); sin embargo, los tratamientos combinados de los EAC con el QC demostraron ser más efectivos al reducir estos parámetros al mínimo en ambas temperaturas de almacenamiento.

Tabla II. Parámetros modificados del modelo de Gompertz para curvas de crecimiento de *R. stolonifer* expuesto a diferentes tratamientos y temperaturas.

| Tratamientos        | Parámetros de Gompertz    |                           |                           |                           |                            |       |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------|
|                     | $V_{máx}$ (mm/h)          |                           | $\lambda$ (h)             |                           | Variabilidad ( $R^2$ adj.) |       |
|                     | 15 °C                     | 25 °C                     | 15 °C                     | 25 °C                     | 15 °C                      | 25 °C |
| Control             | 0.067 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.266 ± 0.09 <sup>a</sup> | 1.271 ± 0.42 <sup>a</sup> | 0.022 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.991                      | 0.994 |
| QC 0.5 %            | 0.060 ± 0.01 <sup>b</sup> | 0.230 ± 0.05 <sup>c</sup> | 2.620 ± 0.61 <sup>b</sup> | 0.825 ± 0.06 <sup>b</sup> | 0.997                      | 0.986 |
| QC 1 %              | 0.057 ± 0.01 <sup>b</sup> | 0.218 ± 0.04 <sup>d</sup> | 2.818 ± 0.74 <sup>c</sup> | 1.025 ± 0.09 <sup>c</sup> | 0.996                      | 0.981 |
| QC 1.5 %            | 0.056 ± 0.01 <sup>c</sup> | 0.212 ± 0.02 <sup>d</sup> | 3.002 ± 0.83 <sup>c</sup> | 1.193 ± 0.14 <sup>c</sup> | 0.997                      | 0.984 |
| EAC 1 %             | 0.063 ± 0.02 <sup>b</sup> | 0.245 ± 0.07 <sup>b</sup> | 2.069 ± 0.64 <sup>b</sup> | 0.692 ± 0.11 <sup>b</sup> | 0.995                      | 0.991 |
| EAC 5 %             | 0.062 ± 0.02 <sup>c</sup> | 0.239 ± 0.06 <sup>b</sup> | 2.525 ± 0.41 <sup>b</sup> | 0.766 ± 0.21 <sup>b</sup> | 0.996                      | 0.990 |
| EAC 10 %            | 0.060 ± 0.01 <sup>c</sup> | 0.228 ± 0.05 <sup>c</sup> | 2.546 ± 0.31 <sup>b</sup> | 0.954 ± 0.18 <sup>b</sup> | 0.988                      | 0.988 |
| QC 0.5 % + EAC 1 %  | 0.057 ± 0.02 <sup>c</sup> | 0.226 ± 0.09 <sup>c</sup> | 2.640 ± 0.38 <sup>c</sup> | 1.401 ± 0.23 <sup>c</sup> | 0.996                      | 0.983 |
| QC 1 % + EAC 5 %    | 0.056 ± 0.01 <sup>d</sup> | 0.217 ± 0.04 <sup>d</sup> | 2.916 ± 0.42 <sup>c</sup> | 1.945 ± 0.28 <sup>d</sup> | 0.996                      | 0.986 |
| QC 1.5 % + EAC 10 % | 0.054 ± 0.01 <sup>e</sup> | 0.202 ± 0.01 <sup>e</sup> | 3.020 ± 0.78 <sup>c</sup> | 2.272 ± 0.33 <sup>d</sup> | 0.998                      | 0.982 |

Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes con un riesgo del 5 %. Promedio de diez réplicas ± desviación estándar.  $V_{máx}$ : tasa de crecimiento específica máxima,  $\lambda$ : duración de la fase de latencia.

