



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

TESIS

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* DE UN
RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE
SEMILLA DE AGUACATE NATIVO MEXICANO
(*Persea americana* var. *drymifolia*) PARA LA PRESERVACIÓN DE
FRUTOS DE AGUACATE cv. HASS

P r e s e n t a:

IQ. ERANDI ATSIRI AGUILAR ORTIZ

Para obtener el título de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Director de Tesis:

DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Co-Directora de Tesis:

DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ GARCÍA

Mayo, 2025. Morelia, Michoacán.

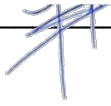
Declaración de originalidad

El presente documento es producto del trabajo original de investigación de Erandi Atsiri Aguilar Ortiz, estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y respetando siempre los más altos estándares éticos solicitados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Todos los datos de la investigación reportada en el presente documento de tesis (excepto los indicados explícitamente en el texto), fueron obtenidos por Erandi Atsiri Aguilar Ortiz durante el periodo que fue estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la Dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y la Co-Dirección de la Dra. Alejandra Hernández García.

Morelia, Mich., a 28 de abril de 2025.

Ingeniera Química Erandi Atsiri Aguilar Ortiz _____


Dr. Rafael Salgado Garciglia _____


Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, UMSNH.

DEDICATORIA

A mi esposo, por siempre apoyarme y estar para mí, esto es para ti...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

A la SECIHTI, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría y a los proyectos PICIR-007 (ICTI 2022-2023) y CIC/UMSNH 2023-2024 (RSG).

A mis directores de tesis, el Dr. Rafel Salgado Garciglia y la Dra. Alejandra Hernández García, por abrirme las puertas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, y permitirme trabajar en él y, sobre todo, por brindarme las herramientas necesarias para realizar esta investigación. Les estaré profundamente agradecida por la oportunidad de haber aprendido de ustedes, por la ayuda, conocimientos y experiencias compartidas durante estos años.

A los miembros del comité sinodal, conformado por el Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y el Dr. Pedro Damián Loeza Lara, por sus valiosas aportaciones para la mejora de esta investigación y por ayudarme a seguir creciendo, aprendiendo y mejorando durante cada seminario presentado. En especial al Dr. Héctor por impartirme clases y compartir su conocimiento conmigo.

Un gran agradecimiento a mi papá, Armando Aguilar Yépez, por ser fuente de inspiración y crecimiento, tanto para mí como para mis hermanos, muchas gracias por todo el esfuerzo que has hecho para sacarnos adelante y ayudarnos a cumplir nuestros sueños y metas. Gracias a mis hermanos Jatzin y Karime por ser tan buenos hermanos y siempre estar para mí aún a la distancia.

A mi compañero de vida, mi esposo Earving, infinitas gracias por todo el apoyo brindado siempre, por tu confianza y tus palabras de apoyo. Gracias por creer en mí y siempre motivarme a seguir creciendo y desarrollándome en todos los ámbitos, Te amo muchísimo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Christian, Agustín, Kathia, Karina, Erika, Lyz, Nadia, Yunuen y Sol, por hacer tan amena mi estancia en el laboratorio, gracias por la convivencia y las risas.

A mis compañeras de maestría Celina y Sussy, muchas gracias por su apoyo y su amistad.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. AGUACATE	4
2.1.1. Clasificación botánica y descripción de la planta	4
2.1.2. Descripción general	4
2.1.3. Variedades de aguacate	7
2.1.4. Enfermedades del aguacate	9
2.1.5. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	11
2.2. RECUBRIMIENTOS EN FRUTOS POSCOSECHA	15
2.2.1. Recubrimientos y biopelículas comestibles	15
2.2.2. Recubrimientos de quitosano	17
2.2.3. Extractos vegetales en recubrimientos	21
2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	21
2.3.1. Mecanismos de acción	24
2.3.2. Compuestos fenólicos en recubrimientos de quitosano	27
2.4. ANTECEDENTES DIRECTOS	28
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
5.1. Objetivo general	33
5.1.1. Objetivos específicos	33
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
7. RESULTADOS	35
7.1. CAPÍTULO 1. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> del quitosano y de la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	35
Resumen	35
Materiales y métodos	36
Material biológico	36
Obtención de la FHS del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano	36
Preparación de solución de quitosano	36
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de la FHS y quitosano	37
Determinación del contenido total de fenoles y flavonoides de la FHS	37

Diseño experimental	37
Resultados y discusión.....	38
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de la FHS	38
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del quitosano sobre <i>C. gloeosporioides</i>	40
Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales de la FHS.....	43
Conclusiones	44
7.2. CAPÍTULO 2. Efecto antifúngico de recubrimientos de quitosano adicionados con la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>) en frutos poscosecha de aguacate cv. Hass infectados con <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 45	
Resumen.....	45
Materiales y métodos	46
Material biológico.....	46
Pruebas de patogenicidad.....	46
Obtención de la FHS del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano	47
Preparación de la solución de quitosano.....	47
Efecto antifúngico de recubrimientos de quitosano adicionados con la FHS en frutos de aguacate cv. Hass inoculados con <i>C. gloeosporioides</i>	48
Determinación de pérdida de peso	48
Determinación de firmeza.....	49
Diseño experimental	49
Resultados y discusión.....	49
Pruebas <i>in vitro</i> de patogenicidad.....	49
Porcentajes de inhibición e índices de severidad en frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano solo o adicionados con la FHS inoculados con <i>C. gloeosporioides</i>	51
Pérdida de peso	56
Pruebas de firmeza.....	57
Conclusiones	60
8. DISCUSIÓN GENERAL	62
9. CONCLUSIONES	72
10. LITERATURA GENERAL CITADA	73
11. ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Persea americana</i> Miller (1768).....	4
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. y Sacc. (Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América).....	11
Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de quitosano sobre diferentes hongos fitopatógenos poscosecha.....	19
Cuadro 4. Recubrimientos de quitosano funcionalizados para la mejora poscosecha de frutas y vegetales.....	22
Cuadro 5. Recubrimientos de quitosano adicionados con extractos vegetales con efecto antifúngico en frutos.....	23
Cuadro 6. Mecanismos de acción de compuestos fenólicos.....	26
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición e índices de severidad (IS) en frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano (Q1, Q1.5, Q2 y Q2.5) y quitosano adicionado con la CI100 de la FHS (Q1 + FHS, Q1.5 + FHS, Q2 + FHS y Q2.5 + FHS), después del almacenamiento durante 7 días a 10°C y por 7 días más a 25°C, e inoculados con 1×10^3 de esporas/mL de <i>C. gloeosporioides</i>	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales variedades de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.). Fuente: Modificado de gob.mx/snics.....	8
Figura 2. Morfología de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Crecimiento micelial de (2A), conidióforos (2B) y esporas (2C) de un aislado de fruto de aguacate cv. Hass.....	13
Figura 3. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de micelio con las diferentes concentraciones de FHS (A), curva de inhibición de concentraciones de FHS (B). Fotografías representativas del efecto de las diferentes concentraciones de la FHS (0.01, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.10 mg/mL), Control – (agua estéril con etanol (1:1) y Control + (benomyl50®). Determinación a los 8 días de cultivo. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).....	39
Figura 4. Fotografías del efecto de las diferentes concentraciones de quitosano sobre <i>C. gloeosporioides</i> . Control – (agua estéril con etanol (1:1) y Control + (benomyl50®) y los distintos porcentajes del quitosano 1% (Q1), 1.5% (Q1.5), 2% (Q2), y Q2.5 (2.5%). Determinación a los 8 días de cultivo ($n=5$).	41
Figura 5. Frutos de aguacate cv. Hass a los 7 días del almacenamiento a 25°C, después del almacenamiento a 10°C por 7 días: A, Inoculado con 1×10^3 esporas/mL de <i>C. gloeosporioides</i> , sin tratamiento; B, Control + (benomyl50, 10 mg/mL, con esporas); C, Control – (agua estéril, sin esporas) ($n=7$).	50
Figura 6. Frutos de aguacate cv. Hass almacenados 7 días a 10°C y por 7 días a 25°C, de los tratamientos control (Control – sin esporas, Control con esporas y Control + con esporas), con quitosano solo (Q1, Q1.5, Q2 y Q2.5) y quitosano adicionado con la CI100 de la FHS (Q1 + FHS, Q1.5 + FHS, Q2 + FHS y Q2.5 + FHS), inoculados con esporas de <i>C. gloeosporioides</i> . Al final del almacenamiento (14 días) ($n=7$).	54
Figura 7. Porcentajes de pérdida de peso en los frutos de aguacate cv. Hass después de su almacenamiento durante 7 días a 10°C y 7 días más a 25°C.....	57
Figura 8. Valores de firmeza en frutos de aguacate cv. Hass después de su almacenamiento durante 7 días a 10°C y 7 días más a 25°C.....	58

RESUMEN

La antracnosis es una de las enfermedades principales en frutos poscosecha de aguacate (*Persea americana* Mill.), causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, el cual generalmente es controlado por la aplicación de fungicidas sintéticos, los cuales cada vez son menos aceptados por los consumidores y por su potencial contaminación ambiental, por lo que presentan ciertas restricciones en muchos países importadores de este fruto, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas para el control de este hongo con productos más aceptables y que además, mantengan la calidad y el valor nutricional de este fruto. Los recubrimientos comestibles son una de estas alternativas, sobre todo los que son preparados con el quitosano, un biopolímero natural con actividad antifúngica que, con la adición en mezcla con extractos de origen vegetal, potencia esta actividad para mantener frutos con una mayor vida de anaquel sin síntomas de la enfermedad. Los extractos vegetales contienen compuestos fenólicos con actividad biológica y es importante realizar estudios con ellos para determinar sus propiedades antifúngicas. En la presente investigación, se obtuvo la fracción hidrosoluble (FHS) a partir del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) para evaluar su efecto antifúngico *in vitro* en un recubrimiento de quitosano sobre el control de *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate cv. Hass en poscosecha, donde también se determinaron los parámetros de pérdida de peso y firmeza en frutos recubiertos. En la primera parte de esta investigación, el aceite de semilla de aguacate nativo mexicano se obtuvo por extracción en equipo soxhlet utilizando hexano, para posteriormente evaporar el disolvente en rotavapor y realizar un fraccionamiento líquido-líquido utilizando agua como disolvente de separación para obtener la FHS, la que fue concentrada a 10 mg/mL. La evaluación *antifúngica in vitro* de esta fracción se realizó con diferentes concentraciones (0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.10 mg/mL) y con cuatro porcentajes de quitosano (1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 %), mediante el método de difusión en pozos, para obtener la CI_{100} de la FHS y el porcentaje óptimo antifúngico de quitosano, para su uso en recubrimientos. Se evaluó el contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides totales de FHS, y se realizó un análisis cualitativo para la identificación de los principales compuestos fenólicos por UHPLC. En la segunda parte de esta investigación se determinó la patogenicidad del hongo *C. gloeosporioides* y se realizaron los ensayos *in vivo* en frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano solo o adicionado con la FHS en poscosecha almacenados por 7 días a 10°C y 7 días más a 25°C, utilizando una escala de índices de severidad (IS, 0-4) para determinar la severidad de la enfermedad causada por el hongo en estudio. Se confirmó la infección en frutos de aguacate cv. Hass, observando los principales síntomas de la antracnosis, cuando se aplicó un inóculo de 1×10^3 esporas/ml, obteniendo un porcentaje de más del 76 % de infección severa en el mesocarpio después del almacenamiento en las condiciones anteriormente mencionadas. Con los ensayos *in vitro*, se obtuvo la CI_{100} de la FHS (0.107 mg/mL) y el porcentaje de quitosano con mayor actividad antifúngica (2%), que fueron utilizados en los tratamientos con el recubrimiento con quitosano solo o con la CI_{100} de la FHS. Con el análisis de la FHS, se obtuvo un contenido de 104.04 mg Eq. Ácido Gálico/g ES (ácidos fenólicos) y de 0.006 mg Eq. Quercetina/g ES (flavonoides). Con los resultados obtenidos en frutos recubiertos, se observó actividad antifúngica tanto con los recubrimientos de quitosano solo o con la FHS, con reducción de pérdida de peso y mantenimiento de la firmeza, presentándose el mayor porcentaje de inhibición de *C. gloeosporioides* con un 94.5 % (IS 1), el menor porcentaje de pérdida de peso (3.51%) y mayor retención de firmeza (14.83 kg/cm^2), en frutos del tratamiento Q2.5 + FHS. Con estos resultados se demostró el efecto antifúngico *in vitro* de la fracción hidrosoluble y el efecto *in vivo* de los recubrimientos de quitosano adicionados con la CI_{100} de la FHS en frutos de aguacate cv. Hass en poscosecha, inoculados con *C. gloeosporioides*. Los frutos recubiertos con Q2.5 + FHS se preservaron mejor en comparación con los frutos del tratamiento control, sin recubrimiento inoculado con esporas, en los que se presentó la menor pérdida de peso y se mantuvo la firmeza.

Palabras clave: Aguacate, *Colletotrichum gloeosporioides*, compuestos fenólicos, fracción hidrosoluble, quitosano.

ABSTRACT

Anthrachnose is one of the main post-harvest diseases of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. It is caused by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. It is generally controlled by the application of synthetic fungicides. These fungicides are increasingly less accepted by consumers due to their potential environmental contamination. Therefore, they present certain restrictions in many countries that import this fruit. This has led to the search for alternatives to control this fungus with more acceptable products that also maintain the quality and nutritional value of this fruit. Edible coatings are one of these alternatives, especially those prepared with chitosan, a natural biopolymer with antifungal activity that, when mixed with plant extracts, enhances this activity to maintain fruit with a longer shelf life without symptoms of the disease. Plant extracts contain phenolic compounds with biological activity, and it is important to conduct studies with them to determine their antifungal properties. In the present investigation, the water-soluble fraction (FHS) was obtained from the seed oil of the Mexican native avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) to evaluate its *in vitro* antifungal effect in a chitosan coating on the control of *C. gloeosporioides* in Hass avocado fruits during postharvest, where the weight loss and firmness properties of the coated fruits were also evaluated. In the first part of this investigation, the seed oil of the Mexican native avocado was obtained by extraction in a Soxhlet equipment using hexane, to subsequently evaporate the solvent in a rotary evaporator and perform a liquid-liquid fractionation using water as a separation solvent to obtain the FHS, which was concentrated to 10 mg/mL. *In vitro* antifungal evaluation of this fraction was carried out at different concentrations (0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 and 0.10 mg/mL) and with four percentages of chitosan (1.0, 1.5, 2.0 and 2.5%), using the well diffusion method, to obtain the IC₁₀₀ of the FHS and the optimal antifungal percentage of chitosan for use in coatings. The total content of phenolic acids and total flavonoids of FHS was evaluated, and a qualitative analysis was performed for the identification of the main phenolic compounds by UHPLC. In the second part of this investigation, the pathogenicity of the fungus *C. gloeosporioides* was determined and *in vivo* assays were performed on avocado cv. Hass fruits coated with chitosan alone or with the addition of FHS, these were stored postharvest for 7 days at 10°C and for another 7 days at 25°C. A severity index scale (SI, 0-4) was used to determine the severity of the disease caused by the fungus under study. Infection was confirmed in Hass avocado fruit, with the main symptoms of anthracnose observed when an inoculum of 1x10³ spores/ml was applied, resulting in a severe infection rate of over 76% in the mesocarp after storage under the aforementioned conditions. With *in vitro* tests, the IC₁₀₀ of the FHS (0.107 mg/mL) and the percentage of chitosan with the highest antifungal activity (2%) were obtained, which were used in treatments with chitosan coating alone or with the IC₁₀₀ of the FHS. With the analysis of the FHS, a content of 104.04 mg Eq. Gallic Acid/g ES (phenolic acids) and 0.006 mg Eq. Quercetin/g ES (flavonoids) was obtained. With the results obtained in coated fruits, antifungal activity was observed both with chitosan coatings alone or with FHS, with reduction in weight loss and maintenance of firmness, presenting the highest percentage of inhibition of *C. gloeosporioides* with 94.5% (IS 1), the lowest percentage of weight loss (3.51%) and greater firmness retention (14.83 kg/cm²), in fruits of the Q2.5 + FHS treatment. These results demonstrated the *in vitro* antifungal effect of the water-soluble fraction and the *in vivo* effect of chitosan coatings added with the IC₁₀₀ of the FHS on Hass avocado fruits in post-harvest, inoculated with *C. gloeosporioides*. Fruits coated with Q2.5 + FHS were better preserved compared to fruits from the control treatment, without spore-inoculated coating, in which the least weight loss was present and firmness was maintained.

Keywords: Avocado, *Colletotrichum gloeosporioides*, phenolic compounds, water-soluble fraction, chitosan.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, el aguacate es uno de los frutos con mayor éxito de exportación nacional y provee el 45.95% de la exportación en el mercado internacional (SAGARPA, 2017). Al mes de septiembre de 2023, la superficie sembrada destinada a la producción del aguacate es de 257,571 hectáreas (ha) y es Michoacán en donde se cultiva la mayor superficie (179 mil 914 ha), la cual representa el 69.9% del total nacional (SIAP-SAGARPA, 2023).

Aunque es un cultivo que produce altos rendimientos, hay enfermedades y plagas que afectan su producción hasta en un 40% y su control es un factor que incrementa los costos de producción, ya que se requieren de seis a siete aplicaciones de fungicidas, acompañado por prácticas culturales y de manejo. En países productores de aguacate, la antracnosis es el principal problema en pre- y poscosecha, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y se manifiesta durante el desarrollo del fruto en huertos con climas cálidos, con alta humedad relativa y prolongada. Los principales síntomas en poscosecha se desarrollan como lesiones circulares de color café claro en el pericarpio (cáscara), las cuales se van alargando y hundiendo, cambiando a colores más oscuros conforme avanza la maduración (Herrera-González *et al.*, 2020). Actualmente esta enfermedad se controla principalmente con el uso de fungicidas químicos sintéticos que pueden generar efectos adversos a la salud de los consumidores, por lo que se requieren de nuevas alternativas que controlen el crecimiento de este hongo, se mantenga la calidad y una mayor vida de anaquel de estos frutos.

El desarrollo de películas o recubrimientos biodegradables derivados de fuentes renovables obtenidos de la naturaleza es la mejor forma de reducir el plástico a base de petróleo y la cantidad presente en el medio ambiente en forma de desecho (Matos-González, 2020). Dentro de estos, el quitosano, un polímero natural que se obtiene a partir del exoesqueleto de los crustáceos como la langosta, el cangrejo, el camarón y en algunos casos de hongos y algas, ayuda a la preservación de la calidad de los alimentos extendiendo su vida de anaquel, debido a las propiedades antimicrobianas (antibacterianas y antifúngicas), biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad. En frutas y vegetales, el recubrimiento con quitosano ayuda a retrasar la maduración y la pérdida de agua, reduciendo así su descomposición. Algunas tendencias con los recubrimientos de quitosano son agregar aditivos para mejorar las

propiedades antimicrobianas y antioxidantes como la complementación con extractos derivados de plantas, por su contenido de compuestos fenólicos o terpénicos, logrando empaques más ecológicos y con alto potencial antifúngico (Matos-González, 2020).

Dentro de los aditivos que se han agregado a los recubrimientos se encuentran los aceites esenciales de semilla de albaricoque, de canela, de naranja y limón, extracto etanólico de propóleo, extracto acuoso de hojas de chirimoya, papaya y semilla de papaya. Asimismo, se han aplicado compuestos fenólicos de flores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en frutos como fresas, mango y papaya, en los cuales se ha observado la mejora en las propiedades de barrera, como la resistencia al agua y al vapor de agua, retraso de maduración, además por sus propiedades antimicrobianas, con la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos patógenos y alargando la vida de anaquel, sin alterar los procesos fisiológicos de los frutos durante el almacenamiento (Barrera *et al.*, 2015; Priyadarshi *et al.*, 2018; Padró-Nombrét *et al.*, 2019).

El uso de recubrimientos a base de quitosano complementados con extractos vegetales es una alternativa viable para preservar la vida de anaquel de los frutos de aguacate. En frutos de aguacate cv. Hass, se han evaluado recubrimientos de quitosano suplementados con aceite de tomillo, obteniendo una reducción significativa de los síntomas de la antracnosis, en comparación con el quitosano o el aceite esencial de tomillo solos, observando una reducción de la pérdida de firmeza y del color de la pulpa (mesocarpio) después del tratamiento con quitosano suplementado con aceite de tomillo (Bill *et al.*, 2014; Madera-Santana *et al.* 2023). Osondu *et al.* (2022) evaluaron recubrimientos de clorhidrato de quitosano adicionado con ácido vainílico y ácido cafeico, ambos al 0.07%, en frutos de aguacate cv. Fuerte. Estos tratamientos controlaron de manera preventiva la pudrición por antracnosis en frutos inoculados e infectados naturalmente.

En la búsqueda de aditivos efectivos para los recubrimientos de quitosano y la preservación de frutos inocuos de aguacate cv. Hass durante poscosecha, la semilla de aguacate se presenta como una alternativa para optimizar la vida de anaquel de estos frutos, ya que contiene compuestos fenólicos, a los que se le atribuyen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerosas y antiinflamatorias (Abubakar *et al.*, 2017; Giacometti *et al.*, 2018; Alkhalaf *et al.*, 2019; Valdiviezo-Marcelo, 2021).

En la presente investigación se obtuvo la fracción hidrosoluble (fracción polar) rica en compuestos fenólicos por fraccionamiento líquido-líquido del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), para determinar su efecto antifúngico *in vitro* y en el recubrimiento elaborado con quitosano, adicionado con la fracción hidrosoluble, durante la preservación de frutos poscosecha de aguacate del cultivar comercial “Hass” (*P. americana* cv. Hass) para el control de *C. gloeosporioides*.

2. ANTECEDENTES

2.1. AGUACATE

2.1.1. Clasificación botánica y descripción de la planta

El aguacate *Persea americana* Mill., pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, de la clase Magnoliopsida, orden Laurales, familia Lauraceae y género *Persea* (Cuadro 1). Actualmente, este género contiene alrededor de 85 especies, encontrándose la mayoría desde el sur de Estados Unidos (*Persea borbonia*) hasta Chile (*Persea lingue*), con excepción de *Persea indica* en las Islas Canarias (España) y probablemente otras del sur de Asia que se suponen pertenecen al género *Persea* (Barrientos y López, 2000).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Persea americana* Miller (1768)

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Magnoliidae
Orden: Laurales
Familia: Lauraceae
Género: <i>Persea</i>
Especie: <i>Persea americana</i> Mill.
Cultivar: <i>Persea americana</i> cv. Hass
Variedad: <i>Persea americana</i> var.
drymifolia (Schltdl. & Cham.) S.F.
Blake

2.1.2. Descripción general

En general, un árbol de aguacate puede llegar a alturas de hasta 20 metros, presenta un tronco grueso, con hojas alargadas, con ramificaciones que producen follaje denso (SFA, 2011). El

fruto es una drupa, en forma de pera, de color verde claro a verde oscuro y de violeta a negro, cáscara rugosa con una pulpa verde amarillenta y una semilla central muy grande. Existen aproximadamente unas 400 variedades, por lo que hay frutos de distintas formas y pesos (150 a 350 g) (Rodríguez y Sánchez, 2009). El número de cromosomas (cariotipo) del aguacatero, aunque varía, en *P. americana* se han reportado $2n=24$ (García, 1975).

Las inflorescencias presentan ramificaciones que terminan en flores, las que están agrupadas en y son de tallo largo, crecen en las axilas formando grupos integrados que contienen hasta 450 flores, que pueden madurar en el transcurso de seis meses dependiendo de la temperatura y la variedad del fruto (Salazar-García *et al.*, 2007). Los árboles de aguacate se caracterizan por el gran número de flores que producen (1 a 2 millones por árbol) y solo entre el 0.01% y el 1% se transforma en fruto, por la abscisión de numerosas flores que suelen ser anormales o estériles y de frutos pequeños en desarrollo (Bernal y Díaz, 2020). Las flores del aguacate son de color amarillo verdoso de 3 a 7 mm de longitud, agrupadas en panículas. Presentan dicogamia y protoginia, es decir que, las flores abren dos veces, actuando primero como flores femeninas y, posteriormente, como masculinas. Las variedades se clasifican por el comportamiento de sus inflorescencias en dos tipos: A y B. Poseen órganos sexuales masculinos (estambres) y femeninos (pistilos). Presentan un cáliz de tres sépalos y una corola tripétala, con 12 estambres, nueve funcionales y tres estaminoides; tienen un pistilo con un solo carpelo y el ovario con un solo óvulo. La duración de las flores es de dos días, antes de ser fecundadas o caer (Avilán *et al.*, 1992). La ventaja de tener los dos tipos de flores cultivadas juntas, hace que esta superposición temporal tanto de la femenina como la masculina fomenta la polinización cruzada, lo que provoca una mayor producción de frutos.

El fruto de aguacate contiene una sola semilla rodeada de una cubierta seminal (endocarpio), rodeada de una pulpa carnosa (mesocarpio), la cual suele ser de color verde claro a amarillo verdoso, de consistencia mantecosa, muy nutritiva y con un ligero sabor a nuez. Al madurar la cáscara (pericarpio) de los frutos, se torna de color verde a morado oscuro, casi negro, dependiendo de la variedad, también puede variar tanto en grosor (delgada, intermedia o gruesa) como en textura (lisa, papilada, rugosa). Por lo general la fruta comienza su proceso de

maduración hasta después de la cosecha, una vez que es recogida del árbol (IPGRI, 1995; Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario, 2013).

La semilla del aguacate tiende a variar en su longitud, con diferentes formas, ovadas o esferoides, generalmente con base plana y ápice redondo, con dos envolturas muy pegadas. La superficie también varía ya que puede ser lisa o rugosa; los cotiledones son de color marfil, amarillo, crema y rosa (IPGRI, 1995). El endocarpio o semilla es importante en la relación fruto/semilla, resultando ideal una mayor porción de pulpa y una semilla de tamaño más pequeño (Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario, 2013).

