

Actividad antifúngica de residuos de mamey contra *Alternaria* spp Antifungal activity of mamey residues against *Alternaria* spp

V. M. Rodríguez-Romero ^{a,*}, N. Martínez-Ramírez^a

^a Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI). Instituto Politécnico Nacional (IPN). Avenida Acueducto s/n, Barrio La Laguna Ticomán, Ciudad de México, CP 07340, México.

Resumen

Los hongos son causantes de devastaciones enteras de cultivos y los agroquímicos son el principal método de control. El uso de extractos vegetales con actividad antifúngica es una alternativa para reducir el uso de productos químicos. Se evaluaron los extractos de residuos del mamey en el desarrollo de *Alternaria* spp. Se prepararon extractos etanólicos de residuos de mamey en proporción 1:5 (w/v), se agitaron 72 horas, filtraron y concentraron en un rotavapor. El concentrado fue diluido en etanol (1 mL) y mezclado con PDA a una concentración final 5 g L⁻¹. Se determinó el efecto antifúngico del medio a través de mediciones del diámetro del crecimiento del hongo. Los tratamientos mostraron 6.95, 18.65 y 46.43% de inhibición para extracto de cascavilla de almendra, almendra desgrasada y cascara respectivamente. El uso de extractos etanólicos de cascara de mamey y almendra desgrasada son una opción para el control no químico de hongos fitopatógenos como *Alternaria* spp.

Palabras Clave: *Pouteria sapota*, *Alternaria* spp., Agroquímicos.

Abstract

Fungi are the cause of entire crop devastation and agrochemicals are the main method of control. The use of plant extracts with antifungal activity is an alternative to reduce the use of chemical products. Mamey fruit residue extracts were evaluated in the development of *Alternaria* spp. Ethanol extracts of mamey fruit residues were prepared in a 1:5 (w/v) ratio, stirred for 72 hours, filtered and concentrated on a rotary evaporator. The concentrate was diluted in ethanol (1 mL) and mixed with PDA to a final concentration of 5 g L⁻¹. The antifungal effect of the medium was determined through measurements of the diameter of fungal growth. The treatments showed 6.95, 18.65 and 46.43% inhibition for almond, almond and pericarp husk flour, respectively. The use of ethanolic extracts of mamey pericarp flour is an option for the non-chemical control of phytopathogenic fungi such as *Alternaria* spp.

Keywords: *Pouteria sapota*, *Alternaria* spp., Agrochemicals.

1. Introducción

El mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn), es una fruta popular en México (Fig. 1), los frutos son ovoides a elipsoides y el ápice es puntiagudo, miden de 7,5 a 22,8 cm de largo y pesan de 0,227 a 2,3 kg. Tienen una piel áspera y gruesa de color marrón oscuro y pueden tener de uno a cuatro huesos que son duros, aceitosos y puntiagudos con un aroma a almendra amarga y una considerable cantidad de aceite (Yahia & Orozco 2011).

El mamey es altamente perecedero y necesita refrigeración para mantener sus características organolépticas

y nutricionales (Villegas-Monter et al., 2016), debido a esto, generalmente se consume la pulpa fresca o congelada y algunos procesamientos comerciales incluyen la elaboración de yogures, bebidas, helados o jaleas, además el aceite de la semilla de mamey que en frutos maduros representan un proporción entre el 44 y 50 %, se usa para la elaboración de productos cosméticos como jabones y acondicionadores para el cabello (Nava-Cruz & Martín Ricker 2005; Moo-Huchin et al 2013; Solís-Fuentes et al., 2015). La escala de producción, procesamiento y comercialización de frutos y semillas de mamey evidencia el gran potencial comercial de este fruto.

*Autor para la correspondencia: vmrodriguezr@ipn.mx

Correo electrónico: vmrodriguezr@ipn.mx (Victor Manuel Rodríguez-Romero), nancymaram@outlook.es (Nancy Martínez-Ramírez)



Fig. 1 Zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn), fruto en árbol y apariencia de pulpa y semilla. (adaptado de Torres-Rodríguez et al., 2011).