Existen pocos informes que describan el efecto de los antifúngicos orgánicos mediante modelos matemáticos, pero se conoce que la aplicación de activos naturales de manera combinada produce un mayor rango de acción sobre *R. stolonifer* al modificar los principales parámetros cinéticos asociados con su desarrollo micelial ( $\lambda, V_{máx}$ ) (Ochoa-Velasco *et al.*, 2017). Aunque los mecanismos asociados con la adaptación y el desarrollo de *R. stolonifer* al interactuar con los compuestos fenólicos no se encuentran totalmente esclarecidos, estos podrían implicar afecciones sobre los mecanismos de transporte y/o cambios en los mecanismos celulares que conducen a la incorporación de proteínas y polisacáridos en la zona de extensión de la hifa (Suwanamornler, Sangchote, Chinsirikul, Sane & Chonhenchob, 2018). De igual forma, se sabe de la capacidad del quitosano para afectar variables como la tasa de crecimiento máxima de *R. stolonifer*, así como prolongar la fase de latencia ( $\lambda$ ), debido a modificaciones en el plasma celular y alteraciones graves en la membrana, que conducen a un aumento en los periodos de adaptación y diferenciación del patógeno (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; García-Rincón *et al.*, 2010).

La temperatura influyó en mayor medida sobre la dinámica de crecimiento de *R. stolonifer*; sin embargo, todos los tratamientos aplazaron la curva de desarrollo del patógeno (Figura 2), esta adaptación a temperaturas bajas y presencia de compuestos antifúngicos se podría deber a características morfológicas y estructurales como la presencia de hifas cenocíticas carentes de septos, capaces de permitir una translocación rápida de organelos y una mayor absorción de nutrientes, permitiendo el desarrollo de *R. stolonifer* en condiciones de estrés (Pitt & Hocking, 2009; Sardella,

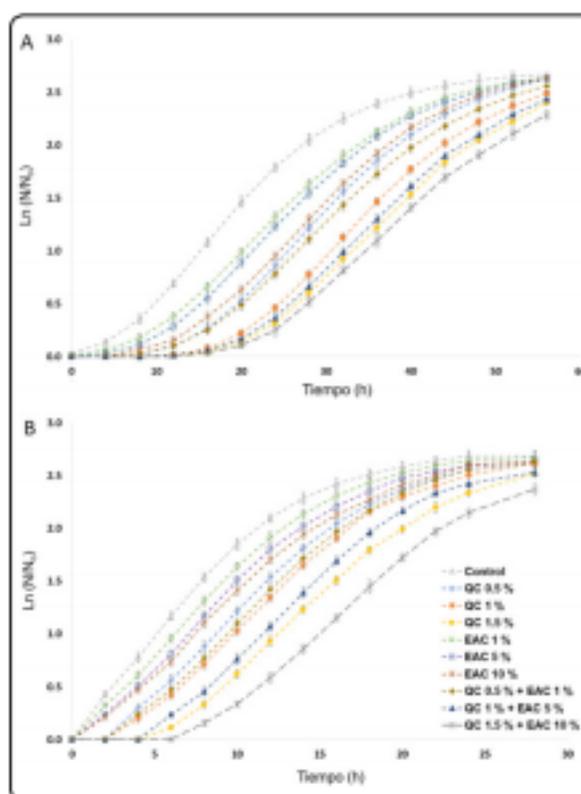


Figura 2. Cinética de crecimiento de *R. stolonifer*. A) Dinámica de crecimiento a 15 °C. B) Dinámica de crecimiento a 25 °C. N = Diámetro promedio de la colonia en el tiempo h, N0 = Diámetro de la colonia en el tiempo 0.

Gatt & Valdramidis, 2018). Los parámetros de crecimiento determinan el valor de su utilidad al evaluar la actividad antifúngica del QC y los EAC sobre los procesos de infección de *R. stolonifer* en frutos de guanábana.

## CONCLUSIONES

La combinación de los EAC con el QC produce un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial, esporulación y germinación de las esporas en *R. stolonifer*, así como una mayor modificación en los parámetros cinéticos de crecimiento  $V_{max}$  y  $\lambda$ . Todos los tratamientos producen un efecto fungistático sobre *R. stolonifer* y las combinaciones de los tratamientos muestran un comportamiento sinérgico de manera *in vitro*, que pueden utilizarse en futuras evaluaciones contra la pudrición suave en la guanábana (*A. muricata*) y como una alternativa ecológica para la reducción de la patogenicidad y la virulencia de *R. stolonifer*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (731233) a Héctor Javier Cortés Rivera.