En el aguacate, la raíz es pivotante, ramificada y de distribución radial. La mayoría de las raicillas alimentadoras (secundarias y terciarias) no contienen súber y se distribuyen de forma horizontal de manera superficial. Por las características de las raíces, la principal y las secundarias, se recomienda cultivar en suelos profundos y sin problemas de drenaje (Whiley *et al.*, 1988; Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario, 2013).

El tallo es un tronco cilíndrico, erecto, leñoso, ramificado, con una corteza áspera, de lisa a agrietada. El tejido leñoso es de color café claro con vasos anchos. La copa, de ramas extendidas, es de forma globosa y acampanada. Las ramas son abundantes, delgadas, sensibles a las quemaduras de sol y a las heladas, frágiles al viento o exceso de producción. Por esta razón, se recomienda cultivar variedades enanas, compactas y establecer el cultivo en lugares protegidos del viento (Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario, 2013; Bernal y Díaz, 2020).

Las hojas del aguacate son simples, alternas y coriáceas variando su longitud de 8 a 40 cm y de 3 a 10 cm de ancho y poseen pecíolos delgados que llegan a medir hasta 6 cm de largo. Su coloración varía desde un verde rojizo en estado joven hasta un verde oscuro poco brillante en estado maduro mientras que el envés presenta un color verde más claro y opaco. Además, las hojas son pinnatinervias con cuatro a diez pares de nervaduras laterales, prominentes por el envés; algunas variedades tienen ciertas características que las diferencian de otras como el olor a anís, que están despiden al estrujarlas en el caso de la variedad mexicana (Avilán *et al.*, 1992; Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario, 2013).

2.1.3. Variedades de aguacate

En México se encuentra la mayor diversidad de tipos de aguacate, con hasta 20 diferentes especies relacionadas (Bergh, 1992). En el aguacate (*Persea americana* Mill.) hay tres variedades comúnmente conocidas como raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) y antillana (*P. americana* var. *americana*). Cada una de estas, mantiene características específicas de su variedad respecto a comportamiento morfológico, fenológico, ecológico y de adaptación, por lo cual son clasificadas por separado (Barrientos- Priego, 2010).

Variedad Mexicana, también denominada raza mexicana, originaria de las tierras altas de la zona central de México, se caracteriza por presentar una alta resistencia al frío, así como su alto contenido de aceite, en comparación con las otras variedades. Además, su cáscara es lisa y delgada y sus hojas despiden un olor a anís al ser estrujadas. Botánicamente es clasificada como *P. americana* var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) S.F. Blake. En nuestro país es conocido popularmente como aguacate “criollo” o también como aguacate nativo mexicano (Figura 1).

Variedad Guatemalteca, es originaria de las tierras altas de Guatemala (*P. americana* var. *guatemalensis*) y se adapta a condiciones subtropicales, presenta una cáscara rugosa y bastante gruesa en comparación con las otras variedades. Esta característica le confiere cierta resistencia del fruto al ser transportado, sin embargo, los tejidos esclerificados de esta variedad son bastante duros, por lo que se dificulta saber al tacto si los frutos ya están en madurez de consumo (Figura 1).

Variedad Antillana, es originaria de las tierras bajas de Centroamérica (*P. americana* var. *americana*). Esta variedad presenta frutos de tamaño mediano a grande, es susceptible al frío y como portainjerto presenta una alta resistencia a la salinidad, además, tiene un lapso de flor a fruto bastante corto (Figura 1).

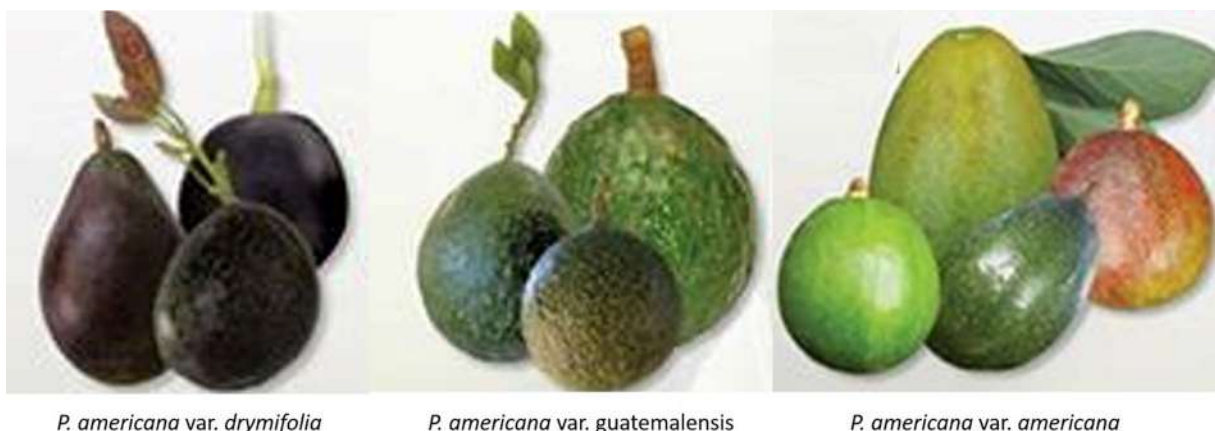


Figura 1. Principales variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.). Fuente: Modificado de gob.mx/snics (<https://www.gob.mx/snics/articulos/cartel-tematico-diversidad-de-aguacate-en-mexico-persea-spp?idiom=es>).

Cultivar Hass

Dentro de los cultivares subtropicales destacan el cultivar Hass, Fuerte, Bacon, Colín V-33, Reed, Pinkerton, y los tropicales son Booth 8, Choquette y Lula, entre miles que actualmente se cultivan en zonas restringidas con baja comercialización. En particular, el cultivar Hass, es originario en La Habra, Heights, California por Rudolph Hass. Es el cultivar más comercializado en el mundo, su fruto es de pulpa cremosa, sin fibra, contenido de aceite de 23.7%, de forma ovoide a piriforme, cáscara algo coriácea, rugosa, color púrpura oscura al madurar, semilla pequeña y adherida a la cavidad. Es un fuerte productor y el fruto puede mantenerse adherido al árbol por algunos meses después de la madurez fisiológica. Cuenta con un 10-15% de genes de la raza mexicana y el resto de la guatemalteca. Los genes de la raza mexicana les otorgan una mejor adaptación a los climas templados, por lo que los cultivos pueden ubicarse en una gran amplitud de altitudes. En Michoacán el cultivar Hass se ubica desde 1,500 hasta 2,500 metros de altitud esta gran variación permite que pueda ser cosechado durante todo el año (Gallegos-Espinoza, 1983; Téliz y Mora, 2006).

Producción del cultivar Hass. Es el cultivar de aguacate más comercializado a nivel mundial referente a cantidades exportadas (FAO, 2022) y es México el país que ocupa el primer lugar en producción y exportación de este fruto, con un volumen de exportación en 2021 del 41.6% del total mundial (SIAP-Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021) con un área sembrada

destinada a su producción de 257 mil 571 hectáreas (ha). En 2022 México obtuvo un rendimiento promedio de la producción de aguacate de 10.76 ton/ha (CODESIN, 2021). y para septiembre de 2023 la producción de aguacate mexicano alcanzó un monto total de un millón 904 mil 604 toneladas (ton), con un aumento de 55 mil 170 ton (3.0%) más que en el mismo mes del año 2022, esto debido al incremento de la superficie cosechada y rendimientos. Los principales estados productores en México son Michoacán, Jalisco, Estado de México, Morelos y Nayarit, y es Michoacán el líder productor de este fruto con un millón 368 mil 96 ton, aportando el 71.8% del total nacional, seguido de Jalisco con 236 mil 186 (12.4%) (SIAP-SAGARPA, 2023). Entre los principales destinos de exportación se encuentra Estados Unidos con un 85.5 % del volumen de exportación, seguido por Canadá, Japón y España con 7.7 %, 2.4 % y 2.0 %, respectivamente (FIRA, 2024).

México destaca en la exportación de aguacate debido a su capacidad para producir este fruto todo el año, principalmente el Hass, el cual es el de mayor demanda en los mercados mundiales. La proximidad de México con su país vecino Estados Unidos, es otro de los factores determinantes que otorga a México una ventaja competitiva única en los mercados norteamericanos, donde se encuentran los principales compradores de aguacate, situando a México en un punto estratégico para el comercio del aguacate siendo el principal proveedor de Estados Unidos (FAO, 2022).

2.1.4. Enfermedades del aguacate

Los árboles, como todos los seres vivos, son susceptibles a ser afectados por enfermedades durante todas las etapas de su desarrollo y en los árboles de aguacate no es la excepción, limitando la productividad y longevidad de estos, afectando a los tejidos de la planta, así como a los frutos, los cuales son de interés comercial. Estos agentes pueden ser de origen biótico (insectos, vertebrados, microorganismos como hongos, bacterias, virus, etc.) y abiótico, debidas a causas ambientales como heladas, lluvias, sequías, deficiencias nutrimentales, salinidad y acidez en el suelo, etc., alterando el desarrollo de estas plantaciones (Téliz y Mora, 2006; Arguedas-Gamboa, 2008).

- Las enfermedades infecciosas son causadas por animales, insectos, hongos, bacterias, virus, viroides, nemátodos, protozoarios y plantas superiores parasíticas y tienen la característica de ser transmisibles; los microorganismos que las originan pueden dispersarse entre árboles y huertos vecinos por medio de herramientas de trabajo, injertos, viento, lluvias, suelos contaminados, agua de riego e insectos (Verdeguer-Monge, 1985; Téliz y Mora, 2006; FHIA, 2008).
- Las enfermedades no infecciosas no son transmitibles y aquí se incluyen enfermedades causadas por variaciones de temperatura, luz, pH, humedad del suelo y del ambiente, granizo, lluvias, nieve, insuficiencia de oxígeno, deficiencia y toxicidad de minerales, por pesticidas y por mal manejo del cultivo, entre otras (Verdeguer-Monge, 1985; Téliz y Mora, 2006; FHIA, 2008).

En México, es necesario que la producción de aguacate cumpla con los estándares de calidad interpuestos por las naciones a donde será exportado, debido a ello, por lo que el manejo y control fitosanitario, son un especial foco de atención para el sector productivo aguacatero. Diversas enfermedades se presentan en los huertos limitando considerablemente la calidad de los frutos y por ende su comercialización. Es por esta razón que es de suma importancia conocer los principales fitopatógenos que afectan a este cultivo en México (Nataren-Velazquez, *et al.*, 2020; Sánchez y Sánchez, 2021).

De las enfermedades que atacan a este cultivo, la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, representa uno de los problemas fitosanitarios más relevantes y alarmantes, debido a que esta enfermedad es de amplia distribución en las zonas de cultivo y ocasiona daño principalmente a frutos desde etapas tempranas de desarrollo del fruto en precosecha y es de difícil detección ya que, los síntomas de la enfermedad se observan hasta poscosecha, cuando el fruto ha madurado, siendo este hongo una de las principales causas de pérdidas en poscosecha (Herrera-González *et al.*, 2020; Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020).

2.1.5. *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides comprende el estado asexual o anamorfo de *Glomerella cingulata*, que, de acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), su clasificación es la siguiente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. (Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América.

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum gloeosporioides* (fase anamórfica o asexual)

Colletotrichum gloeosporioides es uno de las especies más importantes por causar antracnosis en un gran número de cultivos en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, entre los cultivos más susceptibles a esta enfermedad se encuentra el aguacate, mermando su calidad, no solo por el daño que causan las pudriciones en el fruto, sino también porque representa una limitante para su comercialización, disminuyendo el valor del producto y su posible exportación.

Esta enfermedad está presente en todas las zonas productoras de aguacate, y la incidencia puede llegar al 100 %, mientras que la severidad generalmente es menor al 4 % (Ávila-Quezada *et al.*, 2002). La antracnosis se caracteriza por presentar lesiones oscuras y hundidas, circulares elipsoidales, con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas (Trinidad-Ángel *et al.*, 2017).

Patogénesis, ciclo de infección de *C. gloeosporioides*. Las principales fuentes de inóculo de *C. gloeosporioides* son los conidios y esporas y, es por este medio que el hongo llega al fruto debido a la dispersión del hongo por viento o gotas de lluvia, que, cuando llega al fruto, desarrolla estrategias de infección para así crecer, germinar y finalmente esporular. Este, puede penetrar los tejidos por aberturas naturales (estomas, lenticelas y pedicelo), heridas o penetración directa, siendo esta última la más común (Herrera-González *et al.*, 2020). Cuando la espora o conidio llega a la superficie del hospedante, se adhiere a este posiblemente por secreción mucilaginosa (O'Connell y Ride, 1990). Posteriormente, inicia la germinación, donde la espora/conidio produce un tubo germinativo, que da lugar a la formación del apresorio, que sintetiza enzimas que degradan las ceras epicuticulares y, además, ejerce presión hidrostática en el sitio de penetración, anclándose a la superficie vegetal, comenzando a sintetizar enzimas (celulasa y quitinasa) que degradan la pared celular para después penetrar/ingresar. En este punto, el apresorio mantiene contacto directo con el hospedero y produce la hifa de infección, la cual permanece en estado latente debido a la presencia del compuesto cis, cis 1-acetoxy-2-hidroxy-4oxo-heneicosa-12, 15 dieno (Ávila-Quezada, 2006; Ramos-García *et al.*, 2010; Cannon *et al.*, 2012; Herrera-González *et al.*, 2020) que se encuentra en la epidermis de frutos inmaduros y presenta actividad fungistática inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de conidios, es por ello, que muchas de las infecciones causadas por hongos permanecen en estado latente hasta que el fruto madura en poscosecha donde ya se observan los síntomas de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides*, debido a que los mecanismos de defensa del fruto decrecen con el proceso de maduración (Prusky *et al.*, 2013).

Las colonias *in vitro* de *Colletotrichum* presentan coloraciones desde gris claro a gris oscuro y micelio aéreo (Figura 2A). El hongo posee hifas septadas (Roca *et al.*, 2000) (Figura 2B) y produce apresorios clavados, ovalados, algunas veces lobulados, color café, cuyas dimensiones

fluctúan de 6 a 20 x 4 a 12 μm . Los conidios son variables en tamaño, de 12 a 17 μm de largo y 3.5 a 6 μm de ancho, son hialinos, de forma cilíndrica y obtusos en el ápice y se encuentran embebidos en una matriz de color salmón, dentro del acérvulo. El acérvulo puede presentar setas y es de color salmón. El hongo puede esporular adecuadamente en cámara húmeda y se cultiva con facilidad en medio nutritivo Papa Dextrosa Agar. *In vitro*, la esporulación ocurre a 25°C alternando 12 h de oscuridad y 12 h de luz. El hongo puede infectar entre los 20 y 28°C, pero su temperatura optima de crecimiento es de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones de alta humedad relativa (>80%) (Cano *et al.*, 2004; Ávila-Quezada, 2006; Rodríguez- López *et al.*, 2009) (Figura 2C).



Figura 2. Morfología de *Colletotrichum gloeosporioides*. Crecimiento micelial de (2A), conidióforos (2B) y esporas (2C) de un aislado de fruto de aguacate cv. Hass

Control de la antracnosis. Es de importancia garantizar la calidad de los frutos de aguacate en el mercado, para ello los productores deben controlar la enfermedad de antracnosis causada por *C. gloeosporioides*, ya que la descomposición de los frutos infectados durante la cadena de producción contribuye de manera directa a las enormes pérdidas en poscosecha que generan pérdidas económicas, encarecimiento del producto y dificultad para su comercialización y exportación (Prusky y Keen, 1993; Ramírez-Gil *et al.*, 2017; Kimaru *et al.*, 2020). El control de la antracnosis puede ser químico, biológico y cultural.

Control químico. El control químico consiste en prevenir, debilitar o interrumpir el crecimiento del hongo causante de la enfermedad y así reducir su incidencia con el uso de sustancias químicas como es el uso de fungicidas (Calle-Henao *et al.*, 2021). De acuerdo a la Asociación

de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México A.C. (APEAM), los fungicidas permitidos para su uso en México y su exportación empleados para el control de antracnosis, son entre algunos químicos a base de cobre (oxicloruro de cobre, sulfato de cobre, hidróxido cúprico), azufre, tiabendazol, azoxytrobina, entre otros y, deben ser aplicados al inicio de la floración, dos o tres semanas después del cuajamiento del fruto y de manera inmediata después de que ocurran daños al fruto por granizo, debido a que la alta humedad en el ambiente y las heridas favorecen la infección y dispersión del hongo y también, posterior a lluvias, debido al lavado de los compuestos químicos. Estos fungicidas deben ser aplicados con un programa de rotación para evitar la resistencia a estos fungicidas (Ávila-Quezada, 2006; Bernal y Díaz, 2020). Sin embargo, la aplicación de fungicidas no es una medida sostenible puesto que los hongos han desarrollado resistencia a fungicidas y, además, es una medida cada vez menos aceptada por los consumidores, por lo que se está en búsqueda de alternativas más ecológicas con el ambiente (Ippolito y Nigro, 2000; Kimaru *et al.*, 2020).

Control biológico. El control biológico se ha estudiado como una alternativa al control químico y puede ser llevado a cabo con la inoculación de microorganismos antagonistas a *C. gloeosporioides* como *Bacillus* sp., el cual ha demostrado inhibir el crecimiento del hongo *in vitro* (Kimaru *et al.*, 2020). Así mismo, las aspersiones en árboles de aguacate Fuerte en pre cosecha con *B. subtilis* solo o en combinación con oxicloruro de cobre, redujeron la gravedad de la mancha negra del aguacate, causada por *Pseudocercospora purpurea*, sin embargo, el mejor control se logró únicamente con fungicidas (oxicloruro de cobre y benomilo) (Korsten *et al.*, 1992). Los aceites esenciales se presentan como otra alternativa con actividad fungicida con alto potencial de utilizarse como sustitutos o complementos a los fungicidas, por lo que se han estudiado desde hace varios años. Adicionalmente, el uso de extractos vegetales como biofungicidas, como el extracto derivado de *Ocimum basilicum* y *Allium sativum* para el control de enfermedades fúngicas como la antracnosis, puede ser una forma más segura para el aplicador, los consumidores y el ecosistema, además, podría servir como una alternativa a la aplicación de fungicidas sintéticos (Ogbebor *et al.*, 2007).

En este sentido, se ha estudiado tanto el uso de aceites esenciales como de extractos vegetales para ser incorporados a recubrimientos comestibles para su utilización como empaques activos,

extendiendo la vida de anaquel de diversas frutas y vegetales, como el aguacate, disminuyendo la gravedad de fitopatógenos poscosecha presentes en la superficie de la fruta. Estos recubrimientos ayudan a prevenir la pérdida de peso, crecimiento microbiano, rancidez oxidativa, oscurecimiento de la superficie, pérdida de color, entre otras propiedades (Munhuweyi *et al.*, 2020).

Control cultural. El principal método cultural utilizado por los agricultores ha sido la poda de los árboles de aguacate para que haya una mejor circulación del aire y una menor humedad en la cubierta foliar, lo que favorece el crecimiento de hongos que causan la antracnosis y también, sellando con pintura a base de agua las heridas causadas por la poda (Bernal y Díaz, 2020; Kimaru *et al.*, 2020). Además, las fuentes de inóculo como hojas, ramas y frutos enfermos o momificados u otras plantas hospedantes deben retirarse del huerto para su eliminación (Pérez-Jiménez, 2008).

Aplicación de fungicidas para el control de *C. gloeosporioides*. La Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México A.C. (APEAM) ha elaborado un listado de agroquímicos recomendados para el cultivo de aguacate, en el caso del control químico de antracnosis algunos de los recomendados incluyen azoxystrobin, azufre elemental, oxiclورو de cobre, hidróxido cúprico, piraclostrobina, sulfato de cobre y tiabendazol, entre otros (Herrera-González *et al.*, 2020).

2.2. RECUBRIMIENTOS EN FRUTOS POSCOSECHA

2.2.1. Recubrimientos y biopelículas comestibles

Un recubrimiento comestible (RC) puede definirse como una matriz continua transparente, delgada y comestible, estructurada alrededor de la superficie de un alimento, generalmente mediante la inmersión del mismo sobre una solución formadora de recubrimiento o por aspersión (Arredondo-Ochoa, 2012), con el fin de preservar su calidad y servir como material de empaque (Fernández-Valdés *et al.*, 2015). Por otro lado, una película comestible (PC), es una matriz preformada de material comestible, obtenida por moldeo, que una vez formada es

colocada sobre los alimentos como una envoltura (Arredondo-Ochoa, 2012). La principal diferencia entre una película comestible (PC) y un recubrimiento comestible (RC) se basa en la forma de aplicación, los RC son aplicados en forma líquida sobre la superficie de los alimentos (inmersión o aspersión), mientras que las PC son formadas por separado del alimento, siendo primeramente moldeadas en láminas sólidas y posteriormente aplicadas como envoltura sobre el alimento (Falguera *et al.*, 2011).

Estas películas y recubrimientos comestibles (PRC) se elaboran a partir de diversos biopolímeros de origen natural como polisacáridos, proteínas, lípidos o una combinación de estos para aprovechar las propiedades de cada uno. Algunas de sus funciones son proteger a los alimentos de daños mecánicos, físicos, químicos y actividad microbiológica, así como mantener su calidad sensorial y comercial por más tiempo (Falguera *et al.*, 2011; Ortega y Aparicio, 2020). El uso de recubrimientos comestibles es una tecnología que está ganando importancia para prolongar la vida útil de alimentos altamente perecederos como frutas y vegetales frescos y mínimamente procesados debido a que actúan como una barrera contra la humedad. Esta pérdida de humedad en frutas provoca una modificación en su textura y turgencia, disminuyendo su firmeza y peso por deshidratación provocando cambios en el sabor y apariencia (Vázquez y Guerrero, 2013; Solano-Doblado *et al.*, 2018).

Aplicar recubrimientos comestibles en frutas y vegetales retarda su pérdida de pigmentación, compuestos volátiles y valor nutricional. Además, se inhibe el pardeamiento enzimático y las reacciones metabólicas asociadas con la maduración, promoviendo la conservación de las propiedades mecánicas y la conservación de las características sensoriales, ya que se retrasa la maduración conduciendo a un incremento de la vida útil de las frutas y vegetales (Del-Valle *et al.*, 2005). Lo anterior debido a que los RC crean una atmosfera modificada al interior del alimento, reduciendo la velocidad de respiración y retrasando el proceso de senescencia, ya que crean una barrera semipermeable a los gases (O_2 , CO_2 y vapor de agua), disminuyendo la disponibilidad de O_2 e incrementando la concentración de CO_2 (Ramos-García *et al.*, 2010; Vázquez y Guerrero, 2013), además pueden actuar como portadores de ingredientes funcionales como agentes antimicrobianos y antioxidantes y mejorar la integridad mecánica y ayudar a mantener la integridad estructural del alimento, así como evitar el daño causado por

manipulación, proporcionándole a la fruta mayor estabilidad durante el transporte y almacenamiento (Vázquez y Guerrero, 2013; Ortega y Aparicio, 2020).

2.2.2. Recubrimientos de quitosano

Actualmente existe una mayor conciencia por parte de los consumidores sobre los residuos de pesticidas en alimentos y una creciente preocupación por la producción de materiales plásticos poco biodegradables. Los fungicidas, además de encarecer la producción y provocar la resistencia de hongos a los ingredientes activos, se encuentran restringidos en muchos países debido a la toxicidad que provoca en humanos, los daños al ambiente y la calidad de los alimentos (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Darolt *et al.*, 2016; Martínez-Batista *et al.*, 2024), lo que ha motivado la búsqueda de alternativas naturales y respetuosas con el medio ambiente para el control de enfermedades pre- y poscosecha y la reducción de este tipo de materiales en el empaque de alimentos.

El uso de RC es una alternativa, dentro de las cuales, el quitosano ha resultado ser el preferido para la formulación de estos recubrimientos, debido a su abundancia en la naturaleza y sus características como biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, buenas propiedades en la elaboración de RC, especialmente por sus propiedades antifúngicas y por la activación de mecanismos de defensa en los tejidos vegetales, así mismo ha demostrado tener un potencial significativo para el envasado activo de alimentos con la finalidad de mejorar la conservación de alimentos, reduciendo el uso de conservantes químicos (Romero y Pereira, 2020; Romanazzi y Moumni, 2022; Madera-Santana *et al.*, 2023; Martínez-Batista *et al.*, 2024).

El quitosano (β - (1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa) es un biopolímero catiónico lineal de origen natural obtenido por medio de la desacetilación química de la quitina. La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y está presente en el exoesqueleto de crustáceos, insectos, así como hongos, algas y levaduras. El quitosano está compuesto por D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) unidas por enlaces β -(1-4), destacando la presencia de grupos funcionales como el

hidroxilo y el amino (Shiekh *et al.*, 2013; Jiménez-Mejía *et al.*, 2018; Adiletta *et al.*, 2021; Romanazzi y Moumni, 2022).

El quitosano ha sido aprobado como biopesticida por la EPA (U.S. Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés) y como aditivo alimentario por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) (Zhan *et al.*, 2011; Kumarihami *et al.*, 2022), por lo que tiene una amplia gama de aplicaciones en diversos campos como agente floculante en el tratamiento de aguas residuales, en la gestión de residuos, industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, nanotecnología, medicina y agricultura, debido a su baja toxicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, funcionalidad, propiedades antimicrobianas y capacidad de formación de recubrimientos (Madera-Santana *et al.*, 2019; Anaya-Esparza *et al.*, 2020; Ortega y Aparicio, 2020; Kumarihami *et al.*, 2022). La actividad fungicida del quitosano ya ha sido reportada en varios estudios *in vitro* demostrando su eficacia para reducir la presencia de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades poscosecha en frutas y vegetales al inhibir la germinación de esporas, el alargamiento del tubo germinativo y el crecimiento micelial de diferentes hongos (Cuadro 3).