Durante el procesamiento del mamey y en general en la industria de frutas y verduras se generan grandes cantidades de materiales consideradas un desecho, como cáscaras, semillas, huesos y pulpa, que causa problema de contaminación si no se dispone adecuadamente, además estos residuos contienen diversas sustancias reutilizables de alto valor con gran potencial económico como los compuestos antifúngicos (Kuyu 2015). Los compuestos antifúngicos de plantas y partes de ellas pueden encontrarse en tejidos vegetales externos, como corteza, cáscara y cutícula; otros están ubicados en toda la planta y otros son producidos como respuesta a estrés fisiológico o infección, y son tan diversos como fenoles simples, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, isocumarinas, sesquiterpenoides, polienos, estilbenos, furanoterpenoides y han llamado la atención como una alternativa natural al uso de componentes de origen sintético para el control de hongos fitopatógenos (Kuc 1992).

Los géneros de hongos que provocan las mayores pérdidas durante pre y poscosecha son *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Colletotrichum* y *Rhizopus* (Petriacq, 2018; Trigos et al., 2008); específicamente la presencia del género *Alternaria* representa una amenaza para la salud, ya que producen más de 70 metabolitos secundarios tóxicos, algunos de ellos actúan como micotoxinas para humanos y animales mostrando efectos genotóxicos, mutagénicos, cancerígenos y citotóxicos por lo que manejo y control es importante (Pavón-Moreno et al. 2012). El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de extractos vegetales de residuos de mamey (*Pouteria sapota* Jacq. HE Moore & Stearn) sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria spp.*

2. Materiales y métodos

2.1 Material biológico

Se usaron frutos de mamey (*Pouteria sapota* Jacq. HE Moore & Stearn) provenientes de la región de Los Tuxtlas, Veracruz. Se seleccionaron piezas con una madurez comercial (18-25°Brix), sin daños físicos, libres de plagas y sin enfermedades evidentes. Los frutos se lavaron, mondaron y se separó la cáscara y la semilla; de la semilla se obtuvieron dos fracciones, la almendra y cascarilla de almendra.

Alternaria spp. se cultivó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA, BD Bioxon, México) durante 4-7 días e incubó a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) para los ensayos posteriores.

2.2 Obtención de los extractos de residuos de mamey

Para la cáscara del fruto y cascarilla de almendra se realizó una molienda seca, posteriormente se tamizó con malla #30 y recuperó la fracción que pasó a través de la malla. Para la almendra se realizó una molienda seca y posteriormente se desgrasó (método 920.39, AOAC, 1990). Cada uno de los polvos obtenidos (cáscara de fruto, almendra desgrasada y cascarilla de almendra) se mezclaron individualmente con etanol en una relación 1:5 w/v, se agitó a 120 rpm durante 72 h, filtró y posteriormente se concentró en rota vapor.

2.3 Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos

Los extractos de residuos de mamey secos (80 mg) se disolvieron por separado en 1 ml de etanol, se mezclaron en medio de cultivo PDA para obtener una concentración de 5 g L⁻¹. Para el tratamiento control, se mezcló el medio de cultivo PDA con etanol (sin extractos) en la misma proporción del tratamiento anteriormente descrito. Posteriormente se colocaron discos de micelio de 5mm de diámetro del hongo fitopatógeno *Alternaria spp.* en el centro de la caja, se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días, después se midió el diámetro de la colonia en dos direcciones y se calculó el promedio, el porcentaje de inhibición micelial se calculó según lo descrito por Korsten y Jager (1995) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición}(\%) = \frac{DC - DT}{DC} \times 100$$

Donde: DC es el diámetro del cultivo control y DT es el diámetro del cultivo del tratamiento, cada tratamiento se realizó por triplicado, el experimento se llevó a cabo dos veces.

2.4 Análisis de datos

Los resultados de los ensayos *in vitro* se analizaron por medio de un ANDEVA, los tratamientos se compararon con la prueba Tukey (*= $p \leq 0.05$) con SAS® 9.4.

3. Resultados y análisis de resultados

Los resultados de este estudio mostraron que los extractos de residuos de mamey pueden afectar crecimiento normal *in vitro* de *Alternaria spp.*, el crecimiento radial del hongo en medio PDA fue 36.06 mm de diámetro en la caja de Petri después de 7 días de incubación. A excepción de la cascarilla de almendra, el resto de los tratamientos tuvieron una reducción en el crecimiento micelial que fue estadísticamente significativa (*= $p \leq 0.05$) con respecto al control en PDA, así como un efecto inhibitorio que varió entre 18 y 46% para almendra desgrasada y pericarpio respectivamente (Cuadro 1, Figura 2).