## REFERENCIAS

Aguilar-Méndez, M. A., Campos-Arias, M. P., Quiroz-Reyes, C. N. & Ronquillo-de Jesús M. A. (2019). Fruit peels as sources of bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial properties. *Rev. FCA UNCUYO*, **50**, 112. Válido en: <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs/index.php/RFCA/article/view/2945/2103>.

Aqil, F., Zahin, M., Ahmad, I., Owais, M., Khan, M. S. A., Bansal, S. S. & Farooq, S. (2010). Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts and Phytochemicals: A Review. In: Ahmad, I. (Ed.) *Combating Fungal Infections*. (pp. 449–484) Berlín: Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-12173-9\_19

Bajic, M., Rocnik, T., Oberlintner, A., Scognamiglio, F., Novak, U. & Likozar, B. (2019). Natural plant extracts as active components in chitosan-based films: A comparative study. *Food Packaging and Shelf Life*, **21**, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodpack.2019.100365>.

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Díaz-Pérez, J. C. & Cano-Ochoa, C. F. (2000). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of "ciruela" fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology*, **20**, 99–106. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00109-5).

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M. & Bosquez-Molina, E. (2004). Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **22**, 178–185. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222204.pdf>.

Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. L., Correa-Pacheco, Z. & Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, **23**, 103-121. DOI: <http://dx.doi.org/10.5154/r.chsh.2016.11.030>.

Betchem, G., Nana A. N. & Wang, Y. (2019). The application of chitosan in the control of post-harvest diseases: a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **126**, 495–507. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00248-2>.

Berumen-Varela, G., Hernández-Oñate, M. A. & Tiznado-Hernández, M. E. (2019). Utilization of biotechnological tools in soursop (*Annona muricata* L.). *Scientia Horticulturae*, **245**, 269-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.028>.

Bhagwat, M. K. & Datar, A. G. (2014). Antifungal activity of herbal extracts against plant pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **47**, 959-965. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.826857>

Cerqueira, M. D., Barcellos, H., Machado, P., Aires, J. & Dummer, D. (2015). Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **1**, 26–31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.026>.

Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A., Avella, N. & Patrino, G. (2017). Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. *Postharvest Biology and Technology*, **131**, 16–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.04.011>.

Cortés-Rivera, H. J., González-Estrada, R. R. & Blancas-Benitez, F. J. (2019a). Extracción e identificación de compuestos bioactivos presentes en residuos de coco (*Cocos nucifera*) mesocarpio y exocarpio, y su potencial antifúngico. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. pp: 1-65.

Cortés-Rivera, H. J., Blancas-Benitez, F. J., Romero-Islas, L. C., Gutiérrez-Martínez, P. & González-Estrada, R. R. (2019b). *In vitro* evaluation of residues of coconut (*Cocos nucifera* L.) aqueous extracts, against the fungus *Penicillium italicum*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **31**, 613–617. DOI: 0.9755/ejfa.2019.v31.i8.1993.

Dey, G., Chakraborty, M. & Mitra, A. (2005). Profiling C6-C3 and C6-C1 phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 375–381. DOI: 10.1016/j.jplph.2004.08.006.

Duran, M., Aday, M. S., Zorba, N. N. D., Temizkan, R., Büyükcın, M. B. & Caner, C. (2016). Potential of antimicrobial active packaging "containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating" to extend shelf life of fresh strawberry. *Food and*