Su efecto fungicida se ha asociado a su carácter policationico que le es proporcionado por los grupos amino que posee, esta característica catiónica explica su afinidad para unirse a moléculas con carga negativa, mediante atracciones electrostáticas entre las cargas positivas del quitosano y las cargas negativas de los grupos fosforilo presentes en los lípidos de membrana de los hongos. Una vez adherido a la membrana, cambia su permeabilidad, formando poros y filtrándose hasta llegar al citosol, lo anterior permite la fuga de electrolitos intracelulares y componentes proteínicos, ocasionando inestabilidad en la célula conduciendo a su muerte. (Saharan *et al.*, 2015; Bautista-Baños *et al.*, 2017).

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de quitosano sobre diferentes hongos fitopatógenos poscosecha.

Concentración quitosano	Hongo	Resultados	Referencias
0.75, 1.5, 3.0 y 6 mg/mL	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	Inhibición del crecimiento micelial, germinación y elongación del tubo germinativo. A concentraciones superiores a 1.5 mg/mL el quitosano indujo un crecimiento anormal de las hifas aéreas de ambos hongos y, únicamente en <i>R. stolonifer</i> se redujo la producción de esporangios.	El Ghaouth <i>et al.</i> , 1992
Bajo, medio y alto peso molecular (1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL)	<i>Rhizopus stolonifer</i>	El quitosano de bajo peso molecular mostro mayor eficacia para inhibir el crecimiento micelial, mientras que, el de alto peso molecular afecto la forma, la esporulación y la germinación de esporas.	Hernández-Lauzardo <i>et al.</i> , 2008
0.5, 1, 2, 4 y 8 mg/mL	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4 (<i>FocR4</i>)	Inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas. A concentraciones mayores a 1.6 mg/mL indujo cambios morfológicos.	Al-Hetar <i>et al.</i> , 2011
5, 7.5, 10 y 15 mg/mL	<i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. acutatum</i> , <i>F. oxysporum</i> y el oomiceto <i>Phytophthora</i> sp.	Inhibición del crecimiento micelial y germinación de esporas.	Arceo-Martínez <i>et al.</i> , 2019
0.05 y 0.1 %	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Inhibición del crecimiento micelial y germinación de esporas. Disminución del contenido de Ocratoxina A.	Meng <i>et al.</i> , 2020
0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i>	Inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas.	Martínez-Batista <i>et al.</i> , 2024

Respecto al efecto fungicida del quitosano, se ha reportado que este se encuentra en función de factores como la concentración utilizada, tipo de quitosano, peso molecular, grado de desacetilación y polimerización y, el hongo de estudio (Ramos-García *et al.*, 2010; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2011; Suseno *et al.*, 2014). Sin embargo, el grado de desacetilación es el factor que más influye en la actividad antimicrobiana del quitosano, ya que el número de grupos amino protonados (NH_2) presentes en el quitosano aumenta con el aumento de los grados de desacetilación, lo que influye en la actividad antimicrobiana (Moreira *et al.*, 2011; Elsabee y Abdou, 2013; Bautista-Baños *et al.*, 2017).

Se ha reportado que los recubrimientos de quitosano son efectivos en el control de la calidad en poscosecha de diversas frutas y vegetales como plátano, kiwi, fresa, mango, lichi, papaya, jitomate, pepino y zanahoria, entre otros, retardando el proceso de maduración, propiciando la retención de vitamina C, reduciendo la velocidad de respiración, la producción de etileno, el ablandamiento, pérdida de peso y humedad, inhibiendo el crecimiento de microorganismos y prolongando la vida poscosecha de los frutos, manteniendo la calidad y controlando la descomposición de los frutos tratados (Mukdisari *et al.*, 2016; Sardo *et al.*, 2017; Azmai *et al.*, 2019; Kumarihami *et al.*, 2022).

El quitosano ha sido comparado con otras biomoléculas utilizadas en la elaboración de recubrimientos comestibles y ha demostrado tener mejores ventajas debido a que es un biopolímero con propiedades antimicrobianas, biodegradable y no tóxico, lo que le otorga potencial aplicación en el área de empaques y alimentos, siendo una alternativa prometedora para la mejora en el control de varios hongos en poscosecha de productos hortofrutícolas (Gol *et al.*, 2013; Berumen *et al.*, 2015; Matos-González, 2020). Además de las propiedades antifúngicas del quitosano, como recubrimiento presenta buenas propiedades mecánicas y de transparencia, y tiene la propiedad de cambiar la composición de la atmosfera alrededor del fruto y crear una barrera semipermeable en la superficie de frutas y vegetales que controla el intercambio de gases (CO_2 y O_2), lo que reduce la velocidad de respiración al ajustar la permeabilidad del consumo de O_2 y la producción de CO_2 , reduciendo la pérdida de agua, manteniendo así la firmeza del tejido y disminuyendo la descomposición microbiana de los productos cosechados (Espinosa-Cavazos *et al.*, 2020; Romanazzi y Moumni, 2022).

2.2.3. Extractos vegetales en recubrimientos

La biocompatibilidad del quitosano permite que los recubrimientos a base de quitosano pueden ser utilizados como portadores de ingredientes activos, como agentes antimicrobianos y antioxidantes, agentes antipardecimiento, saborizantes, colorantes, potenciadores de textura y nutraceúticos, para mejorar la seguridad, calidad nutricional, funcionalidad y prolongar la vida poscosecha de las frutas y vegetales y que pueden ser consumidos con los alimentos (Duan *et al.*, 2019; Madera-Santana *et al.*, 2019; Kumarihami *et al.*, 2022). Por ello, se han adicionado distintos tipos de aditivos como extractos vegetales, aceites esenciales y compuestos fenólicos que le otorgan mejores características y una mayor funcionalidad a los recubrimientos y en algunos casos una mayor protección contra fitopatógenos causantes de enfermedades y pudriciones en los frutos, como se muestra en los Cuadros 4 y 5.

2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Las plantas sintetizan una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios, los primeros son moléculas que están directamente involucradas con funciones vitales de las plantas como procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, mientras que los metabolitos secundarios están relacionados con la defensa contra patógenos. Los metabolitos secundarios son sintetizados por las plantas en pequeñas cantidades y generalmente se encuentran restringidos a determinados géneros de plantas, familia o especies o bien, pueden estar presentes parcialmente dentro de las mismas. Se agrupan principalmente en cuatro clases: terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides y glucósidos (Badaracco *et al.*, 2020; Villota-Burbano y Vázquez-Ochoa, 2021).

Cuadro 4. Recubrimientos de quitosano funcionalizados para la mejora poscosecha de frutas y vegetales.

Fruto	Composición del RC	Resultados	Referencias
Fresa	Q 2 % + Extracto acuoso de hoja de <i>Moringa oleífera</i> 1 %	El recubrimiento mejoró el índice de sabor y disminuyó el valor de acidez titulable, mejorando así, la dulzura de la fresa.	Madera-Santana <i>et al.</i> , 2019
Papaya	Q (5 g/L) + Aceite esencial de <i>Mentha x villosa</i> Huds (0.6 y 1.2 mL/L)	Los recubrimientos presentaron superficies homogéneas y mejor estabilidad térmica y propiedades de barrera, además, retrasaron el proceso de maduración sin afectar las características sensoriales en poscosecha, redujeron la pérdida de peso, firmeza y la actividad enzimática y, retrasaron el cambio de color en la papaya.	Dos Passos Braga <i>et al.</i> , 2020
	Q (5 g/L) + Aceite esencial de <i>M. piperita</i> L. (0.6 y 1.2 mL/L)		
Arándanos	Q 1.5 % + Ácido salicílico 0.07 %	El quitosano con ácido salicílico produjo una disminución del índice de acidez titulable con respecto al control. Los arándanos tratados se mantuvieron firmes por más tiempo y su pérdida de peso fue menor con respecto al control, además, disminuyó la velocidad de respiración de los frutos, provocando la activación de la enzima fenilalanina amonio liasa.	Ramos-Bell <i>et al.</i> , 2024

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias de naturaleza química variada que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en plantas, hierbas, frutas, verduras, cereales y bebidas como zumos de frutas, té, café, chocolate y vino, y su estructura química consta de un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilos. Estos compuestos pueden clasificarse en cinco categorías principales: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos y lignanos, siendo los flavonoides los más abundantes (Singh *et al.*, 2022; Bonilla-Rodríguez *et al.*, 2023; Davidova *et al.*, 2024; Mandal y Domb, 2024).

Cuadro 5. Recubrimientos de quitosano adicionados con extractos vegetales con efecto antifúngico en frutos.

Fruto	Composición del RC	Fitopatógeno	Resultados	Referencias
Papaya	Q (5 mg/mL) + <i>Mentha</i> × villosa Huds (1.25 µL/mL)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Inhibición total del desarrollo de las lesiones causadas por la inoculación artificial de los hongos en estudio en papaya recubierta durante 10 días de almacenamiento a 25°C.	Dos Passos Braga <i>et al.</i> , 2019
	Q (5 mg/mL) - M. piperita L. (0.6 y 1.25 µL/mL)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>C. brevisporum</i>		
Fresa	Q 2 % + Aceite esencial de hojas de <i>Perilla frutescens</i> 1 %	<i>B. cinerea</i>	Otros parámetros y el contenido fenólico total, flavonoides totales y contenido de ácido ascórbico en las fresas recubiertas con quitosano y el aceite esencial disminuyó, mientras que el contenido de antocianinas aumentó, mostrando mejores atributos sensoriales en fresas recubiertas con quitosano y aceite esencial de hojas de <i>Perilla frutescens</i> .	Wang <i>et al.</i> , 2022
Papaya	Q 1 % + Aceite esencial de <i>Citrus. reticulata</i> (0.5, 1 y 1.5 %)	<i>C. gloeosporioides</i>	Los recubrimientos aplicados retrasaron el cambio de coloración en la epidermis de frutos de papaya, disminuyeron la velocidad de respiración, contenido de sólidos solubles, pérdida de peso y firmeza con respecto al control sin recubrimiento. Referente a la actividad antifúngica contra <i>C. gloeosporioides</i> , los recubrimientos compuestos mejoraron la vida de anaquel de la papaya y se redujo más del 80 % el daño causado por antracnosis.	García-Mateos <i>et al.</i> , 2023

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso y se conocen más de ocho mil compuestos con diferentes estructuras químicas, que abarcan desde moléculas sencillas como ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados y la lignina (Zabka y Pavela, 2013; Martín-Gordo *et al.*, 2018). En las plantas desempeñan un papel crucial como respuesta a diversas condiciones de estrés abiótico como la lluvia y radiación ultravioleta y en la defensa contra el ataque de agentes patógenos de plantas y agresión de animales herbívoros, además, contribuyen en el aroma y color de flores y frutos (O. Elansary *et al.*, 2020; Bouslamti *et al.*, 2022; Davidova *et al.*, 2024).

Los compuestos fenólicos tienen diversas propiedades biológicas como antioxidantes, anticancerígenas, cardioprotectoras, antiinflamatorias, antimicrobianas, inmunoestimulantes, moduladores de la microbiota, antienvjecimiento, antivirales y efectos antihipertensivos, entre muchas otras más, por lo que se han convertido en un foco de interés debido a sus efectos benéficos para la salud humana y con potencial para ser usados en la industria farmacéutica y alimentaria (Possamai-Rossatto *et al.*, 2021; Bouslamti *et al.*, 2022; Bonilla-Rodríguez *et al.*, 2023). La actividad antifúngica de estos compuestos está relacionada con la inhibición de la germinación de esporas de los hongos o por la inactivación de la síntesis de aminoácidos esenciales que inhiben el desarrollo de éstos (Redondo-Blanco *et al.*, 2020; Villota-Burbano y Vázquez-Ochoa, 2021).

2.3.1. Mecanismos de acción

Aunque son pocas las investigaciones con estudios de los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos para inhibir el crecimiento de los hongos, sobre todo fitopatógenos, las evidencias sugieren que inhiben el desarrollo fúngico a través de diversos mecanismos como la disrupción de la membrana plasmática, la inducción de disfunción mitocondrial y la inhibición de la formación de la pared celular, la división celular, la síntesis de ARN y proteínas, y el sistema de bombeo mediado por eflujo (Al Aboody y Mickymaray, 2020).

Las estructuras de los compuestos fenólicos permiten la difusión a través de la membrana microbiana y su penetración en la célula, donde pueden interferir en las vías metabólicas al

interferir con la síntesis de ergosterol, glucano, quitina, proteínas y glucosamina en hongos (Souza *et al.*, 2011). Su naturaleza hidrofóbica garantiza su distribución preferencial en la membrana lipídica, por lo que, su mecanismo de acción antifúngico depende principalmente de la capacidad de afectar la función de las membranas lipoproteicas celulares, provocando un deterioro de la homeostasis iónica celular, la acidificación del pH vacuolar y citosólico, e incluso, la destrucción de la integridad celular estructural (Zabka y Pavela, 2013). También, se ha descrito que los polifenoles actúan contra los hongos bloqueando la bomba de eflujo, afectando la membrana celular, interfiriendo con la síntesis de ergosterol, dañando la pared celular, o generando especies reactivas de oxígeno (ERO's). Los compuestos fenólicos pueden, potencialmente impactar la síntesis de ATP o el movimiento de iones Ca^{++} y K^{+} . Además, pueden causar daño a las mitocondrias de los hongos, generalmente debido a los efectos de las ERO's (Yamawaki *et al.*, 2019; Davidova *et al.*, 2024). Se ha evaluado el efecto antifúngico *in vitro* de diversos extractos vegetales como el extracto hidroalcohólico al 30 % de *Acacia farnesiana*, hoja de carambola 1 y 1.5 %, extracto fenólico de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*), extracto etanólico de chile habanero, serrano, jalapeño, morrón, *Sorghum bicolor*, *Moringa oleifera* y *Ligustrum lucidum*, extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* y, extractos metanólicos de hoja de vid silvestre (6, 8 y 12 % v/v), para su uso potencial en el control de hongos fitopatógenos por su contenido de compuestos fenólicos, donde se ha observado que estos extractos inhiben el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de esporas de diferentes hongos como *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium andiyazi*, *Cochliobolus* spp., *Macrophomina phaseolina* y *Botrytis cinerea* (Xoca-Orozco *et al.*, 2018; López-Muñoz *et al.*, 2019; León-Durán y Mancheno-Cárdenas, 2021; Rosas-Jauregui *et al.*, 2021). En el cuadro 6, se muestran algunos mecanismos de acción propios de cada grupo fenólico.

Cuadro 6. Mecanismos de acción de compuestos fenólicos.

Compuesto fenólico	Mecanismo de acción	Referencia
Compuestos fenólicos	Formación de complejos con proteínas solubles y extracelulares ocasionando disrupción de la pared celular.	Rodríguez-Maturino <i>et al.</i> , 2015.
	Alteración de la funcionalidad de la membrana, inactivación de enzimas celulares y desestabilización de la homeostasis celular redox y/o el sistema antioxidante.	López-Muñoz <i>et al.</i> , 2019
	Inhibición enzimática por oxidación de compuestos, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilos o a través de otras interacciones no específicas con proteínas.	García-Hernández <i>et al.</i> , 2016.
Flavonoides	Inhibición de rutas enzimáticas vitales, como el sistema enzimático P450 oxidasa-dependiente, mediante el bloqueo de las enzimas hidrolasas esteroides.	Rodríguez-Maturino <i>et al.</i> , 2015.
	Inhibición de enzimas entre las que se encuentran: hidrolasas: β -glucuronidasa, hialuronidasa, fosfatasa alcalina, aril-sulfatasa, ATPasa H ⁺ de las membranas lisosomal y granular; liasas: DOPA decarboxilasa; transferasas: catecol o metiltransferasa; hidroxilasas: aril hidroxilasa; oxidoreductasas: aldosa reductasa y quinonas: hexoquinasas.	García-Hernández <i>et al.</i> , 2016.
Cumarinas	Ejercen actividad fotosensibilizante sobre las células, la cual se manifiesta como fototoxicidad que altera y desorganiza numerosos procesos biológicos en diferentes tipos de células.	García-Hernández <i>et al.</i> , 2016.
Quinonas	Las quinonas se unen con adhesinas superficiales expuestas, polipéptidos de la pared celular, enzimas unidos a la membrana y forman complejos que inactivan las enzimas.	
Polifenoles	Actúan sobre la membrana citoplasmática, produciendo cambios en su permeabilidad, ocasionando la liberación de contenido celular, coagulación del material citoplasmático y desorganización de organelos y membrana celular.	Apolonio-Rodríguez, <i>et al.</i> , 2017
Taninos	Inhibición de la síntesis de proteínas	Rodríguez-Pedroso <i>et al.</i> , 2012
Fenoles	Inhibición enzimática por oxidación de compuestos	Rodríguez-Pedroso <i>et al.</i> , 2012

2.3.2. Compuestos fenólicos en recubrimientos de quitosano

Debido a las propiedades antimicrobianas del quitosano, se ha evaluado su uso como biopolímero activo para recubrimientos comestibles combinado con extractos de plantas capaces de potenciar las propiedades antimicrobianas de los recubrimientos y por lo tanto la capacidad protectora. Entre las moléculas bioactivas de origen vegetal que se han estudiado se encuentran los compuestos fenólicos debido a su actividad antimicrobiana, por lo que se han evaluado diversos recubrimientos de quitosano con este tipo de extractos (Bajić *et al.*, 2019; Matei *et al.*, 2020; Zemljč *et al.*, 2022).

Alves-Gomes *et al.* (2020), evaluaron un recubrimiento de quitosano con extracto rico en fenólicos de subproducto del procesamiento de acerola (*Malpighia emarginata* DC) o jabuticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) para controlar la pudrición causada por *Lasiodiplodia* spp. en frutos de papaya, en los extractos se encontraron diferentes compuestos fenólicos, incluidos flavonoides, estilbenos, taninos y ácidos fenólicos. Los recubrimientos de quitosano combinados con extractos de acerola o jabuticaba inhibieron el desarrollo de podredumbre en frutos de papaya infectados artificialmente con *Lasiodiplodia* durante 8 días de almacenamiento a temperatura ambiente sin afectar los parámetros fisicoquímicos de calidad poscosecha de frutos de papaya.

Recubrimientos de quitosano 2% con extracto de té verde cúrcuma (1, 3 y 5 % v/v) o extracto de cúrcuma (1, 3 y 5 % v/v) prolongaron la vida útil de fresa poscosecha. Los recubrimientos de quitosano con extracto de cúrcuma 5% y, extracto de té verde 5% + extracto de cúrcuma 5% inhibieron la proliferación de *B. cinerea* en fresas después de 7 días de almacenamiento, mientras que, las fresas sin recubrimiento presentaron síntomas de descomposición severa después de 10 días de almacenamiento con síntomas de la enfermedad de moho gris causada por *B. cinerea*. Además, las fresas con recubrimientos de quitosano con los extractos tuvieron un mayor contenido fenólico al finalizar el almacenamiento de 8 días, en comparación con el control sin recubrimiento y la aplicación de los recubrimientos no afectó significativamente las propiedades sensoriales de las fresas. Los principales compuestos fenólicos encontrados en los extractos fueron ácido cafeico, ácido clorogénico, catequina, epicatequina, ácido quínico y

únicamente en el extracto de cúrcuma se encontró adicionalmente curcumina (Yang *et al.*, 2022).

Yang *et al.* (2014), formularon un recubrimiento de quitosano 2% con extracto de hoja de arándano (4, 8 y 12 % p/v) aplicado en arándano almacenado durante 35 días a 2°C. En comparación con el control, los recubrimientos de quitosano adicionados con extracto de hoja de arándano retrasaron la descomposición y la pérdida de peso, manteniendo el contenido fenólico total y la capacidad de eliminación de radicales de la fruta en almacenamiento. Los ácidos gálico, cafeico, vainílico, sirínico, p-cumárico, quercetina y kaempferol fueron detectados en el extracto de hoja de arándano por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

2.4. ANTECEDENTES DIRECTOS

El aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) se caracteriza por contener una semilla rica en fitoquímicos que le proporcionan diversas propiedades biológicas al fruto (Ramos-Jerez, 2013; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021). El aguacate alberga más de 20 grupos de compuestos con actividad biológica, entre ellos ácidos grasos de cadena larga y sus derivados (avocatinas, pahuatinas, perseninas y alcoholes grasos polihidroxilados), los cuales han mostrado actividades anticancerosas y actividad antimicrobiana (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021).

Guzmán-Rodríguez *et al.* (2013), identificaron la defensina PaDef en la pulpa de este fruto, la cual fue expresada en una línea celular endotelial, mostrando actividad contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Guzmán-Rodríguez *et al.* (2016), evaluaron la citotoxicidad de esta defensina PaDef en una línea celular de cáncer de mama, inhibiendo la viabilidad e induciendo apoptosis de las células cancerosas. Extractos crudos de raíz de árboles de aguacate criollo inhibieron el crecimiento micelial *in vitro* del oomiceto *P. cinnamomi* y se identificó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) al estigmastán-3,5-dieno (C₂H₄) como el compuesto mayoritario (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009).

Guillén-Andrade *et al.* (2019) realizaron la caracterización del perfil químico de 54 colecciones de *P. americana* var. *drymifolia* provenientes del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, encontrando la presencia de 47 metabolitos secundarios, algunos de ellos ya reportados en *P. americana* y especies afines como el α -pineno, sabineno, β -pineno, β -cis-ocimeno, estragol, óxido de cariofileno, limoneno, escualeno, cariofileno, α -humuleno, copaeno, cubenol, decano, fenil etil alcohol, metileugenol, nerolidol (E), tetradecanal, γ -elemeno, linolenato de etilo, ácido hexadecanoico, hexadecanoato de metilo, el mirceno y ácido oleico y, algunos otros compuestos no reportados para esta especie como el 4,8,13-duxatrien-1,3-diol, el cis,cis,7,10-hexadecadienal y el cis,cis,cis-7,10,13-hexadecatrienal.

El extracto etanólico de hojas de *P. americana* var. *drymifolia* cultivar María Elena presentó efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) con una concentración mínima inhibitoria de 100 $\mu\text{g/mL}$ y con una concentración mínima bactericida (CMB) de 100-200 $\mu\text{g/mL}$. Los compuestos fenólicos encontrados en el extracto en su mayor parte eran flavonoides derivados de apigenina, catequina y quercetina, los cuales provocaron una alteración de distintos procesos bacterianos como, comunicación bacteriana, factores de virulencia y patogénesis, regulación de la membrana, síntesis de ácidos grasos de la membrana plasmática, síntesis de proteínas y resistencia a antibióticos β -lactámicos (García-Moreno, 2017).

También se han identificado acetogeninas, que son policétidos derivados de ácidos grasos de cadena larga cuya estructura base es el ácido linoleico, que tienen una función importante en la protección de la planta contra patógenos (Rodríguez y Trumble *et al.*, 2000). Estas presentan propiedades citotóxicas contra líneas celulares de cáncer de colon, hígado, vejiga y glioblastoma. Estas propiedades incluyen la inducción de la apoptosis, así como la detención del ciclo celular (Lara-Márquez *et al.*, 2020; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021).

La mayor parte de la investigación se ha realizado en la fracción lipídica del aceite de la semilla de aguacate nativo, de la cual se han extraído una mezcla de moléculas denominadas LEAS por sus siglas en inglés, responsables de los efectos citotóxicos en diferentes líneas celulares de

cáncer, promoviendo varias actividades biológicas, como la activación de la apoptosis, la pérdida del potencial de membrana y la detención del ciclo celular, entre otras. LEAS es rico en ácidos grasos de cadena larga y acetogeninas (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2021; Báez-Magaña *et al.*, 2019).

Es importante resaltar que la actividad biológica ha sido demostrada por los compuestos lipofílicos que componen el aceite de la semilla de aguacate y no de los componentes más polares como los ácidos fenólicos y los flavonoides. Sin embargo, este tipo de compuestos, en otras investigaciones se ha probado su efecto antifúngico además del antioxidante. En aguacate cv. Hass también se han determinado este tipo de compuestos con actividad biológica importante, sobre todo, provenientes de las semillas (Dabas *et al.*, 2013; Borja-Espín y Goetschel-Gómez, 2022).

Es por ello que, en esta investigación, la propuesta fue extraer por fraccionamiento líquido-líquido, la fracción acuosa (fracción polar) del aceite (FHS) extraída de las semillas de aguacate nativo mexicano, para determinar su efecto antifúngico *in vitro* y en los recubrimientos elaborados con quitosano, adicionados con la FHS, aplicados a frutos de aguacate cv. Hass inoculados con *C. gloeosporioides*.

3. JUSTIFICACIÓN

Con diversas investigaciones se ha demostrado la necesidad de realizar estudios que refuercen las propiedades antifúngicas del recubrimiento de quitosano, con la adición de compuestos o de extractos vegetales, debido a su contenido de compuestos fenólicos con actividad antifúngica. En la presente investigación, se propone el uso de la fracción hidrosoluble rica en compuestos fenólicos, obtenida del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), ya que estos han demostrado actividad antifúngica en bioensayos *in vitro*, con un alto potencial para enriquecer este recubrimiento, que potencien el poder antifúngico.

Se propone el desarrollo de una estrategia de un mayor uso del aguacate, en este caso las semillas del nativo mexicano o “criollo”, dirigidas a la preservación de frutos, entre ellos, el del aguacate comercial (cultivar Hass), para el control de enfermedades poscosecha, como la causada por *C. gloeosporioides*.