Existen diversos reportes sobre el manejo de las enfermedades causadas por distintos hongos mediante la aplicación extractos de plantas con resultados variables,

Bautista et al. (2000) observaron una disminución en el crecimiento de *Alternaria* spp. cuando fue tratado con extractos acuosos de hojas de *Pouteria sapota* sin embargo no mostraron diferencia estadística con respecto al control, por otro lado, cuando usaron polvos de hojas se observó una disminución estadísticamente significativa cuando se comparó control.

Cuadro 1. Crecimiento micelial e inhibición (%) *in vitro* de los extractos etanólicos de residuos de mamey sobre *Alternaria* spp.

Tratamiento	Crecimiento radial (mm)	% de inhibición
Control PDA	36.06 ± 0.41 ^a	0.00
Cascarilla de almendra	28.90 ± 60 ^{ab}	6.95
Almendra desgrasada	25.27 ± 3.37 ^b	18.64
Pericarpio	16.64 ± 4.80 ^c	46.43

Letras diferentes de superíndice indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) de acuerdo con comparación de medias por Tukey; $n=5$, \pm desviación estándar

Ertürk (2006) estudió los extractos etanólicos de distintas especies vegetales, observando que extractos de *Laurus nobilis*, *Dianthus coryophyllum*, *Juniperus oxycedrus* y *Colutea arborescens* mostraron actividad inhibidora contra *Aspergillus niger*, algunos de ellos tan efectivos como el antifúngico comercial nistatina.

Mahlo et al. (2010), evaluaron la actividad de extractos acetónicos de hojas *Bucida buceras*, *Breonadia salicina*, *Harpephyllum caffrum*, *Olinia ventosa*, *Vangueria infausta* y *Xylothea kraussiana*, contra los hongos fitopatógenos *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Colletotricum gloeosporioides*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* observando que todos los extractos de plantas ejercieron actividad antifúngica contra los hongos.

Tapwal et al. (2011), usaron extractos acuosos de las hojas de *Cannabis sativa* y observaron que concentración del 20% inhibió el crecimiento de *Cochliobolus lunata* un 100%, seguido de *Alternaria zinniae* con un 59,68%, *Alternaria solani* con 53,53%, *Fusarium oxysporum* con 47,96% y *Rhizoctonia solani* con 47,59%.

Ramaiah and Garampalli (2015), usaron extractos acuosos de distintas plantas contra el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, donde *Solanum indicum*, *Azadirachta indica* y *Oxalis latifolia* inhibieron el crecimiento del hongo en un 78,33, 75,00 y 70,33% respectivamente.

El efecto antifúngico de los tratamientos está en función de los componentes presentes en las estructuras de los cuales proceden; en los extractos del presente estudio, no se determinaron las identidades de los compuestos antifúngicos, pero la capacidad de *P. sapota* para reducir el crecimiento en los hongos se atribuye a la presencia de compuestos

característicos pero no exclusivos de la familia *sapotacea*, como catequina, epicatequina, miricetina, dihidromiricetina o ácido gálico (Baky 2016), así como los ácidos grasos presentes en la semilla como el ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico (Moo-Huchin et al., 2013).

Vitellaria paradoxa Gaertn. es una planta de la familia *Sapotaceae* y en la cual se ha identificado la presencia de catequinas con un efecto de inhibición sobre los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* (Ahmed et al. 2009).