- Bioproducts Processing*, **98**, 354–363. DOI: 10.1016/j.fbp.2016.01.007.
- Feliziani, E., Romanazzi, G., Margosan, D. A., Mansour, M. F., Smilanick, J. L., Gu, S., Gobil, H. L. & Rubio-Ames, Z. (2013). Preharvest fungicide, potassium sorbate, or chitosan use on quality and storage decay of table grapes. *Plant Disease*, **97**, 307–314. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1043-RE>.
- Fiore, A. & Cigic, V. V. (2019). Bioactive compounds from food byproducts. *Journal of Food Quality*, **2019**, 1–2. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/6213792>.
- García-Rincón, J., Vega-Pérez, J., Guerra-Sánchez, M. G., Hernández-Lauzardo, A. N., Peña-Díaz, A. & Velázquez del Valle, M. G. (2010). Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **97**, 275–278. DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.03.008.
- Ghaouth, A. E., Arul, J., Asselin, A. & Benhamou, N. (1992). Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*, **96**, 769–779. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80447-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80447-4).
- González-Estrada, R. R., Vega-Arreguin, J., Robles-Villanueva, B. A., Velázquez-Estrada, R. M., Ramos-Guerrero, A. & Gutiérrez-Martínez, P. (2020). Evaluación *in vitro* de productos químicos no convencionales para el control de *Penicillium citrinum*. *Polibotánica*, **49**, 161–172. DOI: 10.18387/polibotanica.49.11.
- Gutiérrez-Martínez, P., Ledezma-Morales, A., Romero-Islas, L. C., Ramos-Guerrero, A., Romero-Islas, J., Rodríguez-Pereida, C., Casas-Junco, P., Coronado-Partida, L. & González-Estrada, R. R. (2018). Antifungal activity of chitosan against postharvest fungi of tropical and subtropical fruits. In: Dongre, R. S. (Ed.) *Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology*. (pp. 311-322) London: IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.76095.
- Hee-Soo, P. & Jae-Hyuk, Y. (2012) Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, **15**, 669-677. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.006>.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montelvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M. & Bello-Pérez, L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, **73**, 541–547. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.12.020.
- Jiao, W., Chu, S., Li, X., Cao, J., Fan, X. & Jiang, W. (2019). Preparation of a chitosan-chlorogenic acid conjugate and its application as edible coating in postharvest preservation of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **154**, 129–136. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.003>.
- Jiménez-Zurita, J. O., Baloi-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Sánchez-Herrera, L. M., Jiménez-Ruiz, E. I., Bello-Lara, J. E., García-Paredes, J. D. & Juárez-López, P. (2017). Cold Storage of Two Selections of Soursop (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Journal of Food Quality*, **1-9**. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/4517469>.
- Karim, H., Boubaker, H., Askarne, L., Talibi, I., Msanda, F., Saadi, B., Ait, A. & Aoumar, B. (2015). Antifungal properties of organic extracts of eight *Cistus* L. species against postharvest citrus sour rot. *Letters in Applied Microbiology*, **62**, 16–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.041>.
- Khalifa, I., Barakat, H., El-Mansy, H. A. & Soliman, S. A. (2017). Preserving apple (*Malus domestica* var. Anna) fruit bioactive substances using olive wastes extract-chitosan film coating. *Information Processing in Agriculture*, **4**, 90-99. DOI: 10.1016/j.inpa.2016.11.001.
- Lagrouh, F., Dakka, N. & Bakri, Y. (2017). The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de Mycologie Médicale*, **27**, 303-311. DOI: 10.1016/j.mycmed.2017.04.008.
- Manenji, B. T., Mudyiwa, R. M., Midzi, J. & Tsodzo, A. (2017). Antifungal effects of botanical leaf extracts of *Lantana camara*, *Moringa oleifera*, and *Tagetes minuta* on *Rhizopus stolonifer in vitro*. *Journal of Agriculture and Ecology Research International*, **11**, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.9734/JAERI/2017/28371>.
- Martínez, G., Regente, M., Jacobi, S., Del Río, M., Pinedo, M. & Del Canal, L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **140**, 30–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.012>.
- Masih, H., Peter, J. K. & Tripathi, P. A. (2014). Comparative evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts and chemical fungicides against four plant pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3**, 97-109. Disponible en: <https://www.ijemas.com/vol-3-5/Harison%20Masih,%20et%20al.pdf>.
- Medda, S., Hajra, A., Dey, U., Bose, P. & Mondal, N. K. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloe vera* leaf extract and antifungal Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloe vera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. *Applied Nanoscience*, **5**, 875–880. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13204-014-0387-1>.
- Mishra, S., Ahmad, S., Kumar, N. & Sharma, B.K. (2013). *Annona muricata* (the cancer killer): A review. *Global Journal Pharmacy*, **2**, 1613–1618. Válido en: <https://www.yumpu.com/en/document/view/14436104/annona-muricata-the-cancer-killer-a-review>.