4. HIPÓTESIS

El recubrimiento de quitosano con la adición de la fracción hidrosoluble (rica en compuestos fenólicos) del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano potencia la actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* durante la preservación de frutos de aguacate cv. Hass.

5. OBJETIVOS

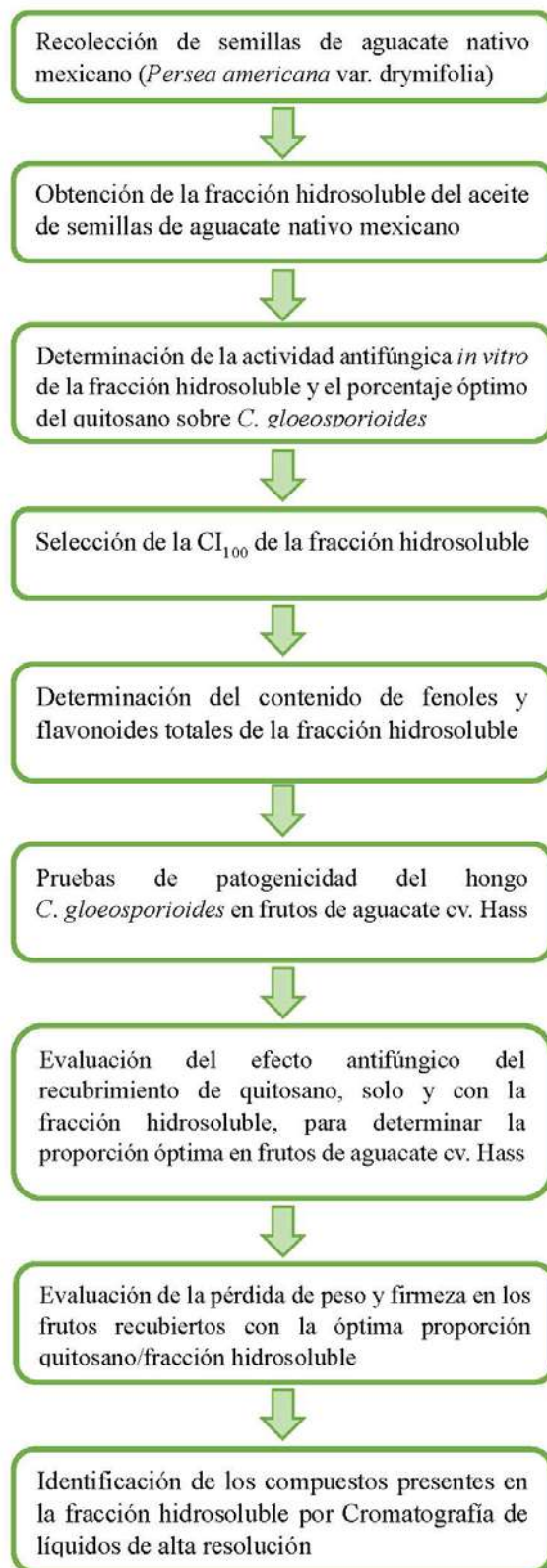
5.1. Objetivo general

Determinar el efecto antifúngico de un recubrimiento de quitosano adicionado con compuestos fenólicos del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano sobre *C. gloeosporioides* durante la preservación de frutos de aguacate cv. Hass.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto antifúngico *in vitro* de la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano y de quitosano sobre *C. gloeosporioides*, para obtener la concentración inhibitoria total (CI₁₀₀) y el porcentaje de mayor inhibición, respectivamente.
2. Determinar el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales de la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano sobre *C. gloeosporioides*.
3. Realizar ensayos de patogenicidad del hongo *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate cv. Hass, para confirmar su nivel de infección.
4. Evaluar el efecto antifúngico del recubrimiento de quitosano adicionado con la CI₁₀₀ de la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, durante condiciones de almacenamiento de frutos de aguacate cv. Hass.
5. Evaluar la firmeza y pérdida de peso en los frutos de aguacate, recubiertos con quitosano y la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, durante las condiciones de almacenamiento.
6. Identificar los principales compuestos fenólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución en la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. CAPÍTULO 1. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* del quitosano y de la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).

Resumen

Se obtuvo la fracción hidrosoluble (FHS) del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia* 'Schltdl. et Cham.' S.F. Blake) para determinar el contenido de fenoles (fenoles y flavonoides totales) y el efecto antifúngico sobre *Colletotrichum gloeosporioides* en ensayos *in vitro*. El aceite se obtuvo de semillas pulverizadas por extracción en soxhlet con hexano (7 h, 70°C) y llevado a sequedad en rotavapor al vacío (50°C) para la evaporación del solvente. La FHS fue obtenida por fraccionamiento líquido-líquido, empleando agua como disolvente de separación y concentrada a 10 mg/mL. La actividad antifúngica *in vitro* se determinó con la FHS y quitosano por el método de difusión de pozas en medio papa-dextrosa-agar aplicando 100µL de diferentes concentraciones de 0.01, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.10 mg/mL, y 1, 1.5, 2 y 2.5 %, respectivamente. Se usó benomyl50® (10 mg/mL) como control positivo (C+) y agua estéril con etanol (1:1) como control negativo (C-), utilizando un disco de 0.5 cm de diámetro de micelio del hongo como inóculo. Se obtuvo la CI₁₀₀ de la FHS y la concentración óptima antifúngica de quitosano, las cuales fueron 0.107 mg/mL y 2%, respectivamente. El contenido de fenoles totales para FHS fue de 104.04 mg Eq. Ácido Gálico/g ES y para flavonoides totales de 0.006 mg Eq. Quercetina/g ES, resultados que demuestran que la FHS es rica en ácidos fenólicos mayoritariamente, los que se sugiere sean los responsables de la actividad antifúngica.

Palabras clave: Aguacate, antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides*, compuestos fenólicos, fracción hidrosoluble, quitosano.

Objetivo

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* tanto de la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate mexicano y del quitosano, para determinar la concentración óptima antifúngica y obtener la concentración inhibitoria ya sea media (CI₅₀) o total (CI₁₀₀), sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Así mismo, se determinó la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales en la FHS con el propósito de relacionar su contenido con el efecto antifúngico.

Materiales y métodos

Material biológico

El hongo *C. gloeosporioides* fue aislado de frutos de aguacate y ha sido caracterizado molecularmente con la confirmación de género y especie, este hongo forma parte del cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (IIQB-UMSNH), donado por el Dr. Rodolfo López Gómez de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se mantiene bajo cultivo en medio papa-dextrosa-agar (PDA) a 25 °C. Las semillas de aguacate nativo mexicano se recolectaron de frutos maduros, obtenidos en huertos de la región de Ziracuaretiro, Michoacán (19.417988 N -101.897950 O).

Obtención de la FHS del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano

Para la obtención de la fracción hidrosoluble (FHS) del aceite de las semillas de aguacate nativo mexicano, primeramente, se extrajo el aceite de las semillas de aguacate nativo mexicano, previamente congeladas a -20°C y pulverizadas con nitrógeno líquido en licuadora. El aceite se obtuvo con un equipo soxhlet, utilizando por cada extracción, 75 g de semillas pulverizadas por 1000 mL de hexano con un tiempo de extracción de 7 h, a 70°C; esto se realizó hasta completar los 1000 g de muestra (Báez-Magaña *et al.*, 2019). Mediante un rotavapor al vacío a 50°C, se evaporó el hexano hasta la obtención del aceite libre del disolvente, el cual se sometió a bipartición líquido-líquido (fraccionamiento), utilizando agua como disolvente de separación para conseguir la FHS. Se utilizó un embudo de separación, realizando la separación en una proporción de 2:1 (2 partes de agua y una de aceite), la fracción acuosa se evaporó a sequedad en rotavapor al vacío (60°C) para prepararla a una concentración de 10 mg/mL con agua destilada estéril y etanol (1:1), la cual se almacenó en refrigeración y oscuridad, hasta su uso y análisis. El etanol se utilizó solamente como vehículo para evitar la contaminación microbiana de la FHS.

Preparación de solución de quitosano

El quitosano de peso molecular medio (Sigma Aldrich) con grado de desacetilación entre 75% - 85% con respecto a la quitina proveniente de los caparzones de cangrejo, fue utilizado para la preparación de una solución acuosa de quitosano, de acuerdo a lo descrito por Bautista y

Bravo (2004) al 1%, 1.5%, 2% y 2.5%, las que fueron activadas con ácido acético 1% y mantenidas en agitación por 24 h a 120 rpm para después ajustar el pH 5.5. Finalmente se esterilizaron a 120 Lb de presión durante 15 min.

Actividad antifúngica *in vitro* de la FHS y quitosano

Para la determinación de la actividad antifúngica de la FHS y quitosano, se realizó el ensayo *in vitro* de pozas sobre micelio de *C. gloeosporioides* (Magaldi *et al.*, 2004), utilizando 0.010, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.10 mg/mL de FHS para obtener la concentración inhibitoria total (CI100) y el porcentaje óptimo antifúngico del quitosano (1.0, 1.5, 2.0 y 2.5%). Se utilizó agua destilada estéril con etanol (1:1) como control negativo (C-) y ácido acético 1%, ya que fue utilizado en la solución de la preparación del quitosano. También se utilizó benomyl50® como control positivo (C+). En cada poza se adicionaron 100 µL de la fracción hidrosoluble, quitosano y de cada uno de los controles, colocando un segmento de micelio de 0.5 cm de diámetro del hongo crecido por 8 días en PDA. A los 8 días se obtuvieron los porcentajes de actividad antifúngica, que se calcularon de acuerdo a la fórmula reportada por Rutiaga (2001):

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{\text{Crecimiento de control} - \text{Crecimiento de tratamiento}}{\text{Crecimiento de control}} \right) \times 100$$

Determinación del contenido total de fenoles y flavonoides de la FHS

La determinación de fenoles y flavonoides totales de la FHS (1 mg/mL) fue realizada por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999; Rodríguez-Valdovinos *et al.*, 2021) y de Mahboubi *et al.* (2013), respectivamente. Los resultados se presentan en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg Eq. AG/g ES) y equivalentes de miligramos de quercetina/g extracto seco (mg Eq. Q/g ES), respectivamente.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio, para los bioensayos *in vitro* se utilizó una n=5, en este último, se aplicaron cinco tratamientos con la fracción hidrosoluble y cuatro tratamientos con el quitosano. En la determinación de fenoles y flavonoides totales, se utilizó

una $n=3$. Cada experimento fue repetido dos veces. Se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el software JMP11.

Resultados y discusión

El rendimiento final de la fracción hidrosoluble (FHS) del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano por las técnicas utilizadas, fue de 0.12 %. La FHS presentó un pH de 10, aroma característico a anís y una coloración ámbar no transparente. La FHS se mantuvo en refrigeración y no presentó contaminación microbiana, permaneciendo su actividad antifúngica durante los dos años de la experimentación.

Actividad antifúngica *in vitro* de la FHS

Con la determinación de la actividad antifúngica con diferentes concentraciones de la FHS (0, 0.01, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.10 mg/mL) se obtuvieron los porcentajes de inhibición mediante la medición del diámetro (cm) del crecimiento, tomando como 100% de inhibición cuando no se presentó crecimiento de micelio, como lo observado con el control positivo (C+, benomyl50®) y sin inhibición (0%) a lo obtenido con el control negativo (C-, agua estéril con etanol, 1:1) o con ácido acético 1%, mostrando un crecimiento de 5 cm de diámetro a los 8 días del cultivo (Figura 3). Los porcentajes de inhibición sobre *C. gloeosporioides* con la aplicación de la FHS del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano fueron en orden creciente y proporcional a las concentraciones utilizadas, logrando un 100% de inhibición con 0.10 mg/mL (Figura 3A). Con estos valores se obtuvieron tanto la CI_{50} como la CI_{100} , con valores de 0.055 mg/mL y de 0.107 mg/mL, respectivamente (Figura 3B).

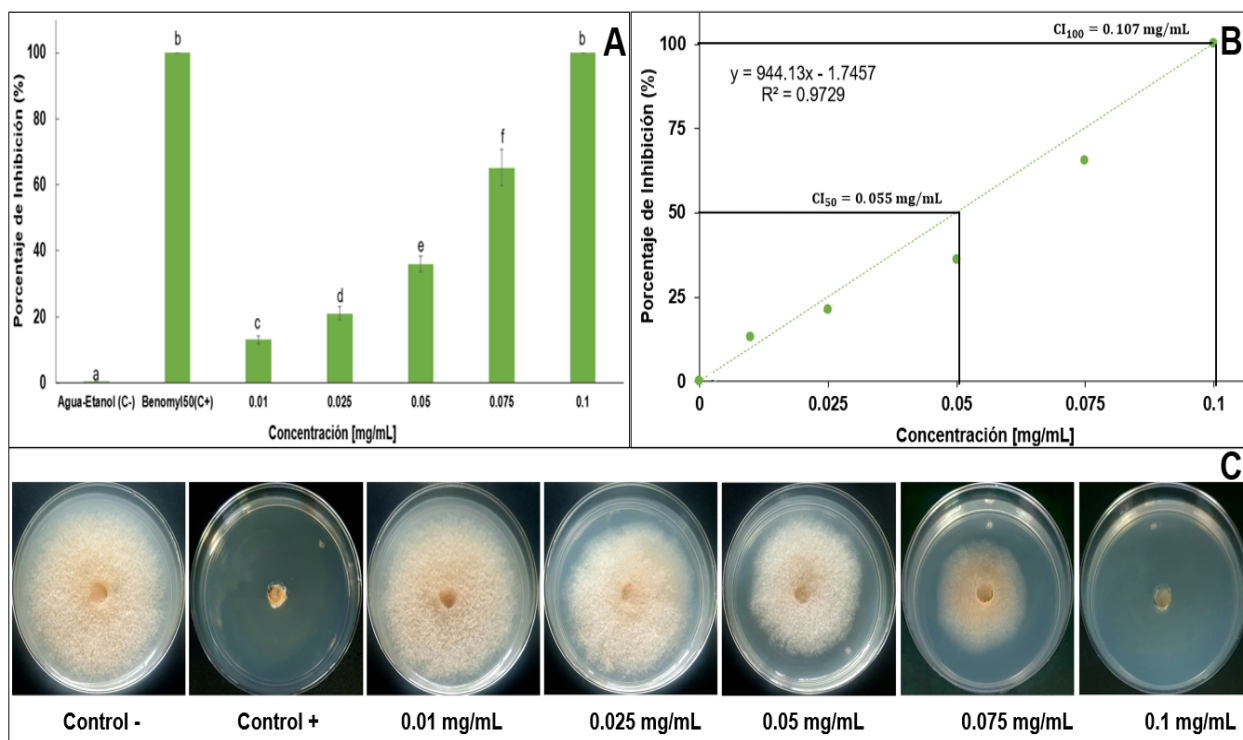


Figura 3. Porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de micelio con las diferentes concentraciones de FHS (A), curva de inhibición de concentraciones de FHS (B). Fotografías representativas del efecto de las diferentes concentraciones de la FHS (0.01, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.10 mg/mL), Control – (agua estéril con etanol (1:1) y Control + (benomyl50®). Determinación a los 8 días de cultivo. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

En la figura 3C se muestra el efecto de la FHS sobre el crecimiento de micelio *in vitro* sobre *C. gloeosporioides*, en la que se observan los diámetros de crecimiento correspondientes al C- (agua:etanol, 1:1), al C+ y a las diferentes concentraciones de la FHS. Con los resultados obtenidos se confirmó el efecto antifúngico de la FHS del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, con una CI₁₀₀ de 0.107 mg/mL sobre *C. gloeosporioides*.

Diversos extractos vegetales presentan actividad antifúngica y son considerados agentes con nula o baja toxicidad en el ambiente, por lo que son una alternativa a los fungicidas sintéticos en el control de hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides*. Tanto en estudios *in vitro* como *in situ* en frutos poscosecha de antracnosis, tanto en frutas como verduras, se ha reportado la actividad antifúngica de diversos extractos de plantas contra *C. gloeosporioides*, como los de

Aegle marmelos, *Ipomoea carnea* y *Pongamia pinnata*, los que a una concentración de 15 mg/mL inhibieron el crecimiento de micelio de este hongo en 74.85%, 63.23% y 54.89%, respectivamente (Satapathy *et al.*, 2018). La mayoría de las investigaciones se han realizado utilizando extractos crudos para probar el efecto sinérgico de las mezclas y varios estudios han demostrado un mayor efecto antifúngico cuando se utilizan disolventes polares durante la extracción, como agua, etanol y metanol. Bussaman *et al.* (2012) demostraron un alto efecto antifúngico (100%) sobre *C. gloeosporioides* con el extracto metanólico de hojas de *Piper sarmentosum* con la inhibición total de la germinación de esporas fúngicas a una concentración de 1.25 mg/mL; Kwodaga *et al.* (2019) obtuvieron un 76.1% de inhibición del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides* con el extracto acuoso de frutos de *Capsicum annum* y un 91.7% sobre la germinación de esporas; así mismo, España *et al.* (2017) observaron esta actividad alta sobre *C. gloeosporioides* con el extracto etanólico de *Eucalyptus camaldulensis* (5 mg/mL), que mostró un 98% de inhibición sobre el crecimiento fúngico.

En investigaciones realizadas con extractos de diferentes variedades o cultivares de aguacate, también se ha determinado el efecto antifúngico sobre *C. gloeosporioides*, encontrando cierta actividad con extractos etanólicos de semilla (Fagundes *et al.*, 2018), así como con el extracto acuoso de hojas (2:10 w/v) (Bautista-Baños *et al.*, 2002). Las concentraciones reportadas (CI₅₀ y CI₁₀₀) para la FHS de aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, son hasta 100 veces más bajas que las reportadas para otros extractos de composición química similar.

Actividad antifúngica *in vitro* del quitosano sobre *C. gloeosporioides*

La determinación de la actividad antifúngica con diferentes concentraciones del quitosano (1%, Q1; 1.5%, Q1.5; 2%, Q2; y, Q2.5, 2.5%), se obtuvieron como se menciona anteriormente para la FHS, mediante valores de porcentajes de inhibición, presentando únicamente actividad antifúngica las concentraciones de 2 y 2.5%, los que mostraron una alta inhibición sobre *C. gloeosporioides*, con una inhibición total (100 %) y de 34.4%, respectivamente, mientras que, en las concentraciones menores a estas, el porcentaje de inhibición fue nulo (0 %). Al adicionar la solución de ácido acético al 1%, no se presentó inhibición sobre el crecimiento del micelio del hongo, indicativo que éste no influye en la actividad antifúngica de la solución del quitosano.

En la figura 4 se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de quitosano sobre *C. gloeosporioides*, observándose los diámetros de crecimiento.

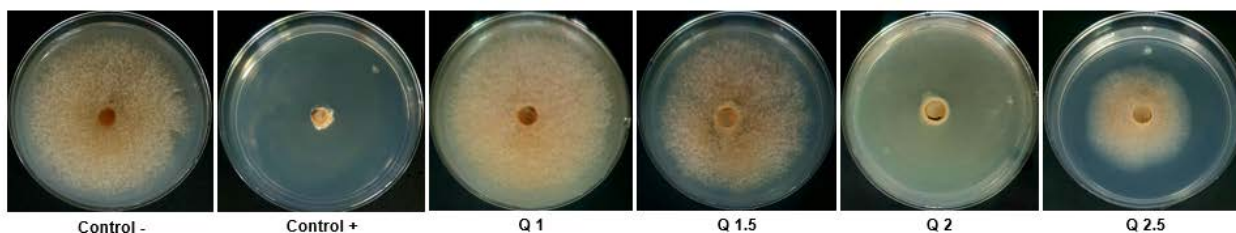


Figura 4. Fotografías del efecto de las diferentes concentraciones de quitosano sobre *C. gloeosporioides*. Control – (agua estéril con etanol (1:1) y Control + (benomyl50®) y los distintos porcentajes del quitosano 1% (Q1), 1.5% (Q1.5), 2% (Q2), y Q2.5 (2.5%). Determinación a los 8 días de cultivo (n=5).

Aunque en la mayoría de las investigaciones se ha demostrado una relación directa entre una alta concentración de quitosano con la actividad antifúngica, en otras investigaciones se ha observado que, a concentraciones menores o intermedias a las probadas, la actividad antifúngica es mayor, como la reportada por Muñoz *et al.* (2007), en la que la mayor actividad antifúngica fue con una concentración de 2 mg/mL de quitosano y menor con la de 2.5 mg/mL sobre *B. cinerea*.

Estos resultados demuestran el efecto antifúngico del quitosano sobre el hongo *C. gloeosporioides* a una concentración del 2%, inhibiendo el 100 % del crecimiento micelial. En diversas investigaciones, esta actividad antifúngica del quitosano se ha reportado y se sugiere su uso como una alternativa para el tratamiento poscosecha de frutas susceptibles a enfermedades fúngicas y así, prolongar su vida de anaquel (Chávez-Magdaleno *et al.*, 2019; Ramos-Guerrero *et al.*, 2020; García-Mateos *et al.*, 2023).

Bautista-Baños *et al.* (2003) evaluaron *in vitro* el efecto del quitosano (0.5, 1.5, 2.5 y 3.0 %) y los mejores resultados se obtuvieron con los porcentajes 2.5% y 3%, ya que, inhibieron completamente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, durante 7 días, mientras que en las concentraciones más bajas (0.5 y 1.5%), el crecimiento se vio retardado y comenzó al segundo y cuarto día, respectivamente. Berumen-Varela *et al.* (2015), utilizaron porcentajes de

quitosano al 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% y determinaron que todas alteraron el crecimiento de *Colletotrichum* sp., sin embargo, se observó mayor inhibición del crecimiento micelial con 1.5 y 2.0% sin diferencias significativas entre ambas, con un 41.79 y 44.77%, respectivamente. Además, el quitosano al 1.0, 1.5 y 2.0 % inhibió completamente la germinación de los conidios del hongo. Gutiérrez-Martínez *et al.* (2017), obtuvieron aislados de *Colletotrichum* de frutos de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) cv. Tommy Atkins y plátano cv. 'Enano gigante' (*M. acuminata* AAA) y evaluaron el efecto antifúngico del quitosano (0.5, 1.0 y 1.5%) sobre estas tres cepas de hongo. El efecto antifúngico del quitosano influyó en la inhibición del crecimiento micelial y esta actividad fue diferente de acuerdo a la cepa de *Colletotrichum*, ya que la mayor inhibición se obtuvo con el aislado de plátano, con una concentración de quitosano del 1%, con un crecimiento nulo (0%) del hongo a los 12 días de incubación. Además, la incidencia de la enfermedad con la aplicación de recubrimientos de quitosano al 1% en los mismos frutos, disminuyó en un 80% en la guanábana y un 100% en mango y plátano.

De igual forma, en investigaciones previas, se ha evaluado el efecto *in vitro* del quitosano sobre *Colletotrichum* sp. de cepas aisladas de frutos de aguacate, como lo reportan Xoca-Orozco *et al.* (2018), quienes evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de quitosano de bajo y medio peso molecular sobre dos cepas de *Colletotrichum* sp. aislados de frutos de aguacate Hass con síntomas de antracnosis, utilizando soluciones de quitosano al 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 % (p/v) para la evaluación de la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas, registrando las mediciones cada 24 h durante 9 días. Las pruebas *in vitro* de la actividad antifúngica del quitosano sobre las cepas aisladas de *Colletotrichum* sp., demostró que tanto el quitosano de bajo peso molecular como el de medio peso molecular mostraron el menor crecimiento micelial en las concentraciones más altas evaluadas (1.5 y 2.0%). En cuanto a la esporulación de las cepas identificadas (AG1 y AG3), el quitosano de bajo peso molecular disminuyó la esporulación en un 29 y 51 %, respectivamente, mientras que el quitosano de medio peso molecular, redujo la esporulación en un 47 y 45 %. Los porcentajes de quitosano al 0.1, 0.5 y 1.0 % redujeron la germinación de esporas, sin embargo, estas fueron completamente inhibidas con quitosano al 1.5 % y 2.0%, tanto en soluciones de bajo y medio peso molecular. Así mismo, Chávez-Magdaleno *et al.* (2019) evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* del

quitosano (0.1, 0.5 y 1.0 %) sobre *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* aislados de aguacate (*P. americana*). Con el porcentaje más alto de quitosano (1.0 %), se obtuvo un 17 y 21 % de inhibición del crecimiento micelial en *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, respectivamente, observándose diferencia significativa.

El efecto en la inhibición del crecimiento micelial del quitosano puede ser atribuido a su carácter catiónico, por la interacción electrostática de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared celular del hongo, cambiando la permeabilidad de la membrana plasmática y liberando contenido intracelular (Ca^+ , K^+ y proteínas), permitiendo su entrada al citoplasma, uniéndose a objetivos como el ADN y ARN cargados negativamente y, por lo tanto, inhibiendo el crecimiento del hongo (Jiménez-Mejía *et al.*, 2018; Ramos-Guerrero *et al.*, 2018).

Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales de la FHS

Entre los metabolitos secundarios, los compuestos fenólicos (como fenoles y flavonoides) se caracterizan por tener actividad antifúngica. El efecto de estos compuestos se ha observado principalmente en hongos causantes de enfermedades en plantas como *C. gloeosporioides* (Pietarinen *et al.*, 2006).

El contenido de fenoles totales de la FHS fue de 104.04 mg Eq. Ácido Gálico/g ES y el de flavonoides totales de 0.006 mg Eq. Quercetina/g ES, resultados indicativos que la FHS es rica mayormente en ácidos fenólicos, lo que se relaciona con la actividad antifúngica obtenida en los ensayos *in vitro*. Lo anterior se ha reportado debido a los compuestos de naturaleza fenólica, identificados en los extractos polares y de polaridad intermedia de diversos extractos vegetales (Baka *et al.*, 2020). Dicko *et al.*, (2005) y Visioli *et al.* (2011) reportan a los compuestos fenólicos de plantas con un alto potencial de inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos. En los últimos años se han identificado ácidos fenólicos, flavonoides y taninos como los principales grupos con actividad antifúngica y los extractos que los contienen se han convertido en un foco de investigación con una importancia práctica en el desarrollo de compuestos antifúngicos (Lima *et al.*, 2019).