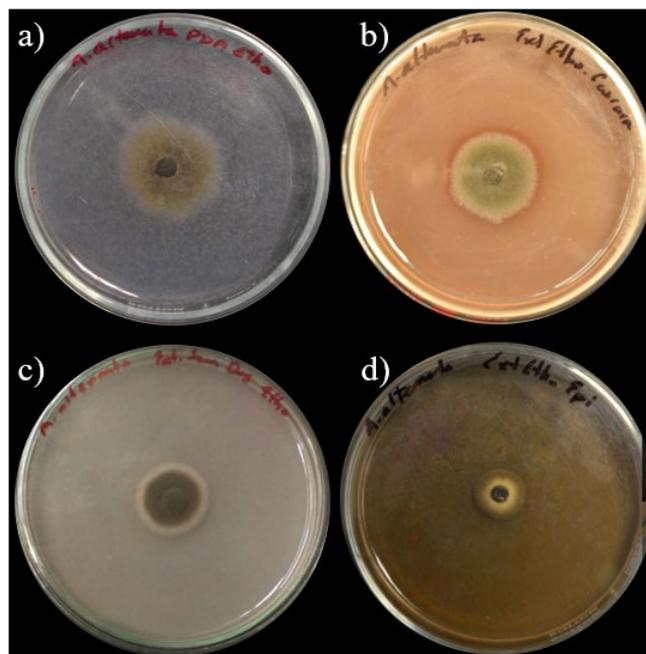


Fig 2. Efecto de los extractos etanólicos de desechos de mamey sobre el crecimiento de *Alternaria* spp a) Control (PDA), b) extracto de cascarilla de almendra, c) extracto de almendra desgrasada, d) extracto de cascara.

Yamaji & Ichihara et al., (2012) aislaron catequina y epicatequina de *Fagus crenata*, los cuales mostraron inhibición en el crecimiento micelial de *Cylindrocarpon* sp. Y *Colleotrichum dematium*; se sabe que estos compuestos generalmente ingresan a la célula a través del transporte activo que llega al núcleo e inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Al Aboody and Suresh 2020) y dichos compuestos se distribuyen principalmente en el tejido de protección de las plantas (epidérmico y cortical), por lo que es probable su presencia en la cascara de mamey ejerciendo así el efecto antifúngico observado en este estudio.

Por otra parte, la miricetina que se encuentra en la familia de las *sapotaceas*, también ha sido identificada y aislada de frutos y hojas de distintas plantas, Souza-Moreira et al., (2019) la aislaron de extractos etanólicos de hojas de *Plinia cauliflora* y observaron actividad contra los hongos *Trichophyton rubrum* y *Microsporium canis*. La miricetina ejerce actividad antifúngica induciendo un daño en la célula al dañar la integridad de la pared celular y aumenta notablemente la permeabilidad de la membrana (Lee & Kim 2021).

Otros estudios mostraron que extractos de *Sesuvium portulacastrum* tiene una composición de ácidos palmítico, oleico, linoléico y linoleico, (también presentes en la semilla del mamey), los cuales presentan actividad antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger* (Chandrasekaran et al., 2011), en general la acción antifúngica de distintos ácidos

grasos, se debe a que ejercen una ruptura de la membrana que da como resultado la liberación de electrolitos y proteínas intracelulares que culminan con la desintegración citoplasmática del micelio (Carballeira, 2008). Boleti *et al.*, (2007) aislaron, purificaron y caracterizaron una proteína (pouterina) de las semillas de *Pouteria torta* (familia *Sapotaceae*); la pouterina inhibió el crecimiento de los hongos *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum musae* en un 85 y 54 % con respecto al control, esta proteína podría estar presente en la semilla de mamey ejerciendo su efecto antifúngico en los ensayos de este estudio.

4. Conclusiones

Todos los extractos de residuos de frutos de *P. sapota* inhibieron el crecimiento micelial *Alternaria* spp. en pruebas *in vitro*, pero la cascara y la fracción obtenida de la almendra desgrasada que se consideran especialmente un desecho, mostraron el mejor efecto antifúngico estadísticamente diferente, por lo que este estudio indica que los extractos de residuos de mamey podrían ser una alternativa en el desarrollo de fungicidas de origen natural y podrían utilizarse en cultivo de productos orgánicos o como parte del manejo integrado de plagas de carácter fúngico.