- Mohamed, M. S. M., Saleh, A. M., Abdel-Farid, I. & El-Naggar, S. A. (2016). Growth, hydrolases and ultrastructure of *Fusarium oxysporum* as affected by phenolic rich extracts from several xerophytic plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **141**, 57–64. DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.11.007.
- Muzzalupo, L., Badolati, G., Chiappetta, A., Picci, N. & Muzzalupo, R. (2020). *In vitro* Antifungal Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaf Extracts Loaded in Chitosan Nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**, 1-10. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00151.
- Nallamuthu, I., Devi, A. & Khanum, F. (2015). Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10**, 203-211. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.005>.
- Niaounakis, M. 2014. Manufacture of biocomposites, En Niaounakis, M. (Ed.). *Biopolymers: Processing and Products*. (pp. 411-431) New York: Elsevier. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-26698-7.00012-X>.
- Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi, M. & Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, **257**, 285-294. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021.
- Ochoa-Velasco, C. E., Navarro-Cruz, A., Vera-López, O., Palou, E. & Avila-Sosa, R. (2017). Growth modeling to control (*in vitro*) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. *Revista Argentina de Microbiología*, **50**, 70-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.010>.
- Pagliarulo, C., Sansone, F., Moccia, S., Russo, G. L., Aquino, R. P., Salvatore, P., Stasio, M. D. & Volpe, M. G. (2015). Preservation of strawberries with an antifungal edible coating using peony extracts in chitosan. *Food and Bioprocess Technology*, **9**, 1951-1960. DOI: 10.1007/s11947-016-1779-x.
- Peña, A., Sánchez, N. S. & Calahorra, M. (2013). Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *BioMed Research International*, **2013**, 1-15. DOI: 10.1155/2013/527549.
- Petrash, S., Silva, C. J., Mesquida-Pesci, S. D., Gallegos, K., van den-Abee, C., Papin V., Fernandez-Acero, F. J., Knapp S. J. & Blanco-Ulate, B. (2019). Infection strategies deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a function of tomato fruit ripening stage. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 1-24. DOI: 10.3389/fpls.2019.00223.
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2009). Zygomycetes. En Pitt, J. I. (Ed.) *Fungi and Food Spoilage*. (pp.145-168). Boston: Springer. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_6).
- Ramos-Guerrero, A., González-Estrada, R. R., Hanako-Rosas, G., Bautista-Baños, S., Acevedo-Hernández, G., Tiznado-Hernández, M. E. & Gutiérrez-Martínez, P. (2018). Use of inducers in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: *in vitro* tests. *Food Science and Biotechnology*, **27**, 755–763. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0305-5>.
- Ribeiro-da Silva, L. M., Teixeira-de Figueiredo, E. A., Silva-Ricardo, N. M. P., Pinto-Vieira, I. G., Wilane-de Figueiredo, R., Montenegro-Brasil, I. & Gomez, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, **143**, 398–404. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.001.
- Romanazzi, G., Feliziani, E. & Sivakumar, D. (2018). Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: Eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 27-45. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02745.
- Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M. & Ziaifar, A.M. (2015). Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology*, **110**, 224-228. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.08.025.
- Sardella, D., Gatt, R. & Valdramidis, V. P. (2018). Modelling the growth of pear postharvest fungal isolates at different temperatures. *Food Microbiology*, **76**, 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.010>
- Shreya, M., Hajra, A., Dey, U., Bose, P. & Mondal, N. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloe vera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. *Applied Nanoscience*, **5**, 875-880. DOI: 10.1007/s13204-014-0387-1.
- SIAP. (2019). Cierre de la producción agrícola por estado. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de guanábana en México. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consultado: 29 de noviembre del 2020.
- Singh, D. & Sharma, R. R. (2018). Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. En Mohammed, W. S. (Ed.). *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. Academic Press, (pp. 1–52) New York: Elsevier. DOI:10.31018/jans.v11i2.2053.
- Siripatrawan, U. & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food hydrocolloids*, **24**, 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>.
- Suwanamornlert, P., Sangchote, S., Chinsirikul, W., Sane, A. & Chonhenchob, V. (2018). Antifungal activity of plant-derived compounds and their synergism against major postharvest pathogens of longan fruit *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*, **257**, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.009>.