La concentración de ácidos fenólicos cuantificados como equivalentes de ácido gálico, varía según la planta y el método de extracción, se ha reportado para una gran diversidad de plantas un intervalo de 4.44 a 181.91 mg Eq. Ácido gálico/g peso seco, mientras que otras presentan valores menores a 92.4 mg Eq. Ácido gálico/g peso seco. Mientras en té verde presenta 1341 mg Eq. Ácido gálico/100 ml extracto, el té negro muestra tan solo 0.052 mg E Ácido gálico/100 ml. Los frutos rojos presentan un contenido de 3.92 a 19.82 mg Eq. Ácido Gálico/g peso fresco (Rossi *et al.*, 2022).

Con estos resultados se seleccionó la CI total de la FHS para ser utilizada en los recubrimientos de quitosano que se utilizaron en frutos poscosecha de aguacate cv. Hass, para determinar el efecto antifúngico sobre *C. gloeosporioides*.

Conclusiones

Tanto de la FHS como el quitosano presentaron actividad antifúngica sobre *C. gloeosporioides*, obteniendo la CI_{100} (0.107 mg/mL) de la FHS, así como el porcentaje óptimo antifúngico del quitosano (2.0 %).

La FHS de aceite de semillas de aguacate nativo mexicano presentó un alto contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales), lo que se sugiere sean los responsables de la actividad antifúngica.

7.2. CAPÍTULO 2. Efecto antifúngico de recubrimientos de quitosano adicionados con la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en frutos poscosecha de aguacate cv. Hass infectados con *Colletotrichum gloeosporioides*

Resumen

Se evaluó la actividad antifúngica de recubrimientos de quitosano (1, 1.5, 2 y 2.5%) solo y adicionados con la CI₁₀₀ (0.177 mg/mL) de la fracción hidrosoluble (FHS) del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre el control de la infección por *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la enfermedad antracnosis en frutos de aguacate cv. Hass en poscosecha. Para asegurar la infectividad de *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate cv. Hass, se realizó la prueba de patogenicidad con la aplicación de una solución de 1×10^3 esporas/mL en la zona central del pedúnculo, empleando como control negativo (C-), frutos tratados con agua estéril sin esporas y como control positivo (C+), frutos tratados con benomyl50® (10 mg/mL). Los frutos inoculados se almacenaron en frío (7 días a 10°C) y para cortar la cadena de frío, posteriormente se incubaron a 25°C durante 7 días, para determinar el nivel de infección causado por el hongo, usando una escala cualitativa con valores de índice de severidad (IS) y evaluar la pérdida de peso y firmeza. Para la prueba de patogenicidad, los frutos fueron inoculados y almacenados por 7 días del cultivo a 25°C, utilizando el control + y el control -, confirmando la patogenicidad de la cepa en los frutos de aguacate cv. Hass inoculados con esporas de *C. gloeosporioides*, ya que se observó una infección en todo el mesocarpio (IS 4), presentándose los síntomas de la antracnosis. Los frutos tratados con benomyl50® (C+) mostraron una IS de 1, mientras que en los frutos tratados únicamente con agua estéril (sin esporas) (C-) no se presentaron los síntomas de infección (IS0), indicativo de la inocuidad de los frutos. Para los recubrimientos, se utilizó quitosano proveniente del caparazón de cangrejo (Sigma Aldrich), preparado con ácido acético al 1% como medio de disolución (pH 5.5.). Los tratamientos fueron frutos recubiertos solo con quitosano o con la CI₁₀₀ de la FHS, así como con los respectivos controles, además de un control únicamente con agua estéril. La aplicación de los recubrimientos se realizó por inmersión directa de los frutos en la solución formadora de película y una vez secos, fueron inoculados con esporas (1×10^3 /mL) del hongo, para finalmente almacenarlos en las condiciones antes mencionadas. Pasado el periodo de incubación se observó que con el 2.5% de quitosano (Q2.5) se obtuvo un 75% de inhibición (IS 1), presentando lesiones menores necróticas cerca al pedúnculo. Con el control negativo (agua estéril, sin inoculación), los frutos se mantuvieron inocuos durante la experimentación (IS 0), aunque con el control negativo (agua-etanol, con inoculación) se observó un IS de 4, con una infección de hasta el 97.5%. Los frutos recubiertos con quitosano, adicionados con la CI₁₀₀ de la FHS, mostraron una mayor actividad antifúngica que con quitosano solo, obteniendo que con 2.5% de quitosano (Q2.5 + FHS) se obtuvo el porcentaje mayor de inhibición (94.5%, IS 1). Con los recubrimientos, se logró reducir el porcentaje de pérdida de peso y mantener la firmeza durante el almacenamiento de los frutos a las condiciones mencionadas anteriormente en frutos inoculados y sin inocular con esporas de *C. gloeosporioides*, observándose los mejores resultados con Q2.5 + FHS con 3.12 y 3.51 % de pérdida de peso en frutos sin y con inoculación, respectivamente, y firmeza de 16.56 y 14.83 kg/cm² sin y con inoculación de esporas, respectivamente. Con estos resultados se demuestra una mayor actividad antifúngica en frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano al 2.5% adicionados con la CI₁₀₀ de la FHS. Estos frutos presentaron una mayor vida de anaquel con un mínimo de síntomas de la antracnosis.

Palabras clave: Aguacate, *C. gloeosporioides*, fracción hidrosoluble, quitosano, recubrimientos comestibles.

Objetivo

En la presente investigación se determinó el efecto antifúngico de los recubrimientos de quitosano solo (1%, 1.5%, 2% y 2.5%) y adicionados con la CI₁₀₀ de la FHS (Q1 + FHS, Q1.5 + FHS, Q2 + FHS, y Q2.5 + FHS) sobre frutos de aguacate cv. Hass inoculados con *C. gloeosporioides* para su control en poscosecha.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron frutos de aguacate cv. Hass en madurez fisiológica, obtenidos de un huerto comercial en Huáncito, Michoacán (19.848469 N -102.067543 O). El hongo *C. gloeosporioides* fue aislado de frutos de aguacate y ha sido caracterizado molecularmente con la confirmación de género y especie, este hongo forma parte del cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (IIQB-UMSNH), donado por el Dr. Rodolfo López Gómez de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se mantiene bajo cultivo en medio papa-dextrosa-agar (PDA) a 25 °C. Las semillas de aguacate nativo mexicano se recolectaron de frutos maduros, obtenidos en huertos de la región de Ziracuaretiro, Michoacán (19.417988 N -101.897950).

Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad del hongo se evaluó en frutos de aguacate cv. Hass para asegurar el nivel de infección con la aplicación de una solución de esporas (1×10^3 esporas/mL). Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial 10% por 10 min con tres enjuagues con agua estéril en área estéril. Para la inoculación se realizó una pequeña incisión en la zona central del pedúnculo (2 mm de profundidad) y en la herida se colocaron 100 µL de la suspensión con esporas. Las esporas se obtuvieron con la adición de agua estéril sobre el micelio del hongo crecido por dos semanas en PDA. Como control negativo (C-) se usaron frutos tratados con agua estéril sin esporas y como control positivo (C+), frutos tratados con benomyl50® (1-benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo, 10 mg/mL). Los frutos de los diferentes tratamientos se colocaron en contenedores de plástico estériles y se incubaron, primero por 7 días a 10°C y posteriormente a 25°C durante 7 días más, finalmente se determinó el nivel de infección en los

frutos causado por *C. gloeosporioides* (Gatto *et al.*, 2011), realizando un corte longitudinal a la mitad de cada uno de los frutos.

La infección se registró mediante un índice de severidad (IS) cualitativo de la enfermedad, causada por el hongo, conforme a la escala reportada y modificada por Ramírez *et al.* (2020), quienes reportaron una escala visual de acuerdo a los síntomas observados durante la infección en el mesocarpio: 0, frutos sin síntomas; 1, 1-25%, con infección o lesiones necróticas cerca al pedúnculo; 2, 26-50%, con infección hasta la parte media del fruto, cercana a la semilla; 3, 51-75%, con infección leve en todo el mesocarpio; 4, 76-100%, con infección severa en todo el mesocarpio.

Obtención de la FHS del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano

Para la obtención de esta fracción, primeramente, se extrajo el aceite de las semillas de aguacate nativo mexicano, previamente congeladas a -20°C y pulverizadas con nitrógeno líquido en licuadora. El aceite se obtuvo con un equipo soxhlet, utilizando por cada extracción, 75 g de semillas pulverizadas por 1000 mL de hexano con un tiempo de extracción de 7 h, a 70°C; esto se realizó hasta completar los 1000 g de muestra (Báez-Magaña *et al.*, 2019). Mediante un rotavapor al vacío a 50°C, se evaporó el hexano hasta la obtención del aceite libre del disolvente, el cual se sometió a bipartición líquido-líquido (fraccionamiento), utilizando agua destilada como disolvente de separación para conseguir la fracción hidrosoluble con compuestos fenólicos (fenoles y flavonoides). Se utilizó un embudo de separación, realizando la separación en una proporción de 2:1 (2 partes de agua y una de aceite). La fracción acuosa se evaporó a sequedad en rotavapor al vacío (60°C) para prepararla a una concentración de 10 mg/mL con agua destilada estéril y etanol (1:1), la cual se almacenó en refrigeración y oscuridad, hasta su uso y análisis.

Preparación de la solución de quitosano

El quitosano de peso molecular medio (Sigma Aldrich) con grado de desacetilación entre 75% - 85% con respecto a la quitina proveniente de los caparazones de cangrejo, fue utilizado para la preparación de los recubrimientos. La solución acuosa de quitosano se preparó por el método descrito por Bautista y Bravo (2004) al 1%, 1.5%, 2% y 2.5%, soluciones que fueron activadas

con ácido acético 1% y mantenidas en agitación por 24 h a 120 rpm para después ajustar el pH 5.5. Finalmente se esterilizaron a 120 Lb de presión durante 15 min.

Efecto antifúngico de recubrimientos de quitosano adicionados con la FHS en frutos de aguacate cv. Hass inoculados con *C. gloeosporioides*

En campana de flujo laminar se realizó el recubrimiento de los frutos, utilizando cuatro diferentes porcentajes de quitosano solo (Q1, 1%; Q1.5, 1.5%; Q2, 2%; y, Q2.5, 2.5%) y con la adición de la CI₁₀₀ de la FHS (Q1 + FHS; Q1.5 + FHS; Q2 + FHS; y, Q2.5 + FHS), por el método de inmersión directa, mediante el cual, los frutos fueron inmersos en vaso de precipitado con cada solución, hasta asegurar el completo recubrimiento del fruto, para finalmente dejarlos secar durante 30 min en área estéril.

Los frutos fueron previamente desinfectados con hipoclorito de sodio comercial al 10% por 10 min con tres enjuagues de agua estéril en área estéril, e inoculados como se describe en las pruebas de patogenicidad. Como control negativo (C-), los frutos fueron tratados con agua estéril y etanol (1:1) con esporas y como control positivo (C+), los frutos fueron tratados con el fungicida comercial benomyl50® a 10 mg/mL, además se utilizó un tratamiento control únicamente con agua estéril, sin esporas. Los frutos con los diversos tratamientos fueron almacenados y se les determinó el porcentaje de inhibición y el índice de severidad, realizando un corte a la mitad de éstos, como se indica en el ensayo de pruebas de patogenicidad, al final del almacén de los 14 días (7 días a 10° C y 7 días a 25° C).

Determinación de pérdida de peso

La pérdida de peso se realizó por gravimetría empleando una báscula digital. El peso de cada fruto se registró en el día inicial del tratamiento hasta el día final del almacenamiento. La diferencia de masa se expresó como porcentaje de pérdida de peso con respecto a la masa inicial, con la siguiente formula (González-Chavarro *et al.*, 2021):

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \left(\frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100$$

Determinación de firmeza

Después del almacenamiento por 7 días a 10°C y 7 días más a 25°C (14 días post-inoculación) se determinó la firmeza de los frutos, utilizando un penetrómetro digital, provisto de una sonda de acero inoxidable de 8 mm de diámetro. Los valores se expresaron en kgf/cm² como la fuerza necesaria para penetrar la pulpa en la zona ecuatorial del fruto (Márquez *et al.*, 2009).

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio, para los experimentos en frutos recubiertos, se aplicaron cuatro tratamientos con quitosano solo (Q1, Q1.5, Q2 y Q2.5), cuatro tratamientos con quitosano adicionado con la CI₁₀₀ de la FHS (Q1 + FHS; Q1.5 + FHS; Q2 + FHS; y, Q2.5 + FHS), un control negativo (C-, agua estéril y etanol, 1:1), un control positivo (C+, benomyl50®) y un control con agua estéril sin esporas (n=7). Para la determinación de la pérdida de peso y firmeza se utilizaron los frutos de los tratamientos siguientes: Q 2.5 % con y sin esporas, Q2.5 + FHS con y sin esporas, un control negativo (C-, agua estéril y etanol, 1:1), un control positivo (C+, benomyl50®) y un control con agua estéril sin esporas (n=7). Cada experimento fue repetido dos veces y se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el software JMP11.

Resultados y discusión

Pruebas *in vitro* de patogenicidad

Con la obtención del nivel de infección mediante las pruebas de patogenicidad con la inoculación de esporas de *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate cv. Hass durante el almacenamiento a 10°C por 7 días, no se observaron frutos con síntomas de la enfermedad causada por el hongo, pero al almacenarlos a 25°C por 7 días más, se observó la sintomatología de la enfermedad solamente en aquellos frutos inoculados con esporas (Figura 5A), presentando un índice de severidad (IS) de 4, correspondiente a un porcentaje mayor al 76% de infección en el mesocarpio, indicativo de que la inoculación con las esporas de *C. gloeosporioides* fue efectiva para provocar la infección de los frutos. Con estos resultados se demostró la patogenicidad del hongo en frutos de aguacate cv. Hass y se estableció el inóculo (1×10^3 esporas/mL) para desarrollar la enfermedad bajo las condiciones de almacenamiento

establecidas en la presente investigación. Así mismo, se determinó que todos los frutos inoculados (n=7) mostraron los síntomas de la enfermedad (antracnosis).



Figura 5. Frutos de aguacate cv. Hass a los 7 días del almacenamiento a 25°C, después del almacenamiento a 10°C por 7 días: **A**, Inoculado con 1×10^3 esporas/mL de *C. gloeosporioides*, sin tratamiento; **B**, Control + (benomyl50, 10 mg/mL, con esporas); **C**, Control – (agua estéril, sin esporas) (n=7).

Los frutos inoculados y tratados con el fungicida (benomyl50), mostraron una infección incipiente, con un IS de 1, con solo el avance de síntomas cerca al pedúnculo (Figura 5B), esta respuesta indica la efectividad del fungicida sobre la inhibición de la germinación de esporas y del crecimiento de micelio en el mesocarpio, la que a la concentración probada no ejerció un 100% de efecto antifúngico. En la figura 5C, se observa un fruto sin síntomas, con la aplicación solo de agua estéril (sin esporas), demostrando una óptima maduración durante la vida de anaquel (14 días) sin presentar síntomas, lo que aseguró la inocuidad de los frutos.

Las lesiones observadas en el mesocarpio de los frutos de aguacate cv. Hass, inoculados con *C. gloeosporioides*, corresponden a lo descrito para los síntomas característicos de la antracnosis, como la capacidad de ingresar por la zona peduncular y causar el pardeamiento de haces vasculares leve, moderada y severa (Fischer *et al.*, 2019; Soto *et al.*, 2020). De forma natural, *C. gloeosporioides* llega al fruto en forma de esporas o conidios y se lleva a cabo un proceso de reconocimiento, adhesión y fijación al fruto; una vez que hay las condiciones adecuadas como humedad y temperatura, ocurre la ruptura directa, en donde la espora produce el tubo germinativo, el cual desarrolla un apresorio, que sintetiza enzimas que degradan ceras epicuticulares para después generar presión y fijarse a las células del epicarpio del fruto. Posteriormente inicia la infección, mediante el crecimiento de las hifas, las cuales permanecen

en estado latente hasta que el fruto madura después de la cosecha. En precosecha o durante el almacenamiento a bajas temperaturas ($<10^{\circ}\text{C}$), la enfermedad es asintomática hasta que el fruto inicia el proceso de maduración en poscosecha, donde ocurre un proceso de transición que va aumentando hasta llegar al necrotrofismo, etapa en la que son visibles los síntomas de la pudrición y del pardeamiento de los tejidos, tanto del epicarpio como del mesocarpio. Todo esto es posible debido a que los mecanismos de defensa del fruto disminuyen durante la vida de anaquel, sobre todo si la temperatura es elevada (Prusky *et al.*, 2013; Herrera-González *et al.*, 2020). Lo anterior, se observó cuando los frutos del cultivar Hass, fueron almacenados a 25°C durante 7 días más, mostrando los síntomas ya mencionados, en aquellos que fueron inoculados con esporas de *C. gloeosporioides*.

Porcentajes de inhibición e índices de severidad en frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano solo o adicionados con la FHS inoculados con *C. gloeosporioides*

En los frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano solo e inoculados con *C. gloeosporioides* durante poscosecha, se observó un efecto antifúngico a los 7 días del almacenamiento a 25°C (con 7 días de almacenaje previo a 10°C), con un incremento en los porcentajes de inhibición de acuerdo a las concentraciones utilizadas, alcanzando el mayor valor de 75% con un 2.5% (Q2.5), obteniendo un IS de 1 (Cuadro 7). Los frutos tratados solo con agua estéril (Control, sin esporas), no presentaron los síntomas de la infección (IS 0), sin embargo, en los frutos inoculados con agua estéril y etanol, el IS fue de 4, con un porcentaje de inhibición del 2.5% en el mesocarpio, indicativo de que la inoculación con las esporas de *C. gloeosporioides* fue efectiva para provocar la infección de los frutos recubiertos con quitosano.

Los frutos tratados con benomyl50 (Control +), el porcentaje de inhibición fue del 55% con un IS de 2. En frutos recubiertos con Q1, se obtuvo un IS de 4, con síntomas de infección severa en todo el mesocarpio, representando solamente un 10% de inhibición; con Q1.5, se presentó un IS de 3, con síntomas leves en todo el mesocarpio (30% de inhibición); con Q2, se observó

un IS de 2, con síntomas leves de infección desde la zona peduncular hasta la zona cercana a la semilla, considerando un 55% de inhibición (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición e índices de severidad (IS) en frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano (Q1, Q1.5, Q2 y Q2.5) y quitosano adicionado con la CI₁₀₀ de la FHS (Q1 + FHS, Q1.5 + FHS, Q2 + FHS y Q2.5 + FHS), después del almacenamiento durante 7 días a 10°C y por 7 días más a 25°C, e inoculados con 1×10^3 de esporas/mL de *C. gloeosporioides*.

TRATAMIENTOS	Inhibición (%)	IS
Control (agua estéril, sin esporas)	-	0
Control – (agua estéril y etanol, con esporas)	2.5 ± 0.11^h	4
Control + (Benomyl50, 10 mg/mL)	55 ± 0.43^d	2
Q 1	10 ± 0.09^g	4
Q 1.5	30 ± 0.23^f	3
Q 2	55 ± 0.43^d	2
Q 2.5	75 ± 0.67^c	1
Q 1 + FHS	35 ± 0.27^e	3
Q 1.5 + FHS	57.5 ± 0.33^d	2
Q 2 + FHS	87.5 ± 0.75^b	1
Q 2.5 + FHS	94.5 ± 1.12^a	1

Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=7$, prueba de Tukey).

Con respecto a los frutos de aguacate cv. Hass recubiertos con quitosano y adicionados con la CI₁₀₀ de la FHS e inoculados con esporas, se observó también que los frutos almacenados durante 7 días a 10°C no presentaron síntomas de la enfermedad, sin embargo, después de almacenarlos en estas condiciones por 7 días más a 25°C, se presentó la sintomatología característica de la enfermedad, con una disminución de los valores de IS y un incremento en la inhibición del avance de la enfermedad. En los frutos tratados con Q1 + FHS, Q1.5 + FHS y Q2

+ FHS, los valores de IS fueron de 3, 2 y 1, equivalentes a un porcentaje de inhibición de 35, 57.5 y 87.5 %, respectivamente (Cuadro 7). Con el tratamiento Q2.5 + FHS se obtuvo un IS de 1, obteniendo el mayor porcentaje de inhibición (94.5%) (Cuadro 7).

Con los resultados mostrados en este cuadro (Cuadro 7), se observa que con las desviaciones estándar de un número de muestra de 7 ($n=7$), mayormente se demuestra que el porcentaje de la respuesta antifúngica debido al recubrimiento de quitosano con la FHS es mayor al 90%, sobre todo con Q2.5 + FHS. Con este número de repeticiones en ambos experimentos, se observó una respuesta homogénea de la respuesta antifúngica.

En la figura 6 se demuestra el efecto antifúngico en los frutos de cv. Hass inoculados con *C. gloeosporioides*, recubiertos de quitosano solo o adicionado con la CI₁₀₀ de la FHS, así como lo observado con los diferentes tratamientos control. Solo en los frutos no inoculados se observó la inocuidad completa (IS 0) (Figura 6A) y en los que fueron inoculados sin recubrimiento de quitosano (Figura 6B). Los síntomas fueron severos en todo el mesocarpio con un IS de 4 (Figura 6B), y los tratados con benomyl50 mostraron un IS de 2, indicativo de una efectividad de inhibición del 55% (Figura 6C), menor a la observada con quitosano al 2.5% con la CI₁₀₀ de la FHS, que fue del 94.5% (Figura 6K).

En frutos tratados con quitosano solo, se observaron valores de IS dependientes de la concentración del recubrimiento, con valores de IS de 4, 3, 2 y 1, en frutos recubiertos con Q1, Q1.5, Q2 y Q2.5, respectivamente (Figura 6 D-G). Un IS de 3 fue obtenido para el tratamiento con quitosano al 1% más la FHS, con síntomas leves en todo el mesocarpio (35% de inhibición) (Figura 6H), mientras que para el Q1.5 + FHS el IS fue de 2 (57.5% de inhibición) con sintomatología en la zona peduncular extendiéndose hasta la parte media del fruto, cerca del endocarpio (Figura 6I). Aunque con Q2 + FHS, el IS fue de 1, se presentaron síntomas restringidos a la zona peduncular, considerando una infección del 12.5% (87.5% de inhibición), también los frutos recubiertos con Q2.5 + FHS presentaron un IS de 1, pero la infección solo fue del 5.5%, ya que la infección es muy leve en la zona cercana al pedúnculo (Figura 6K). La mayor actividad antifúngica se obtuvo con el recubrimiento de quitosano al 2.5% solo o adicionado con la CI₁₀₀ de la FHS.

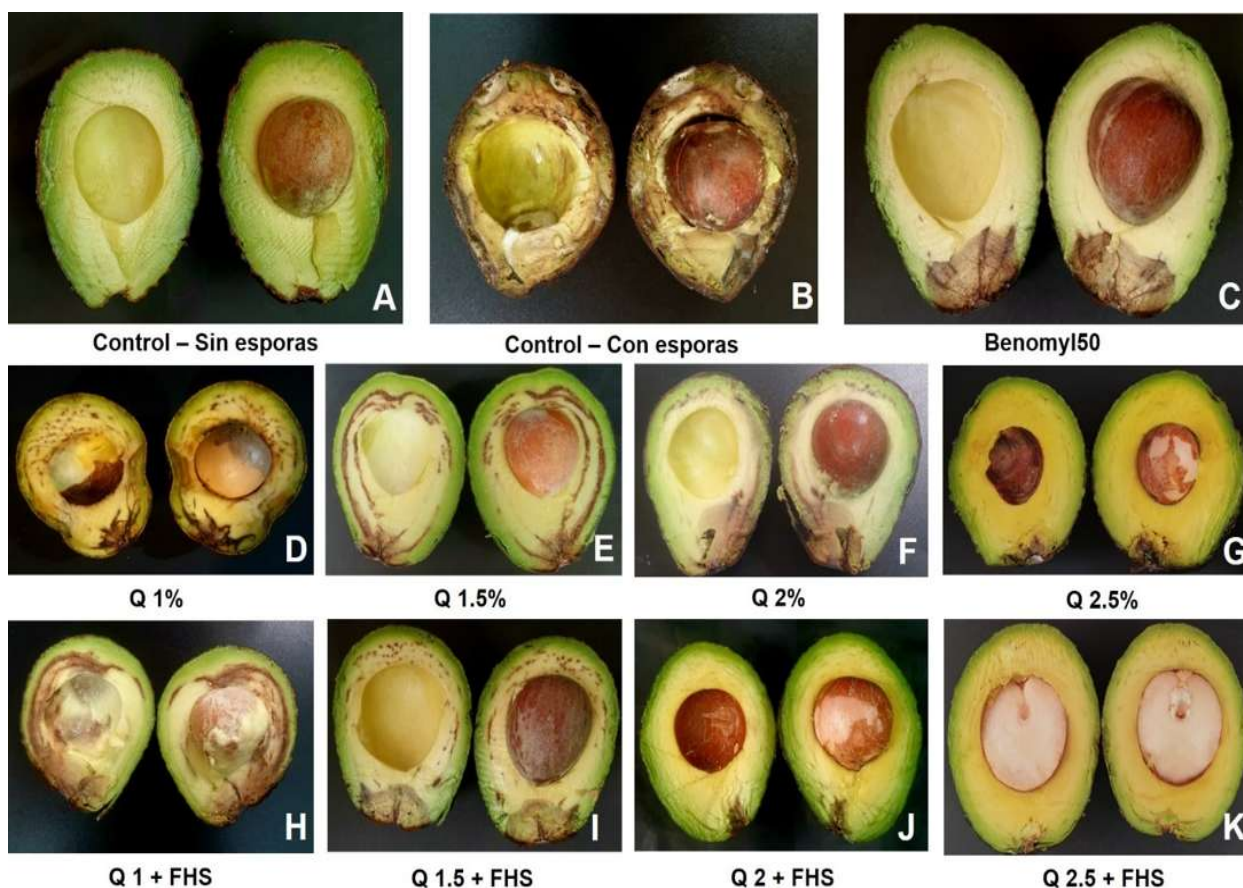


Figura 6. Frutos de aguacate cv. Hass almacenados 7 días a 10°C y por 7 días a 25°C, de los tratamientos control (Control – sin esporas, Control con esporas y Control + con esporas), con quitosano solo (Q1, Q1.5, Q2 y Q2.5) y quitosano adicionado con la CI₁₀₀ de la FHS (Q1 + FHS, Q1.5 + FHS, Q2 + FHS y Q2.5 + FHS), inoculados con esporas de *C. gloeosporioides*. Al final del almacenamiento (14 días) (n=7).

Estos resultados demuestran que, la actividad antifúngica del quitosano es potenciada con la adición de la FHS del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano, con la que se obtuvo la mayor actividad antifúngica con el tratamiento de Q2.5 + FHS. En otras investigaciones, se ha reportado que el quitosano es un buen vehículo para la adición de diversos compuestos con actividad biológica como antioxidante, antifúngica y para la preservación de la calidad en frutos poscosecha. Entre los compuestos de interés, se encuentran los derivados de plantas, representando una alternativa viable para enriquecer recubrimientos comestibles (Barrera *et al.*, 2015; Anaya-Esparza *et al.*, 2020).

Recubrimientos comestibles de quitosano con almidón y aceite esencial de canela fueron aplicados a fresa para evaluar la población microbiana (mesófilos aerobios) durante 15 días de almacenamiento a 5°C. Todos los tratamientos redujeron significativamente la población microbiana con respecto al control, sin embargo, el tratamiento con Q2% con aceite esencial de canela (AC) al 0.1%, redujo en mayor magnitud el crecimiento microbiano sin afectar la calidad de los frutos después de 14 días a 5°C, seguido del recubrimiento de Q1% + AC 0.1% con una reducción y vida de anaquel de 15 días. Adicionalmente, lograron mantener el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante (López-Mata *et al.*, 2012).

Recientemente, García-Mateos *et al.* (2023) evaluaron el efecto antifúngico de recubrimientos de quitosano 1% con aceite esencial *Citrus reticulata* (0.5 %, 1.0 % y 1.5 %) en la inhibición del crecimiento del hongo *C. gloeosporioides* en frutos de papaya aplicado en etapa de poscosecha. El recubrimiento mejoró significativamente la vida de anaquel de la papaya y disminuyó más del 80% el daño causado por antracnosis, además que retrasó el cambio de color de la epidermis de la papaya, la pérdida de peso, firmeza y sólidos solubles totales en comparación con el control.

Coyotl-Pérez *et al.* (2022), evaluaron la actividad antifúngica *in situ* de recubrimientos de quitosano adicionados con el aceite esencial de tomillo (AET) para la prevención de pudrición en frutos de aguacate cv. Hass por *Clonostachys rosea*, hongo emergente de este cultivo. Todos los recubrimientos de quitosano adicionados con AET (0.4 %, 0.7 %, 1.0 % y 1.3%) mostraron un efecto fungistático *in situ* sobre *C. rosea*, sin embargo, los tratamientos con AET al 1.0% y 1.3% mostraron ser los más efectivos para el control del hongo hasta por 30 días. Así mismo, los recubrimientos retardaron la pigmentación negra de los aguacates y presentaron propiedades deseables para ser utilizado como envase alimenticio y buenas propiedades como baja transmitancia y opacidad.

Bill *et al.* (2014), evaluaron la incidencia y gravedad (diámetro de la lesión) de los recubrimientos de quitosano (Q) y extracto de *Aloe vera* (AV) solos o en combinación con aceite esencial tomillo (AET) [3:1 v/v], tanto en tratamientos preventivos como curativos en frutos de

aguacate cv. Hass sobre *C. gloeosporioides*. Los tratamientos preventivos de Q + AET, redujeron significativamente la gravedad de la antracnosis (8.9 mm) provocada por *C. gloeosporioides* en comparación con el AET (12.7 mm), AV + AET (14 mm), Q (17.8 mm), AV (20.6 mm), Procloraz (18.3 mm) y los frutos no tratados (34.8 mm). Mientras que, en los tratamientos curativos, la combinación Q + AET, también redujo la gravedad de la antracnosis con una incidencia de 40% y la severidad en al menos 4 mm en comparación con los otros tratamientos, indicando un efecto sinérgico entre los recubrimientos de quitosano y el aceite esencial de tomillo para inhibir la incidencia de antracnosis. Los frutos tratados preventivamente y curativamente con Procloraz redujeron la incidencia de la enfermedad en un 40% y 50%, respectivamente.

Los resultados de la presente investigación, demuestran que los recubrimientos de quitosano al 2.5% adicionados con la CI₁₀₀ de la FHS en los frutos de aguacate cv. Hass, presentaron el mayor porcentaje de inhibición (94.5%) del crecimiento de *C. gloeosporioides*, con un IS de 1, comprobando que la adición de compuestos de origen vegetal, sobre todo con un alto contenido de compuestos fenólicos, incrementan la inhibición sobre el hongo, obteniendo un 19.5% más de efectividad que con el quitosano solo.

Pérdida de peso

El porcentaje de pérdida de peso, durante el almacenamiento por 7 días a 10°C no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, al almacenarlos por 7 días más a 25°C, el porcentaje de pérdida de peso de los frutos, aumentó después del almacenamiento a estas condiciones. La pérdida fisiológica de peso de los frutos de aguacate incrementó a medida que avanzó el tiempo poscosecha como consecuencia de la transpiración de los frutos, sin embargo, el porcentaje de pérdida de peso se redujo con la aplicación de los recubrimientos en comparación con los controles, mostrando diferencias significativas en todos los tratamientos (Figura 7). Los frutos recubiertos con Q 2.5 sin y con esporas perdieron un 4.15 y 4.57 % de su peso inicial, mientras que, los tratamientos con Q 2.5 + FHS sin y con esporas el porcentaje de pérdida de peso fue menor, de 3.12 y 3.51 %, respectivamente. El control (agua estéril, sin esporas) presentó un 4.81 % de pérdida de peso y el control - (agua - etanol, con esporas) y el control + (Benomyl 50) un 7.11 y 5.96 % de pérdida de peso.

Tomando en cuenta el factor de pérdida de peso, los frutos de aguacate Hass inoculados o sin inocular con *C. gloeosporioides* del tratamiento Q 2.5 + FHS, fueron los que mostraron la menor pérdida de peso, aunque con diferencias significativas entre sus valores. Los valores de este tratamiento fueron los menores con los presentados en los demás tratamientos, con alta diferencia significativa, incluso con los controles (Figura 7).

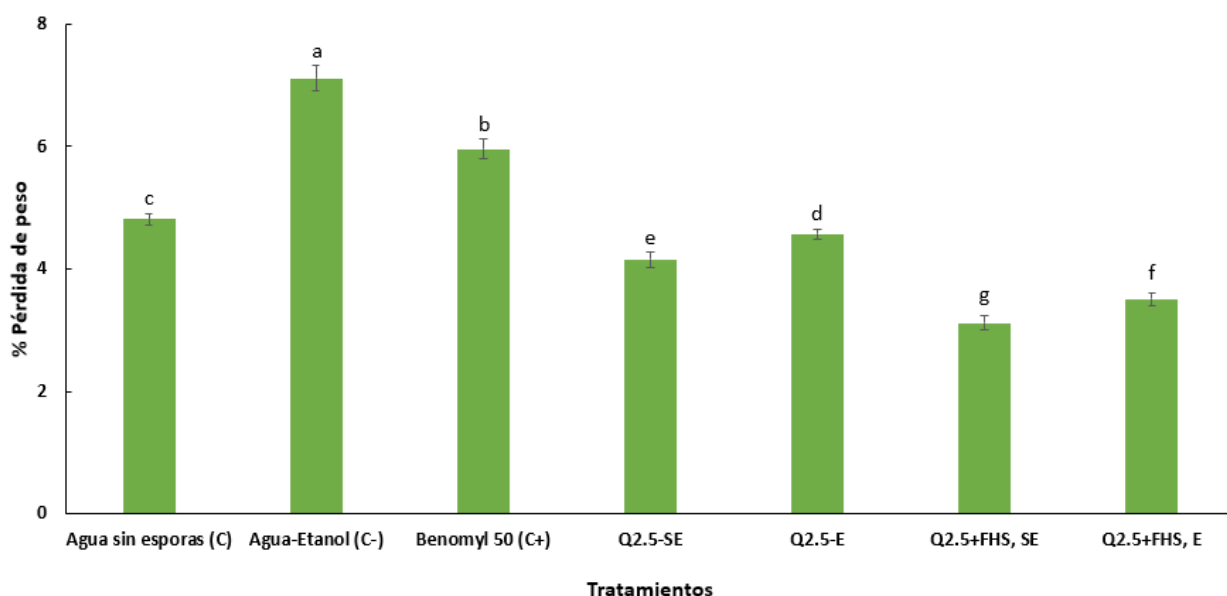


Figura 7. Porcentajes de pérdida de peso en los frutos de aguacate cv. Hass después de su almacenamiento durante 7 días a 10°C y 7 días más a 25°C. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=7$, prueba de Tukey).

Pruebas de firmeza

Con respecto a la determinación de firmeza en los frutos tratados, en general, los valores de este parámetro, disminuyeron después del almacenamiento por 7 días a 10°C y 7 días más a 25°C (Figura 8). En frutos recubiertos con Q 2.5 sin y con esporas se presentaron valores de firmeza de 11.55 y 9.91 kg/cm², respectivamente, mientras que en los frutos del tratamiento Q2.5 + FHS sin y con esporas, la firmeza fue de 16.56 y 14.83 kg/cm², respectivamente. Al finalizar el periodo de almacenamiento, los frutos del tratamiento control (agua estéril, sin esporas) presentaron una firmeza de 5.54 kg/cm² y, los del control - (agua - etanol, con esporas) así como los del tratamiento control + (Benomyl 50), una firmeza de 2.26 y 4.12 kg/cm², respectivamente.

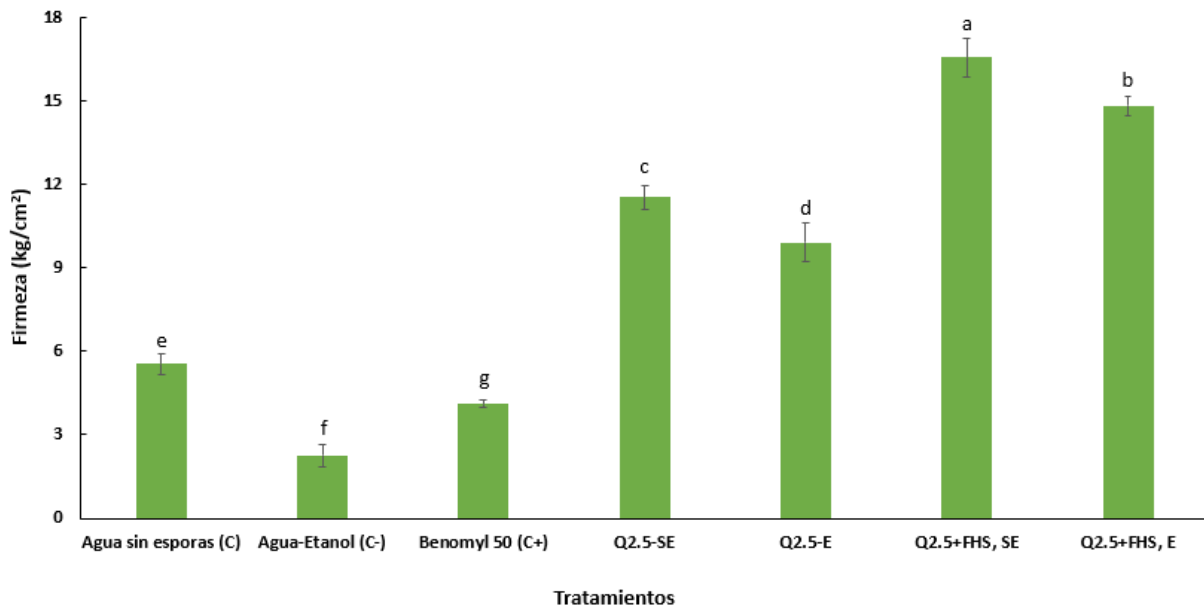


Figura 8. Valores de firmeza en frutos de aguacate cv. Hass después de su almacenamiento durante 7 días a 10°C y 7 días más a 25°C. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=7$, prueba de Tukey).

Los frutos recubiertos con quitosano solo o adicionado con la FHS, inoculados y sin inocular, presentaron el menor porcentaje de pérdida de peso y una mayor firmeza en comparación con todos los demás tratamientos, siendo más efectivos los recubrimientos de Q + FHS con una pérdida de peso del 3.12 al 3.51 % y una firmeza comprendida entre 14.83 y 16.56 kg/cm², mientras que, con el tratamiento control - (agua - etanol, con esporas), los frutos presentaron un 7.11 % de pérdida de peso y una firmeza de 2.26 kg/cm² al finalizar el periodo de almacenamiento.

Las frutas y hortalizas están expuestos a un deterioro progresivo una vez cosechados, ocasionado por factores como procesos fisiológicos y bioquímicos, por el manejo, transporte y almacenamiento, así como, por la interacción con fitopatógenos causantes de enfermedades. Dentro de los parámetros utilizados para determinar la calidad en productos hortofrutícolas, la pérdida de peso y firmeza son ampliamente utilizados para la evaluación poscosecha de estos alimentos; y, durante los procesos fisiológicos de respiración y transpiración los frutos sufren la máxima pérdida de peso y firmeza, además de otras afectaciones directas sobre la calidad del fruto como pérdida de brillo, turgencia y valor nutricional, al mismo tiempo, estos parámetros

de calidad son de suma importancia pues afectan la comercialización de los frutos, ya que, de estos depende su aceptabilidad por parte del consumidor (Bill *et al.*, 2014; Bello-Lara *et al.*, 2016; García-Figueroa *et al.*, 2019; Anaya-Esparza *et al.*, 2020; González-Chavarro *et al.*, 2021).

Una alternativa para mantener la calidad poscosecha de frutas y vegetales es mediante la aplicación de recubrimientos comestibles. Varios autores han informado sobre el efecto de los recubrimientos comestibles a base de quitosano para impedir la pérdida de peso y firmeza y mantener la calidad general de diferentes frutos, como lo reporta Uscocovich-Álvarez *et al.* (2023) con la aplicación de recubrimientos de quitosano (0.75, 1.0, 1.25 y 1.5 %) para determinar la calidad en banano poscosecha. Los recubrimientos con los diferentes porcentajes de quitosano retrasaron la maduración del banano, mostrando un mayor efecto con mayores porcentajes de quitosano, por lo que, las características de calidad se vieron influenciadas favorablemente con las concentraciones de quitosano más altas (1 y 1.5 %), siendo el mejor tratamiento con quitosano 1.5 %, observando una firmeza deseable en los frutos y los menores valores de sólidos solubles totales y porcentajes de pérdida de peso.

La adición de extractos vegetales a los recubrimientos de quitosano, además de mejorar la calidad general de los frutos otorga una protección extra contra hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en frutos poscosecha. Chen *et al.* (2019) evaluaron el efecto de un recubrimiento comestible de quitosano incorporado con el extracto de frutos de *Ficus hirta* Vahl. en mandarinas xinyu durante el almacenamiento en frío a 5 °C. El extracto de frutos de *Ficus hirta* demostró su eficacia *in vivo* en el control del moho azul causado por *Penicillium italicum* y, el recubrimiento compuesto retrasó el proceso de senescencia de la fruta y mejoró las características de calidad poscosecha, prolongando la vida útil de los frutos, al exhibir la mayor reducción del contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable y ácido ascórbico al reducir la tasa de descomposición de la fruta, la pérdida de peso, tasa de respiración y el contenido de malondialdehído durante el almacenamiento en frío a 5 °C. Además, el recubrimiento con el extracto aumentó significativamente la actividad enzimática protectora de los frutos (superóxido dismutasa, peroxidasa y fenilalanina amonio-liasa), reduciendo así el estrés oxidativo y retrasando la peroxidación lipídica a las membranas. De igual forma, frutos

de granada fueron recubiertos con quitosano 1 % y aceite esencial de limoncillo (1.5, 3, 6 % v/v) para evaluar su efecto antifúngico sobre *B. cinerea* y *Penicillium* spp., los resultados indicaron que la incorporación del aceite esencial de tomillo (1.5 y 3.0 %) en estos recubrimientos redujo la severidad de descomposición de la fruta causada por los hongos evaluados en comparación con los frutos sin aceite esencial de limoncillo y frutos sin recubrimiento, después de 10 días de almacenamiento a 22°C, siendo *B. cinerea* más sensible que *Penicillium* spp. a los recubrimientos bioactivos (Kawhena *et al.*, 2021).

En los frutos, la pérdida de firmeza se puede atribuir a la degradación de los componentes de la pared celular, principalmente pectinas, debido a la acción de enzimas específicas propias de la maduración y senescencia como la pectinesterasa y la poligalacturonasa (Márquez *et al.*, 2009; Bello-Lara *et al.*, 2016). Los recubrimientos comestibles proporcionan una barrera semipermeable al intercambio de gases, reduciendo la disponibilidad de O₂ e incrementando el CO₂, creando una atmósfera modificada entre el fruto y recubrimiento que reduce la velocidad de respiración y producción de etileno conduciendo a una menor deshidratación, daños en su apariencia, pérdida de peso y firmeza, similar a lo observado en la presente investigación con los recubrimientos de quitosano adicionados con la FHS, donde la incorporación de la FHS promovió una mejora en la calidad poscosecha de los frutos y una protección frente a *C. gloeosporioides* causante de antracnosis en aguacate cv. Hass (Anaya-Esparza, *et al.*, 2020; Salvador *et al.*, 2003).

Conclusiones

Se confirmó la patogenicidad de *C. gloeosporioides* en los frutos de aguacate cv. Hass, y se determinó un óptimo nivel de infección con un inóculo de 1×10^3 esporas/mL.

Los recubrimientos con las diferentes concentraciones de quitosano en frutos de aguacate cv. Hass, aunque mostraron un efecto antifúngico, la mayor actividad se obtuvo con 2.5% (Q2.5), la cual fue potenciada con la adición de CI₁₀₀ de la FHS (Q2.5 + FHS), obteniendo un incremento en el porcentaje de inhibición y el valor más bajo de IS.

Los frutos recubiertos con el tratamiento de quitosano 2.5 % con la FHS tuvieron un menor porcentaje de pérdida de peso y una mayor firmeza, en comparación con los controles, después de 14 días post-inoculación de *C. gloeosporioides* (7 días a 10°C más 7 días a 25°C), lo que condujo a una mejora en la calidad poscosecha de los frutos de aguacate cv. Hass.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Actividad antifúngica *in vitro* de la FHS

Los extractos de origen vegetal han sido de interés para su estudio debido a que poseen diversas actividades biológicas, entre ellas, se encuentra la actividad antifúngica como una alternativa para el manejo de enfermedades en plantas causadas por hongos, que se ha atribuido a la presencia de metabolitos secundarios como terpenos y compuestos fenólicos con mecanismos de acción variable (Carvajal-Tesorero *et al.*, 2013; Tucuch-Pérez *et al.*, 2021).

La fracción hidrosoluble obtenida del aceite de semillas de aguacate nativo mexicano (FHS) demostró tener actividad antifúngica *in vitro* y ser efectiva para el control del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*, causante de la antracnosis en frutos de aguacate cv. Hass. Esta actividad antifúngica fue dependiente y proporcional al incremento de la concentración utilizada (0.01, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.10 mg/mL), inhibiendo en un 100 % el crecimiento micelial del hongo en estudio, con la concentración más alta (0.10 mg/mL) sin mostrar diferencias significativas comparado con el control positivo (Benomyl 50, 10 mg/mL) y con valores calculados de CI_{50} y CI_{100} de 0.055 y 0.107 mg/mL, respectivamente (Figura 3A, B, C).

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que la FHS tiene un alto potencial antifúngico ya que, se logró la inhibición completa de *C. gloeosporioides* con concentraciones mucho menores en comparación con el fungicida sintético utilizado como control positivo, así como de otros extractos derivados de plantas, de acuerdo a reportes en investigaciones recientes, como lo reportado por Rodríguez-Pedroso *et al.* (2012), quienes evaluaron el efecto antifúngico *in vitro* de un extracto hidroalcohólico al 30 % y un extracto acuoso de *Acacia farnesiana* sobre el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Después de 216 h de incubación, los extractos inhibieron en un 99.0 y 98.2 % el crecimiento micelial del hongo en estudio con el extracto hidroalcohólico al 30 % y el extracto acuoso, respectivamente. De igual forma, González-Álvarez *et al.* (2015), evaluaron la actividad antifúngica de un extracto acuoso y otro extracto etanólico de *Agave scabra* sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Mucor* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., mediante dos técnicas: la técnica del pozo en agar y la técnica de dilución del extracto en agar. Mediante el

método de pozo en agar, el hongo *Mucor* sp., fue más susceptible tanto al extracto acuoso como al extracto etanólico de *Agave scabra*, presentando los mayores halos de inhibición de 19.7 mm y 29.7 mm, respectivamente. Por otro lado, con la técnica de dilución del extracto en agar, el extracto acuoso presentó el mayor porcentaje de inhibición sobre *Penicillium* sp. y con el extracto etanólico sobre *B. cinerea*, con un 28.33 % y 90.0 %, respectivamente. También, las concentraciones obtenidas con el mayor efecto antifúngico de la FHS, en esta investigación, son menores o similares a las reportadas por Masangwa *et al.* (2013), quienes evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de acetona, acetato de etilo y acuoso provenientes de diferentes plantas (*Ipomoea batatas*, *Carica papaya*, *Allium sativum*, *Syzygium cordatum*, *Chlorophytum comosum* y *Agapanthus caulescens*) contra *Colletotrichum lindemuthianum* y *Colletotrichum dematium*, mediante las técnicas de disco en agar y doble dilución en microtitulación. Los resultados demostraron que los extractos acuosos de *C. papaya* y *S. cordatum* fueron activos contra *C. lindemuthianum* y tuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 1.56 mg/mL, así mismo, los extractos acuosos de *S. cordatum*, *A. sativum* y *C. comosum* también mostraron actividad contra *C. dematium*, con concentraciones mínimas inhibitorias de 3.13, 6.25 y 12.5 mg/mL, respectivamente. Mientras que, las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de acetona de *A. sativum*, *S. cordatum* y *A. caulescens* fueron de 0.78, 3.13 y 6.25 mg/mL, respectivamente, contra *C. lindemuthianum*, y de 0.78, 6.25 y 3.13 mg/mL contra *C. dematium*.

Actividad antifúngica *in vitro* quitosano

La actividad antifúngica *in vitro* del quitosano fue evaluada utilizando diferentes porcentajes (1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 %) sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* con el propósito de determinar la de mayor actividad antifúngica. Con los resultados, se demostró que, solo las concentraciones más altas presentaron actividad antifúngica (2 y 2.5 %) y las concentraciones menores a éstas, no presentaron actividad antifúngica. La inhibición total (100 %) del crecimiento micelial se logró únicamente con quitosano 2 %, mientras que, con la concentración de 2.5 % la inhibición fue únicamente del 34.4 % (Figura 4).

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con investigaciones donde demuestran la actividad antifúngica *in vitro* del quitosano con concentraciones que van desde

0.1 hasta 3.0 % contra diferentes patógenos como *Pyricularia grisea* Sacc, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Mucor* spp. (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; Echevarría-Hernández *et al.*, 2012; El-Araby *et al.*, 2024), no obstante, cabe destacar que, en otras investigaciones, la actividad antifúngica del quitosano ha demostrado incrementar conforme se aumenta la concentración de este biopolímero, sin embargo, aunque el quitosano posee actividad antifúngica, esta depende de varios factores como la concentración, grado de desacetilación y polimerización, patrón de acetilación, peso molecular, solubilidad, densidad de carga positiva y capacidad quelante, presencia de cationes metálicos, microorganismo objetivo (especie, fase de desarrollo y composición de la membrana celular de los hongos), pH, temperatura y tiempo, por lo que, estos factores pudieron haber interferido en la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del quitosano al 2.5 % (Confederat *et al.*, 2021; Poznanski *et al.*, 2023; El-Araby *et al.*, 2024).

Se ha reportado que el quitosano es efectivo en la inhibición de la germinación de esporas, sobre la elongación del tubo germinativo y en el crecimiento micelial radial de hongos relacionados con el deterioro de alimentos y plantas. Para estos, en presencia de quitosano, se activan varios procesos biológicos en el tejido vegetal, induciendo quitinasas con acción sobre micoparásitos biótropos y necrotróficos, hongos entomopatógenos y hongos micorrízicos arbusculares vesiculares (Onaran *et al.*, 2021; Poznanski *et al.*, 2023; El-Araby *et al.*, 2024).

El mecanismo antifúngico del quitosano involucra la morfogénesis de la pared celular con moléculas de quitosano que interfieren directamente con el crecimiento de los hongos, esta actividad antifúngica reside principalmente en las interacciones electrostáticas entre la carga positiva del quitosano y las paredes celulares de los hongos cargadas negativamente, conduciendo a un cambio en la permeabilidad y fuga de solutos al exterior de las células (proteínas y otros constituyentes intracelulares), lo anterior impide el metabolismo celular normal y la posterior muerte celular. Además, por medio de observación microscópica se ha informado que los oligómeros del quitosano se difunden hacia el interior de las hifas, interfiriendo en la actividad enzimática responsable del crecimiento del hongo (Confederat *et al.*, 2021; El-Araby *et al.*, 2024). En diferentes investigaciones, se ha evaluado la actividad antifúngica *in vitro* del quitosano sobre hongos fitopatógenos.

López-Mora *et al.* (2013), evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de diferentes concentraciones de quitosano (0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 %) sobre el crecimiento micelial, esporulación y germinación de *A. alternata*. Los resultados demostraron que la concentración de quitosano 1.0 % fue la más efectiva, reduciendo el crecimiento micelial hasta en un 70 %, presentando la menor esporulación en comparación con los demás tratamientos y el control y también, se inhibió completamente la germinación de conidios, además, en la micrografía electrónica de transmisión en el micelio y conidios tratados con quitosano se observó una intensa y amplia vacuolización en estas estructuras y ruptura de la membrana celular originando la salida de material citoplasmático. La actividad antifúngica de diferentes concentraciones de quitosano (0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 %) fue evaluada en el control *in vitro* de *Penicillium citrinum* sobre el crecimiento micelial y germinación de esporas. La aplicación de quitosano resultó efectiva en la inhibición del crecimiento micelial (100 %) con las concentraciones de quitosano de 1.0 y 1.5 %, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos y la germinación de esporas fue totalmente inhibida con quitosano al 0.5, 1.0 y 1.5 % (González-Estrada *et al.*, 2020).

De igual forma Lira-Saldivar *et al.* (2006), evaluaron el efecto antifúngico *in vitro* de dos dosis de quitosano (1000 y 2000 µl/L) en medio PDA contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Los resultados indican que las dos concentraciones de quitosano fueron efectivas para inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* en un 98.3 y 100 % sin diferencias significativas entre ambos tratamientos y para *C. coccodes* la inhibición total del crecimiento micelial se obtuvo con la concentración de quitosano de 2000 µl/L, mientras que, para *F. oxysporum* se tuvo cierto efecto antifúngico con las dos concentraciones de quitosano utilizadas. Con respecto a la esporulación, las dos concentraciones de quitosano utilizadas inhibieron completamente la esporulación de *B. cinerea* y, en *C. coccodes* solo se inhibió el 100% con la concentración de quitosano a 2000 µl/L.

Ácidos fenólicos y flavonoides totales en FHS

Con la evaluación del contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides presente en la fracción hidrosoluble fue evaluada, se obtuvieron valores de 104.04 mg Eq. Ácido gálico/g ES y 0.006 mg Eq. Quercetina/g ES, resultados que sugieren que los ácidos fenólicos son lo mayormente

responsables de la actividad antifúngica obtenida en los ensayos *in vitro* sobre *C. gloeosporioides* en esta investigación. Además, se ha reportado que los extractos vegetales son fuente de metabolitos secundarios con actividad antifúngica que han sido estudiados como una alternativa al uso de fungicidas químicos para el control diversos hongos fitopatógenos como *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum*, *Rhizopus stolonifer* y *Rhizopus oryzae*, debido a que este tipo de extractos poseen compuestos con actividad biológica como el grupo de los compuestos fenólicos. Algunos de los compuestos fenólicos encontrados en extractos de diversas fuentes vegetales incluyen: tangeretina, naringina, hesperidina, sinensetina, nobiletina, ácido nordihidroguayarático (ANDG), quercetina, kaempferol y ácido clorogénico, entre otros, capaces de inhibir el desarrollo y proliferación de fitopatógenos (Cortés-Rivera *et al.*, 2021; León-Durán *et al.*, 2021).

Aunque son pocos los estudios en extractos de aguacate para determinar la actividad antifúngica, en algunas investigaciones se ha demostrado el efecto de esta actividad por el contenido fenólico y de flavonoides, como lo reportado por Salazar-García *et al.* (2016), quienes evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de cáscara de aguacate cv. Hass cultivados bajo diferentes manejos de agua (con y sin riego) y cobertura del fruto (cubiertos y descubiertos). Los resultados del contenido fenólico total indicaron que el manejo de agua no afectó la concentración de compuestos fenólicos totales en los extractos de cáscara de aguacate con valores de 6.10 y 6.42 mg equivalentes de ácido gálico/g cáscara en frutos descubiertos y, 3.64 y 3.72 mg equivalentes de ácido gálico/g cáscara en extractos de cáscara de aguacate de frutos cubiertos. Por otro lado, el grado de exposición solar en frutos descubiertos presentaron la mayor concentración de compuestos fenólicos en comparación con los frutos cubiertos, concluyendo que, el manejo de agua en huertos de aguacate Hass no modificó el contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, el grado de exposición a la radiación solar sí afectó el contenido fenólico, presentando el mayor contenido fenólico en extractos de cáscara de aguacate expuestos a la radiación solar, comparados con los extractos de cáscara de aguacate sometidos a estrés por falta de luz. De igual forma, Wang *et al.* (2010), determinaron el contenido fenólico total en semillas, cáscaras y pulpa de aguacate de seis diferentes cultivares (Booth 7, Booth 8, Choquette, Loretta, Simmonds y Tonnage), una variedad de aguacate con la marca registrada

“Slimcado,” provenientes de frutos maduros de Florida y aguacate Hass mexicano para la comparación del contenido fenólico. Para todos los cultivares evaluados, las semillas presentaron el mayor contenido fenólico, mientras que la pulpa tuvo los valores más bajos. El contenido fenólico total en las semillas osciló entre 19.2 y 51.6 mg de equivalentes de ácido gálico/g en función del peso fresco, siendo en aguacate Hass el de mayor contenido, con 51.6 mg de equivalentes de ácido gálico/g. El extracto metanólico de semilla de aguacate Hass fue evaluado por Pacheco-Coello *et al.* (2020) para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides. El análisis arrojó una concentración de fenoles totales de 53.12 mg de equivalentes de ácido gálico/g de material vegetal y flavonoides de 38.22 mg de equivalentes de catequina/g de material vegetal.

El contenido de compuestos fenólicos de la fracción hidrosoluble de semillas de aguacate nativo mexicano (104.04 mg Eq. Ácido gálico/g ES) obtenido en la presente investigación es mayor en comparación con lo reportado para el cultivar Hass, aunque cabe destacar que los reportes de contenido fenólico total en aguacate generalmente son referidos al cultivar Hass, debido a que es el de mayor importancia económica.

En esta investigación, se propone darle un uso a las semillas de aguacate nativo mexicano debido al contenido de este tipo de metabolitos, por su actividad biológica aplicable en diferentes áreas como el sector farmacéutico, agroquímico, alimentario y médico y, debido a lo reportado, los resultados de la presente investigación son de los más completos en cuanto al estudio del contenido de fenoles y flavonoides, a su relación con la actividad antifúngica, de un extracto acuoso proveniente de las semillas de *Persea americana* var. *drymifolia*.

Pruebas *in vitro* de patogenicidad

Frutos de aguacate cv. Hass fueron inoculados artificialmente con 1×10^3 esporas/mL de *C. gloeosporioides*, y con ello se confirmó la patogenicidad del hongo para provocar la infección característica de este fitopatógeno, el cual es el responsable de la antracnosis, enfermedad que afecta a diversos cultivos entre ellos aguacate, fresa, mango, guayaba, papaya y cítricos (Rodríguez-López *et al.*, 2013). Los frutos tratados con el control – (agua estéril, sin esporas) no presentaron sintomatología causada por este fitopatógeno, demostrando la inocuidad de los

frutos utilizados en el ensayo, mientras que en los frutos del control + (benomyl50, 10 mg/mL), los frutos mostraron síntomas iniciales de la enfermedad en menor severidad en comparación con los frutos tratados con esporas (Figura 5A, B C).

Actividad antifúngica de recubrimientos de quitosano adicionado con la FHS y su efecto sobre las propiedades de pérdida de peso y firmeza en frutos de aguacate cv. Hass recubiertos

En la presente investigación se evaluó la efectividad antifúngica de recubrimientos de quitosano sin y con la CI₁₀₀ de la fracción hidrosoluble de semilla de aguacate nativo mexicano sobre *C. gloeosporioides*, así como los atributos de calidad como pérdida de peso y firmeza en frutos de aguacate recubiertos.

Los frutos recubiertos con quitosano solo (1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 %) presentaron actividad antifúngica sobre *C. gloeosporioides* en función del porcentaje de quitosano utilizado, obteniendo el mayor porcentaje de inhibición con 75 % con quitosano al 2.5 %. Los frutos recubiertos con quitosano (1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 %) adicionados con la CI₁₀₀ de la FHS incrementaron el efecto antifúngico con los recubrimientos compuestos con valores de inhibición de *C. gloeosporioides* que abarcan desde 35 a 94.5 %, siendo el más efectivo el recubrimiento compuesto por Q2.5 % + FHS. El control + (Benomyl50, 10 mg/mL) inhibió solamente el 55 % del desarrollo fúngico de *C. gloeosporioides*. En comparación con el control + (Benomyl50, 10 mg/mL) y los recubrimientos de quitosano solo o adicionado con la FHS, el tratamiento más efectivo fue el recubrimiento compuesto por Q2.5 % + FHS con una inhibición sobre esporas de *C. gloeosporioides* del 94.5 % y un índice de severidad de 1 (Cuadro 7, Figura 6).

Correspondiente a la evaluación de pérdida de peso y firmeza en frutos recubiertos tanto con quitosano solo como con el adicionado con la FHS se observó que los recubrimientos de quitosano inoculados o sin inocular con esporas de *C. gloeosporioides* propiciaron una menor pérdida de peso y firmeza en comparación con el control sin recubrimiento. Los porcentajes de pérdida de peso para quitosano solo en sus diferentes concentraciones estuvieron en un rango de 3.12 a 4.57, registrándose los menores porcentajes de pérdida de peso con Q2.5 + FHS sin

inocular y Q2.5 + FHS inoculados con valores de 3.12 y 3.51 %, respectivamente (Figura 7). Por otro lado, el mayor porcentaje de pérdida de peso (7.11) se registró con el control – (agua estéril – etanol, con esporas). En cuanto a la firmeza de los frutos tratados con recubrimientos de quitosano, el recubrimiento al reducir la pérdida de peso también ayudo a mantener la firmeza de los frutos por más tiempo en comparación con el control, teniendo la mejor respuesta con los tratamientos con Q2.5 + FHS sin inocular y Q2.5 + FHS inoculados y con valores de firmeza de 16.56 y 14.83, respectivamente (Figura 8).

Las frutas y hortalizas son productos perecederos, susceptibles al ataque de fitopatógenos tanto en pre como en poscosecha y, el deterioro de los frutos a causa de hongos fitopatógenos puede provocar grandes pérdidas en la producción de estos alimentos, considerándose como un factor que limita la exportación de frutos debido al deterioro de su calidad (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2002; Trigos *et al.*, 2008).

El cultivo de aguacate es de gran importancia nutricional y económica para México, siendo este, el principal productor y exportador de aguacate a nivel mundial, sin embargo, la antracnosis representa uno de los problemas fitosanitarios más alarmantes en este cultivo, debido a que es una enfermedad de amplia distribución en las huertas, ocasionando daños principalmente a los frutos, mermando su calidad. Esta enfermedad es causada por el hongo *C. gloeosporioides* y se caracteriza por el hundimiento necrosado del tejido donde se producen grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas, afectando diferentes órganos vegetales de la planta, así como en distintas etapas de fenológicas del cultivo y, prevaleciendo durante temporadas lluviosas y alta humedad relativa (> 80 %). Durante la infección por *C. gloeosporioides*, el hongo puede permanecer en estado quiescente, es decir, que su infección se puede originar desde etapas en precosecha y manifestar sus síntomas en poscosecha, una vez que el fruto ha madurado (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020; Páez-Redondo *et al.*, 2022).

Actualmente el control de esta enfermedad se realiza mediante el uso de fungicidas sintéticos como axozystrobin, oxiclورو de cobre, piraclostrobina, tiabendazol y sulfato de cobre, entre otros, sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos químicos ha causado la

preocupación de los consumidores y la exigencia de productos libres de fungicidas, que aunque, si bien si son eficaces, su uso continuo durante varios años ha alterado el control natural y provocado brotes de enfermedades, efectos indeseables en organismos no objetivo, generando resistencia en los organismos a tratar y problemas ambientales y de salud humana. Por lo que se han explorado alternativas al uso de fungicidas, entre ellas han surgido los recubrimientos comestibles, siendo el quitosano el biopolímero más estudiado y con mejores efectos benéficos, además, estos recubrimientos comestibles se han funcionalizado con extractos vegetales con el fin de mejorar la apariencia y atributos de calidad como color, firmeza, dulzor y acidez, así como retardar procesos fisiológicos propios de las frutas y vegetales y el deterioro causando por hongos (Solano-Doblado *et al.*, 2018; Anaya-Esparza *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2022).

Recubrimientos de quitosano incorporados con extractos de plantas (*B. pilosa*, *L. javanica*, *S. cordatum* y *X. affra*) fueron evaluados sobre la calidad poscosecha y estabilidad de almacenamiento de maracuyá morado (*Passiflora edulis* var. Ester). Estos recubrimientos redujeron el marchitamiento y mantuvieron la calidad de maracuyá morado, reduciendo la pérdida de peso, firmeza y tasa de respiración, así como cambios menores de color (Nxumalo y Fawole, 2022). De igual forma, Nga y Bac, (2021), formularon un recubrimiento de quitosano al 0.5 % combinado con 0.3 % de gel de aloe vera y 0.2 % de extracto de hoja de papaya, el cual fue eficaz para mantener la calidad poscosecha y minimizar el deterioro de mango (*Mangifera indica*) infectado con esporas de *C. gloeosporioides* almacenados durante 12 días a temperatura ambiente. El recubrimiento redujo la tasa de respiración y pérdida de peso, retrasó el cambio de color, conservó la firmeza, mantuvo un alto contenido de vitamina C, al mismo tiempo que retrasó y redujo la incidencia de pudrición durante el almacenamiento del mango.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran el efecto antifúngico de los recubrimientos de quitosano adicionados con la fracción hidrosoluble de semilla de aguacate nativo mexicano, aplicado a un modelo *in vivo* de aguacate cv. Hass, donde mediante la aplicación de los recubrimientos en este modelo de estudio, se logró disminuir la severidad de la enfermedad en frutos inoculados artificialmente con esporas de *C. gloeosporioides*. Además, en los frutos tratados con estos recubrimientos, se disminuyó el porcentaje de pérdida de peso causado por los procesos fisiológicos de transpiración y respiración en los frutos, con esta

reducción, se presentó un mejor comportamiento poscosecha, manteniendo la firmeza de los frutos de aguacate cv. Hass por más tiempo en comparación con los frutos de los otros tratamientos.

Lo anterior se traduce en una mejora significativa en el mantenimiento poscosecha de los frutos de aguacate cv. Hass, por lo que en la presente investigación se confirma la efectividad antifúngica de recubrimientos de quitosano, la cual fue potenciada con la adición de la FHS (fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano), por lo que se presenta como una alternativa eficaz para el control de *C. gloeosporioides* durante el almacenamiento o vida de anaquel en frutos de aguacate cv. Hass.

9. CONCLUSIONES

Se demostró la actividad antifúngica *in vitro* de la fracción hidrosoluble del aceite de semilla de aguacate nativo mexicano (FHS), así como del quitosano contra *C. gloeosporioides*. Se estableció la concentración inhibitoria total de la fracción hidrosoluble ($CI_{100}=0.107$ mg/mL) y el porcentaje de mayor efectividad del quitosano (2 %).

La solución FHS presentó un alto contenido de ácidos fenólicos totales (104.04 mg Eq. Ácido Gálico/g ES) en comparación al de flavonoides totales (0.006 mg Eq. Quercetina/g ES).

Se confirmó la patogenicidad del hongo *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate cv. Hass inoculados con esporas, estableciéndose un inóculo del 1×10^3 esporas/mL, lo que causó la sintomatología de la infección en los frutos (antracnosis).

En los frutos de aguacate cv. Hass, recubiertos con quitosano solo o con la adición de la FHS (CI_{100}), se demostró actividad antifúngica sobre *C. gloeosporioides*, observando el mayor porcentaje de inhibición (94.5%) y menor índice de severidad ($IS=1$) en los frutos tratados con 2.5% de quitosano con la FHS. Los frutos recubiertos con este tratamiento mostraron el porcentaje menor de pérdida de peso, manteniendo los valores de firmeza más altos.

10. LITERATURA GENERAL CITADA

- Abubakar, A., Achmadi, S., y Suparto, I. (2017). Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5): 397-400.
- Adiletta, G., Di Matteo, M., y Petriccione, M. (2021). Multifunctional Role of Chitosan Edible Coatings on Antioxidant Systems in Fruit Crops: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2633.
- Al Aboody, M. S., y Mickymaray, S. (2020). Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*, 9(2): 45.
- Al-Hetar, M. Y., Zainal Abidin, M. A., Sariah, M., y Wong, M. Y. (2011). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Journal of Applied Polymer Science*, 120(4): 2434-2439.
- Alkhalaf, M., Alansari, W., Ibrahim, E., y ELhalwagy, M. (2019). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. *Journal of King Saud University – Science*, 31(4): 1358-1362.
- Alves Gomes, A. C., da Costa Lima, M., Rimá de Oliveira, K. Á., dos Santos Lima, M., Magnani, M., Saraiva Câmara, M. P., y Leite de Souza, E. (2020). Coatings with chitosan and phenolic-rich extract from acerola (*Malpighia emarginata* DC) or jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) processing by-product to control rot caused by *Lasiodiplodia* spp. in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *International journal of food microbiology*, 331: 108694.
- Anaya-Esparza, L. M., Pérez-Larios, A., Ruvalcaba-Gómez, J. M., Sánchez-Burgos, J. A., Romero-Toledo, R., y Montalvo-González, E. (2020). Funcionalización de los recubrimientos a base de quitosano para la conservación postcosecha de frutas y hortalizas. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23.
- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. L., y Aquino-Martínez, J. G. (2017). Inhibición in vitro de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista mexicana de Fitopatología*, 35(2): 170-185.
- Arceo-Martínez, M., Jiménez-Mejía, R., Salgado-Garciglia, R., Santoyo, G., López-Meza, J., y Loeza-Lara, P. (2019). Efecto antifúngico in vitro e in vivo de quitosano sobre patógenos de fresa en poscosecha. *Agrociencia*, 53(8): 1297-1311.
- Arguedas-Gamboa, M. (2008). Clasificación de síntomas de enfermedades forestales. Primera parte. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 5(14): 89-94.
- Arredondo-Ochoa, T. 2012. *Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco*. Tesis de Maestría.

Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro, México. 5 pp.

Ávila Quezada, G.D., 2006. El Aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa.

Avilán, L., Leal, F., y Bautista, D. (1992). Lauraceae. En Manual de Fruticultura, Principios y Manejo de la Producción. 666-776 pp. Chacaito: América.

Ávila-Quezada, G., Teliz-Ortiz, D., y Vaquera-Huerta, H. (2002). Dinamica espacio-temporal de roña, daño asociado a trips y antracnosis del aguacate en Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20, 77-87.

Azmai, W. N. S. M., Latif, N. S. A., y Zain, N. M. (2019). Efficiency of edible coating chitosan and cinnamic acid to prolong the shelf life of tomatoes. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science (JTRSS)*, 7(1): 47-52.

Badaracco, P., Sortino, M., y Pioli, R. N. (2020). Estudio de compuestos vegetales con potencial acción antifúngica sobre patógenos de plantas cultivadas. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 36(3): 244-252.

Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R., y López-Meza, J. (2019). Lipid-rich extract from mexican avocado seed (*Persea americana* var. drymifolia) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Immunology Research*, 2019(1): 7083491.

Bajić, M., Ročnik, T., Oberlintner, A., Scognamiglio, F., Novak, U., y Likozar, B. (2019). Natural plant extracts as active components in chitosan-based films: A comparative study. *Food packaging and shelf life*, 21: 100365.

Barrera, E., Gil, J., Restrepo, A., Mosquera, K., y Durango, D. (2015). A coating of chitosan and propolis extract for the postharvest treatment of papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiiiana). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(2): 7667-7678.

Barrientos Priego, A. F. 2010. El aguacate. CONABIO. Biodiversitas, 88:1-7

Barrientos-Priego, A. F., López-López, L. (2000). Historia y genética del aguacate. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, Distrito Federal, México, 19-31.

Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., y Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2): 108-118.

Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z., y Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest-a review. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 23(2): 103-122.

- Bautista-Baños, S., y Bravo-Luna, L. (2004). Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 6(1),63-67.
- Bergh, B. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. California Avocado society yearbook 76: 61-75
- Bernal-Estrada, J. A., y Díaz-Díez, C. A. (2020). Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de aguacates.
- Berumen Varela, G., Coronado Partida, L. D., Ochoa Jiménez, V. A., Chacón López, M. A., y Gutiérrez Martínez, P. (2015). Efecto del quitosano en la inducción de resistencia contra *Colletotrichum* sp. en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Investigación y Ciencia*, 23(66): 16-21.
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., y Thompson, A. K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64: 159-167.
- Bonilla-Rodríguez, A. B., Pintag-Fuertes M. M., y Medina-Ramírez G. E. (2023). Uso potencial de residuos agroindustriales como fuente de compuestos fenólicos con actividad biológica. *MediSur*, 21(6): 1322-1330.
- Borja-Espín D. y Goetschel-Gómez M. L. 2022. Subproductos del aguacate (*Persea americana*) Hass y Fuerte: estudio fitoquímico y proximal. In: Mosquera, T., ed. Productos naturales: investigación y perspectivas en Ecuador [online]. Quito: Editorial Abya-Yala. 29-50 pp.
- Bouslamti, M., Metouekel, A., Chelouati, T., El Moussaoui, A., Barnossi, A. E., Chebaibi, M., Nafidi, H.-A., Salamatullah, A. M., Alzahrani, A., Aboul-Soud, M. A. M., Bourhia, M., Lyoussi, B., y Benjelloun, A. S. (2022). *Solanum elaeagnifolium* var. *Obtusifolium* (Dunal) Dunal: Antioxidant, antibacterial, and antifungal activities of polyphenol-rich extracts chemically characterized by use of *in vitro* and *in silico* approaches. *Molecules*, 27(24): 8688.
- Calle Henao, C., Vasco Cárdenas, M.F., Ramírez Restrepo, S., López Lujan, L.M., Herrera Rosero, D., Montoya Vargas, M.P., Palacio Duque, M.H., Gómez Eslava, A.V., Bedoya Pérez, J.C., Figueroa Mosquera, E.K., Granada García, S.D. (2021). Manual de manejo poscosecha del aguacate Hass en Antioquia. 26 pp.
- Cannon P.F., Damm U., y Johnston PR and Weir BS. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73:181-213.
- Cano, J., Guarro, J., y Gené, J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of clinical microbiology*, 42: 2450-2454.

- Carvajal Tesorero, Z., Ramírez Zambrano, L., Ducurú, M., Gómez, V., Cabrera, G., Méndez, J., y Rodríguez Ortega, M. (2013). Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(1): 35-39.
- CODESIN. (2021). Manual para el establecimiento del cultivo de aguacate en la zona centro norte de Sinaloa. CODESIN.
- Confederat, L. G., Tuchilus, C. G., Dragan, M., Sha'at, M., y Dragostin, O. M. (2021). Preparation and antimicrobial activity of chitosan and its derivatives: A concise review. *Molecules*, 26(12): 3694.
- Cortés-Rivera, H. J., González-Estrada, R. R., Huerta-Ocampo, J. Á., Blancas-Benítez, F. J., y Gutiérrez-Martínez, P. (2021). 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*. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24, e293.
- Dabas D., Shegog RM., Ziegler GR. y Lambert JD. (2013). Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34): 6133–40.
- Darolt, J., Rocha Neto, A., y Di Piero, R. (2016). Effects of the protective, curative, and eradication applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 1014-1019.
- Davidova, S., Galabov, A. S., y Satchanska, G. (2024). Antibacterial, antifungal, antiviral activity, and mechanisms of action of plant polyphenols. *Microorganisms*, 12(12): 2502.
- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., y Galotto, M. J. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, 91(4): 751-756.
- Dos Passos Braga, S., Lundgren, G. A., Macedo, S. A., Tavares, J. F., dos Santos Vieira, W. A., Câmara, M. P. S., y de Souza, E. L. (2019). Application of coatings formed by chitosan and *Mentha* essential oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139: 631-639.
- Dos Passos Braga, S., Magnani, M., Madruga, M. S., de Souza Galvão, M., de Medeiros, L. L., Dantas Batista, A. U., Aguiar Dias, R. T., Fernandes, L. R., de Medeiros, E. S. y de Souza, E. L. (2020). Characterization of edible coatings formulated with chitosan and *Mentha* essential oils and their use to preserve papaya (*Carica papaya* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65: 102472.

- Duan, C., Meng, X., Meng, J., Khan, M. I. H., Dai, L., Khan, A., An, X., Zhang, J., Huq, T. y Ni, Y. (2019). Chitosan as a preservative for fruits and vegetables: a review on chemistry and antimicrobial properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 4(1): 11-21.
- Echevarría Hernández, A., Cruz Triana, A., Rivero Gonzáles, D., Rodríguez Pedroso, A. T., Ramírez Arrebato, M. A., y Cárdenas Travieso, R. M. (2012). Actividad antifúngica de la quitosana en el crecimiento micelial y esporulación del hongo *Pyricularia grisea* Sacc. *Cultivos Tropicales*, 33(3): 80-84.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., and Asselin, A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82(4): 398-402.
- El-Araby, A., Janati, W., Ullah, R., Uddin, N., y Bari, A. (2024). Antifungal efficacy of chitosan extracted from shrimp shell on strawberry (*Fragaria x ananassa*) postharvest spoilage fungi. *Heliyon*, 10(7).
- Elsabee, M. Z., y Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials science and engineering: C*, 33(4): 1819-1841.
- Espinosa-Cavazos, K. G., Sáenz-Galindo, A., y Castañeda-Facio, A. O. (2020). Películas de quitosano propiedades y aplicaciones. *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 77(591).
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., y Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6): 292-303.
- FAO. 2022. Análisis del mercado de las principales frutas tropicales en 2020. Roma.
- Fernández-Valdés, D., Bautista-Baños, S., Fernández-Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., y Falcón Rodríguez, A. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3): 52-57.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (2024). Panorama agroalimentario Aguacate 2024. *Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura*. <https://www.fira.gob.mx/Nd/index.jsp>
- Fundación hondureña de investigación agrícola. (2008). Trabajando con MIP, ¡Plantas sanas son plantas productivas!. *Departamento de protección vegetal*. <https://fhia.org.hn/proteccion-vegetal-2/>
- Gallegos-Espinoza, R. (1983). Algunos aspectos de la producción del aguacate en el estado de Michoacán. *Universidad Autónoma de Chapingo*. Patronato universitario. Grupo Editorial Gaceta, S.A. D.F. México, México.
- García, A. (1975). Cytogenetic studies in the genus *Persea* (lauraceae). I. Karyology of seven species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 17: 173–180.

- García-Hernández, D.G., Rivas-Morales, C., y Leos-Rivas, C. (2016). Actividad antifúngica. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., y Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. 101-128pp. Barcelona, España: OmniaScience.
- García-Mateos, M. D. R., Corrales-García, J., Cornejo-Vivar, T., y Hernández-Ramos, L. (2023). Recubrimiento biodegradable antifúngico a base de quitosano y aceite esencial de cítricos para la conservación de papaya (*Carica papaya* L.) en poscosecha. *CienciaUAT*, 17(2): 165-180.
- García-Moreno, M. Á. (2017). Efecto de los polifenoles de las hojas de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en la expresión génica de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León].
- Gatto, M., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N., Nigro, F., Vanadia, S., y Di Venere, D. (2011). Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 72-82.
- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., . . . Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113: 245-262.
- Gol, N. B., Patel, P. R., y Rao, T. V. R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185–195.
- González-Álvarez, M., Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M., y Pérez-Rodríguez, E. C. (2015). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos de agave (*Agave scabra*, Salm Dyck) sobre hongos postcosecha. *Phyton (Buenos Aires)*, 84(2): 427-434.
- González-Chavarro, C. F., Pulido-Blanco, V. C., Pantoja-Espinosa, D. C., y Portilla-Fuentes, F. (2021). Efecto de un recubrimiento comestible comercial sobre las características fisicoquímicas de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) bajo condiciones de almacenamiento. *Información tecnológica*, 32(3), 69-78.
- González-Estrada, R. R., Vega-Arreguín, J., Villanueva, R., Velázquez-Estrada, R. M., Ramos-Guerrero, A., y Gutiérrez-Martínez, P. (2020). Evaluación *in vitro* de productos químicos no convencionales para el control de *Penicillium citrinum*. *Polibotánica*, (49):161-172.
- Guillén-Andrade, H., Escalera-Ordaz, A. K., Torres-Gurrola, G., García-Rodríguez, Y. M., Espinosa García, F. J., y Tapia-Vargas, L. M. (2019). Identificación de nuevos metabolitos secundarios en *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, (23): 253–265.
- Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Gutiérrez-Alonso, J. G., Delgadillo-Sánchez, F., y Domínguez-Álvarez, J. L. (2002). Características morfológicas, culturales y

- patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(1): 24-30.
- Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82: 620-627.
- Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L. M., Salgado-Garciglia, R., Rodríguez-Zapata, L. C., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2013). Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2013: 986273.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., y 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(4): 541-547.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., y Guerra-Sanchez, M. G. (2011). Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25): 4243-4247.
- Herrera González, J. A., Bautista Baños, S., Salazar García, S., y Gutiérrez Martínez, P. (2020). Situación actual del manejo poscosecha y de enfermedades fungosas del aguacate Hass para exportación en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7): 1653-1654.
- International Plant Genetic Resources Institute [IPGRI]. (1995). *Descriptores para aguacate (Persea spp.)*. Roma, Italia.
- Ippolito, A., y Nigro, F. (2000). Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, 19(2000): 715-723.
- Jiménez Mejía, R., Arceo Martínez, M. T., y Loeza Lara, P. D. (2018). Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción. *e-CUCBA*, (9): 17-23.
- Kimaru, K. S., Muchemi, K. P., y Mwangi, J. W. (2020). Effects of anthracnose disease on avocado production in Kenya. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1): 1799531.
- Korsten, L., Bezuidenhout, J.J. y Kotze, J.M. (1989). Biocontrol of avocado postharvest diseases. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 12: 10 - 12.
- Kumarihami, H. M. P. C., Kim, Y. H., Kwack, Y. B., Kim, J., y Kim, J. G. (2022). Application of chitosan as edible coating to enhance storability and fruit quality of Kiwifruit: A Review. *Scientia Horticulturae*, 292: 110647.

- Lara-Márquez, M., Báez-Magaña, M., Raymundo-Ramos, C., Spagnuolo, P. P., Macías-Rodríguez, L., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. (2020). Lipid-rich extract from mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) induces apoptosis and modulates the inflammatory response in Caco-2 human colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 64: 103658.
- León-Durán, M. D., y Mancheno-Cárdenas, M.X. (2021). Actividad antifúngica de compuestos fenólicos de tara (*Caesalpinia spinosa*) frente a *Fusarium graminearum*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(1): 39-50.
- Lira-Saldivar, R. H., Hernández-Suárez, M., y Hernández-Castillo, F. D. (2006). Activity of *Larrea tridentata* (DC) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2): 211-216.
- López-Mora, L. I., Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Jiménez-García, L. F., y Zavaleta-Mancera, H. A. (2013). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(3): 315-331.
- López-Muñoz, N. R., Romero-Bastidas, M., Arce-Amézquita, P. M., y Hernández-Rubio, J. S. (2019). Actividad antifúngica de antioxidantes derivados de cuatro cultivares de *Capsicum* spp. contra hongos fitopatógenos. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(18): 487-498.
- Madera-Santana, J. T., De Dios-Aguilar, M. A., Colín-Chávez, C., Mariscal-Amaro, L. A., Núñez-Colín, C. A., Veloz-García, R., Guzmán-Maldonado, S. H., Peña-Caballero, V., Grijalva-Verdugo, C. P., y Rodríguez-Núñez, J. R. (2019). Recubrimiento a base de quitosano y extracto acuoso de hoja de *Moringa oleífera* obtenido por UMAE y su efecto en las propiedades fisicoquímicas de fresa (*Fragaria x ananassa*). *Biotechnia*, 21(2): 155-163.
- Madera-Santana, T. J., Toledo-López, V. M., Martinez-Robison, K., Rejón-Moo, V., y Fortiz-Hernández, J. (2023). Evaluación de películas comestibles de quitosano, agar y tomillo para mantener la calidad de frutos de aguacate 'Hass' durante su almacenamiento. *Biotechnia*, 25(1): 116-125.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M., Olaizola, C., y Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45.
- Mandal, M. K., y Domb, A. J. (2024). Antimicrobial activities of natural bioactive polyphenols. *Pharmaceutics*, 16(6): 718.
- Márquez, C., Cartagena, J., y Pérez-Gago, M. B. (2009). Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad en poscosecha del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* T.). *Vitae*, 16(3), 304-310.

- Martínez-Batista, E., González-Arias, C. A., Velázquez-Estrada, R. M., Herrera-González, J. A., y Gutiérrez-Martínez, P. (2024). *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of chitosan and identification of potentially toxigenic fungi in stored maize of Nayarit, Mexico. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 23(2): 1-12.
- Martín-Gordo, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1): 81-104.
- Masangwa, J., Aveling, T., y Kritzing, Q. (2013). Screening of plant extracts for antifungal activities against *Colletotrichum* species of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *The Journal of Agricultural Science*, 151(4): 482-491.
- Matei, P. M., Buzón-Durán, L., Pérez-Lebeña, E., Martín-Gil, J., Iacomí, B. M., Ramos-Sánchez, M. C., y Martín-Ramos, P. (2020). *In vitro* antifungal activity of chitosan-polyphenol conjugates against *Phytophthora cinnamomi*. *AgriEngineering*, 2(1): 72-77.
- Matos González, C. A. (2020). Revisión de literatura: Biopelículas a base de quitosano como potencial aplicación en empaque de alimentos. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Meng, D., Garba, B., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., Li, M., y Wang, Y. (2020). Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *International journal of biological macromolecules*, 158: 1063-1070.
- Moreira, M. D. R., Roura, S. I., y Ponce, A. (2011). Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. *LWT-Food science and technology*, 44(10): 2335-2341.
- Mukdisari, Y., Suketi, K., y Widodo, W. D. (2016). Fruit coating with chitosan and beeswax to extend papaya shelf life. *Journal of Tropical Crop Science Vol*, 3(3).
- Munhuweyi, K., Mpai, S. y Sivakumar, D. (2020). Extension of avocado fruit postharvest quality using non-chemical treatments. *Agronomy*, 10 (2): 212.
- Nataren Velazquez, J., del Ángel Pérez, A. L., Megchún-García, J. V., Ramírez Herrera, E., y Meneses Márquez, I. (2020). Caracterización productiva del aguacate (*Persea americana* Mill.) en la zona de alta montaña Veracruz, México. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*, 6(12): 1406–1423.
- Nga, N. T. T., y Bac, N. X. (2021). Effects of chitosan-plant extract coatings on the postharvest quality of mango fruits (*Mangifera indica*) with anthracnose disease. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, 4(4): 1293–1302.
- Nxumalo, K. A., y Fawole, O. A. (2022). Effects of chitosan coatings fused with medicinal plant extracts on postharvest quality and storage stability of purple passion fruit (*Passiflora edulis* var. Ester). *Food Quality and Safety*, 6: fyac016.

- O. Elansary, H., Szopa, A., Klimek-Szczykutowicz, M., Ekiert, H., Barakat, A. A., y A. Al-Mana, F. (2020). Antiproliferative, antimicrobial, and antifungal activities of polyphenol extracts from ferocactus species. *Processes*, 8(2): 138.
- O'Connell, R., y Ride, J. (1990). Chemical detection and ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and molecular plant pathology*, 37(1): 39-53.
- Ochoa-Zarzosa, A., Báez-Magaña, M., Guzmán-Rodríguez, J. J., Flores-Alvarez, L. F., Lara-Márquez, M., Zavala-Guerrero, B., Salgado-Garciglia, R., López-Gómez, R., y López-Meza, J. (2021). Bioactive molecules from native mexican avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76: 133-142.
- Ogbebor, N. O., Adekunle, A. T., y Enobakhare, D. A. (2007). Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. causal organism of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) leaf spot using plant extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6(3): 213-218.
- Onaran, A., Bayar, Y., Karakurt, T., Tokatlı, K., Bayram, M., y Yanar, Y. (2021). Antifungal activity of chitosan against soil-borne plant pathogens in cucumber and a molecular docking study. *Journal of Taibah University for Science*, 15(1): 852-860.
- Ortega-Cardona, C. E., y Aparicio Fernández, X. (2020). Quitosano: una alternativa sustentable para el empaque de alimentos. *Revista digital universitaria*, 21(5).
- Osondu, H. A., Akinola, S. A., Shoko, T., y Sivakumar, D. (2022). Phenolic compounds suppress anthracnose decay by enhancing antifungal properties and biochemical defence responses in avocado fruit. *Journal of Plant Pathology*, 104(2): 711-720.
- Pacheco-Coello, F., Bermúdez-Fernández, N., y Blanco-Altuve, M. (2020). Compuestos fenólicos e inhibición del estrés oxidativo de un extracto metanólico de semilla de aguacate (*Persea americana* Mill). *Revista FAV-UNRC Ab Intus*, 6(3): 68-74.
- Padró-Nombrét, D., Abraham-Juárez, M. D. R., Cerón-García, A., Del Rincón-Castro, M. C., Gómez-Salazar, J. A., Herrera-Castillo, F. L.M., y Mares-Mares, E. (2019). Funcionalización de recubrimientos comestibles de quitosano y alginato de sodio a partir de compuestos fenólicos de Jamaica (*hibiscus* SABDARIFFA). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León*. 4 (2019): 429-435.
- Páez-Redondo, A., Prusky, D., y Hoyos-Carvajal, L. (2022). Quiescence as a strategic stage for the infective process of *Colletotrichum* species. *Revista UDCA. Actualidad & Divulgación Científica*, 25(2): e2073.
- Pérez-Jiménez, R. M. (2008). Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *European Journal of Plant Science and Biotechnoly*, 2(1): 1-24.
- Possamai Rossatto, F. C., Tharmalingam, N., Escobar, I. E., d'Azevedo, P. A., Zimmer, K. R., y Mylonakis, E. (2021). Antifungal activity of the phenolic compounds ellagic acid (EA)

- and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against drug-resistant *Candida auris*. *Journal of Fungi*, 7(9): 763.
- Poznanski, P., Hameed, A., y Orczyk, W. (2023). Chitosan and chitosan nanoparticles: Parameters enhancing antifungal activity. *Molecules*, 28(7): 2996.
- Priyadarshi, R., Bijender-Kumar, S., Deebea, F., Kulshreshtha, A., y Singh-Negi, Y. (2018). Chitosan films incorporated with apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil as active food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 85: 158-166.
- Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario. (2013). *Manual técnico del cultivo de aguacate en Honduras (Persea americana Mill.)*. Tegucigalpa, Honduras. Secretaría de agricultura y ganadería.
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., y Fluhr, R. (2013). Quiescent and necrotrophic life style choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1): 155-176.
- Prusky, D., y Keen, N. T. (1993). Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease*, 77(2): 114-119.
- Ramírez-Gil J. G., Gilchrist-Ramelli, E., y Morales-Osorio, J. G. 2017. Economic impact of the avocado (cv. Hass) wilt disease complex in Colombian crops under different technological management levels. *Crop Protection*, 101: 103-115
- Ramos-Bell, S., Diaz-Cayetano, G., Hernández-Montiel, L. G., Velázquez-Estrada, R. M., Montalvo-González, E., y Gutiérrez-Martínez, P. (2024). Conservación fisicoquímica de arándanos tratados con quitosano y ácido salicílico en poscosecha. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 15(5).
- Ramos-García, M. D. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I., y Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1): 44-57.
- Ramos-Jerez, R. (2007). Phytochemical analysis of avocado seed (*Persea americana* Mill, c.v. Hass. Cuvllier Verlag Göttingen, 11-47.
- Redondo-Blanco, S., Fernández, J., López-Ibáñez, S., Miguélez, E.M., Villar, C.J., y Lombó, F. (2020). Plant phytochemicals in food preservation: Antifungal bioactivity: A review. *Journal of Food Protection*, 83 (1): 163-171.
- Roca, M.M.G., Graças Ongarelli, M., Chamma Davide, L., y Mendes Costa, M.C. 2000. Ultrastructural aspects in perithecia hyphae septal pores of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31 (3): 223-225.
- Rodríguez-López, É. S., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Delgado, S., Gutiérrez-Diez, A., y Mayek-Pérez, N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides*

- (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35: 898-905.
- Rodríguez-López, E. S., González-Prieto, J. M., y Mayek-Pérez, N. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1): 53-63.
- Rodríguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Dura, C., Grimaldo-Juarez, C., y Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1): 72–77.
- Rodríguez-Nodals, A. y Sánchez-Pérez, P. (2009). Especies de frutales cultivadas en Cuba en la Agricultura Urbana. Agrinfor.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebato, M. A., Bautista-Baños, S., Cruz-Triana, A., y Rivero-González, D. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1): 91-96.
- Rodríguez-Saona, C., y Trumble, J. T. (2000). Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. *Current Organic Chemistry*, 4(12): 1249-1260.
- Rodríguez-Valdovinos, K. Y., Salgado-Garciglia, R., Vázquez-Sánchez, M., Álvarez-Bernal, D., Oregel-Zamudio, E., Ceja-Torres, L. F., y Medina-Medrano, J. R. (2021). Quantitative analysis of rutin by HPTLC and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of phenolic-rich extracts from *Verbesina sphaerocephala*. *Plants*, 10(3), 475.
- Romanazzi, G., y Moumni, M. (2022). Chitosan and other edible coatings to extend shelf life, manage postharvest decay, and reduce loss and waste of fresh fruits and vegetables. *Current Opinion in Biotechnology*, 78: 102834.
- Romero-Serrano, A., y Pereira, J. (2020). Chitosan, a versatile biomaterial. State of the art from its obtaining to its multiple applications. *INGENIERÍA UC*, 118-135.
- Rosas Jauregui, I. A., Hernández Castillo, F. D., Palomo Ligas, L., Martínez Alemán, S. R., Ascacio Valdés, J. A., y Rodríguez Herrera, R. (2021). Polifenoles de diferentes fuentes vegetales y su efecto *in vitro* contra patógenos del garbanzo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(8): 1415-1427.
- Rutiaga-Quñones, J. G. (2001). *Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen*. Buchverl. Gräfelfing.
- SAGARPA. (2017). Planeación agrícola nacional 2017-2030. México.

- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., y Biswas, P. (2015). Synthesis and *in vitro* antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International journal of Biological Macromolecules*, 75: 346-353.
- Salazar-García, S., Cossio-Vargas, L. E., González-Durán, I. J. L., y Lovatt, C. J. (2007). Desarrollo floral del aguacate 'hass' en clima semicálido. Parte II. Generación y validación de modelos de predicción del desarrollo floral. *Revista chapingo serie horticultura*, 13(1): 93-101.
- Salazar-García, S., Medina-Carrillo, R. E., y Álvarez-Bravo, A. (2016). Influencia del riego y radiación solar sobre el contenido de fitoquímicos en la piel de frutos de aguacate 'Hass'. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7 (SPE13), 2565-2575.
- Sánchez Valdés, A., y Sánchez Rodríguez, G. (2021). El Clúster del Aguacate en México. Un crecimiento sostenido a partir de la producción y desarrollo del mercado. *RIVAR*, 8(24): 21-35.
- Sánchez-Pérez, J. D., Jaimes-Lara, M. G., Salgado-Garciglia, R., y López-Meza, J. E. (2009). Root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhibit the mycelial growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 595-601.
- Sardo, A. S., Sedaghat, N., Taghizadeh, M., y Milani, E. (2017). Effect of packaging type and chitosan edible coating on the physico-chemical and sensory characteristics of Royal Greenhouse cucumber during storage conditions. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*. 13(2): 363-378.
- SFA, 2011. Monografía de cultivos. Aguacate. Subsecretaría de Fomento de Agronegocios, 2011. 1-10pp.
- Shiekh, R. A., Malik, M. A., Al-Thabaiti, S. A., y Shiekh, M. A. (2013). Chitosan as a novel edible coating for fresh fruits. *Food Science and Technology Research*, 19(2): 139-155.
- SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). (2023). Escenario mensual de productos agroalimentarios. Ciudad de México.
- Singh, A. K., Kim, J. Y., y Lee, Y. S. (2022). Phenolic compounds in active packaging and edible films/coatings: natural bioactive molecules and novel packaging ingredients. *Molecules*, 27(21): 7513.
- Singleton V.L., Orthofer R. y Lamuela-Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299: 152-178.

- Solano-Doblado, L. G., Alamilla-Beltrán, L., y Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21.
- Souza, M. M. de., Prietto, L., Ribeiro, A. C., Souza, T. D. de., y Badiale-Furlong, E. (2011). Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência E Agrotecnologia*, 35(6): 1050–1058.
- Suseno, N., Savitri, E., Sapei, L., y Padmawijaya, K. S. (2014). Improving shelf-life of cavendish banana using chitosan edible coating. *Procedia Chemistry*, 9:113-120.
- Tapia-Rodríguez, A., Ramírez-Dávila, J. F., Salgado-Siclán, M. L., Castañeda-Vildózola, Á., Maldonado-Zamora, F. I., y Lara-Díaz, A. V. (2020). Distribución espacial de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en aguacate en el Estado de México, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1): 72-81.
- Téliz, D., y Mora, A. (2006). El Aguacate y su manejo integrado. Ediciones Mundi-Prensa.
- Torres, R., Casals, C., Usall, J., y Teixidó, N. (2022). Estrategias alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de las enfermedades de postcosecha de gruta dulce. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (341): 6.
- Trigos, Á., Ramírez, K., y Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista mexicana de micología*, 28(SPE): 125-129.
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. de J., Ulloa, J. A., Ramírez-Ramírez, J. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., y Bautista Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 19: 3953–3964.
- Tucuch-Pérez, M. A., Bojórquez-Vega, J. J., Arredondo-Valdes, R., Hernández-Castillo, F. D., y Anguiano-Cabello, J. C. (2021). Actividad biológica de extractos vegetales del semidesierto mexicano para manejo de *Fusarium oxysporum* de tomate. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 8(2): e2745.
- Valdiviezo-Marcelo, J. (2021). Una revisión de la obtención de compuestos fenólicos a partir de cáscara y semilla de palta (*Persea americana* Mill.), empleando tecnologías emergentes. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Frontera].
- Vázquez-Briones, M. C., Y Guerrero-Beltrán, J. A. (2013). Recubrimientos de frutas con biopelículas. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2): 5-14.
- Verdeguer Monge, A. (1985). Enfermedades generales producidas por hongos en las plantas ornamentales. *Horticultura: Revista de Industria, Distribución y Socioeconomía Hortícola: Frutas, Hortalizas, Flores, Plantas, Árboles Ornamentales y Viveros*, 24: 25-37.

- Villota-Burbano, J. E., y Vázquez-Ochoa, O. Y. (2021). Evaluación *in vitro* del extracto etanólico de hojas de borraja (*Borago officinalis*) contra la actividad fungistática. *Agronomía Costarricense*, 45(2): 9-27.
- Wang, D., Yang, H., Lu, X., Wu, Y., y Blasi, F. (2022). The inhibitory effect of chitosan based films, incorporated with essential oil of *Perilla frutescens* leaves, against *Botrytis cinerea* during the storage of strawberries. *Processes*, 10(4): 706.
- Wang, W., Bostic, T. R., y Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food chemistry*, 122(4): 1193-1198.
- Whiley, A. W., Saranah, J. B., Cull, B. W., y Pegg, K. G. (1988). Manage avocado tree growth cycles for productivity gains. *Queensland Agricultural Journal*, 114(1): 29-36.
- Xoca-Orozco, L. A., Aguilera-Aguirre, S., López-García, U. M., Gutiérrez-Martínez, P., Chacón-López, A. (2018). Effect of chitosan on the in vitro control of *Colletotrichum* sp., and its influence on post-harvest quality in Hass avocado fruits. *Revista Bio Ciencias*, 5: 1-20.
- Yamawaki, C., Oyama, M., Yamaguchi, Y., Ogita, A., Tanaka, T., y Fujita, K. I. (2019). Curcumin potentiates the fungicidal effect of dodecanol by inhibiting drug efflux in wild-type budding yeast. *Letters in Applied Microbiology*, 68(1): 17-23.
- Yang, C., Lu, J. H., Xu, M. T., Shi, X. C., Song, Z. W., Chen, T. M., Herrera-Balandrano, D. D., Zhang, Y. J., Laborda, P., Shahriar, M. y Wang, S. Y. (2022). Evaluation of chitosan coatings enriched with turmeric and green tea extracts on postharvest preservation of strawberries. *Lwt*, 163:113551.
- Yang, G., Yue, J., Gong, X., Qian, B., Wang, H., Deng, Y., y Zhao, Y. (2014). Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries. *Postharvest Biology and Technology*, 92: 46-53.
- Zabka, M., y Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93(6): 1051-1056.
- Zemljic, L. F., Glaser, T. K., Plohl, O., Anžel, I., Šimat, V., Čagalj, M., Mežnar, E., Malin, V., Sterniša, M., y Možina, S. S. (2022). Biomass-derived plant extracts in macromolecular chitosan matrices as a green coating for PLA Films. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(4): 228.
- Zhang, H., Li, R., y Liu, W. (2011). Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: A review. *International journal of molecular sciences*, 12(2), 917-934.

11. ANEXOS

Erandi Atsiri Aguilar Ortiz

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* DE UN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO Y C...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

tmoid::3117458546751

Fecha de entrega

13 may 2025, 8:22 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

13 may 2025, 1:40 p.m. GMT-6

Nombre de archivo

ACTIVIDAD ANTE-FÚNGICA SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* DE UN RECUBRIMIENTO DE QUIL...pdf

Tamaño de archivo

1.5 MB

97 Páginas

31,287 Palabras

177,669 Caracteres

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



le corresponda.

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS	
Título del trabajo	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> DE UN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE SEMILLA DE AGUACATE NATIVO MEXICANO (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>) PARA LA PRESERVACIÓN DE FRUTOS DE AGUACATE Cv. HASS	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	ERANDI ATSIRI AGUILAR ORTIZ	2230600F@umich.mx
Director	RAFAEL SALGADO GARCIGLIA	rafael.salgado@umich.mx
Codirector	ALEJANDRA HERNÁNDEZ GARCÍA	alejandra.hernandez@umich.mx
Coordinador del programa	MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS	mae.ciencias.biologicas@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	NO	
Traducción a otra lengua	NO	
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	ERANDI ATSIRI AGUILAR ORTIZ ~ ^ <i>[Firma]</i>
Lugar y fecha	MORELIA, MICHOACÁN A 12 DE MAYO DEL 2025