5. Referencias

- Ahmed, R., Sani, A., and Igunnugbemi, O., (2009). Antifungal profiles of extracts of *Vitellaria paradoxa* (Shea-Butter) bark. *Ethnobotanical Leaflets* 13, pp. 679-88.
- Al Aboody, Mohammed S., and Suresh Mickymaray. (2020) Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids" *Antibiotics* 9(2), pp. 1-42.
- Carballeira, N. M. (2008). New advances in fatty acids as antimicrobial, antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research* 47(1), pp. 50-61.
- Baky, M. H., Kamal, A. M., Elgindi, M. R., & Haggag, E. G. (2016). A review on phenolic compounds from family Sapotaceae. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5(2), pp. 280-287.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., and Barrera Necha, L. L., (2000). Antifungal Screening of Plants of the State of Morelos, Mexico Against Four Fungal Postharvest Pathogens of Fruits and Vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(1), pp. 36- 41.
- Boleti, Ana Paula de A., Maria das Graças M. Freire, Mirela B. Coelho, Walciane da Silva, Paulo A. Baldasso, Valdirene M. Gomes, Sérgio Marangoni, José C. Novello, and Maria Lígia R. Macedo. (2007). Insecticidal and Antifungal Activity of a Protein from *Pouteria torta* Seeds with Lectin-like Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(7), pp. 2653-2658.
- Chandrasekaran, M., Senthilkumar, A., and Venkatesalu, V., (2011). Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 15(7), pp. 775-780.
- Ertürk, Ö., (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia* 61, pp. 275–278.
- Korsten, L., and Jager EE., (1995). Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. *SAAGA Yearbook* 18: pp. 124-130.
- Kuc, J., (1992). Antifungal compounds from plants. In: Nigg, H.N., Seigler, D. (Ed.), *Phytochemical resources for medicine and agriculture*, Springer, Boston, MA., pp. 159-184.
- Kuyu, C., (2015). Review on Potential Use of Fruit and Vegetables By-Products as A Valuable Source of Natural Food Additives. *IISTE-Food Science and Quality Management* 45., pp. 47-61.
- Lee, H. S., & Kim, Y. (2022). Myricetin Disturbs the Cell Wall Integrity and Increases the Membrane Permeability of *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 32, pp. 37-45.
- Mahlo, S. M., McGaw, L.J. and Eloff, J.N., (2010). Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens, *Crop Protection* 29(12), pp. 1529-1533.
- Moo-Huchin, V., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L. F. and Sauri-Duch, E., (2013). Chemical composition of crude oil from the seeds of pumpkin (*Cucurbita* spp.) and mamey sapota (*Pouteria sapota* Jacq.) grown in Yucatan, Mexico, *CyTA-Journal of Food* 11(4), pp 324-327.
- Nava-Cruz, Y., and Ricker, M., (2005). Mamey Zapote [*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn], A Mexican Forest Fruit of High Commercial Value. In: Alexiades, M. N., and Shanley, P. (Ed.), *Forest Products, Livelihoods and Conservation. Case Studies of Non-Timber Forest Product Systems*, SMK Grafika Desa Putera, Indonesia, Ch. 3, pp. 43-61.
- Pavón-Moreno, M. A., González-Alonso, I., Martín de Santos, S, R. and García Lacarra, T., (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27(6), pp. 1772-1781.
- Petriacq, P., López, A., and Luna, E., (2018). Fruit decay to diseases: Can Induced Resistance and Priming Help?. *Plants* 7(4), pp. 1-16.
- Solis-Fuentes, J. A., Ayala-Tirado, R. C., Fernández-Suárez, A. D., and Durán-de-Bazúa, M. C. (2015). Mamey sapote seed oil (*Pouteria sapota*). Potential, composition, fractionation and thermal behavior. *Grasas y aceites* 66(11), pp. 1 – 10.
- Souza-Moreira, T. M., Severi, J. A., Rodrigues, E. R., de Paula, M. I., Freitas, J. A., Vilegas, W., and Pietro, R. C., (2019). Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. *Natural product research* 33(17), pp. 2579-2582.
- Tapwal, A., Garg, S., Gautam, N., and Kumar, R. (2011). *In vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian archives of biology and technology* 54(6), pp. 1093-1098.
- Torres-Rodríguez, A., Salinas-Moreno, Y., Valle-Guadarrama, S., and Alia-Tejagal, I. (2011). Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest. *Food Research International* 44(7), pp. 1956-1961.
- Trigos, A., Ramírez, K., and Salinas, A., (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología* 28., pp.125-129.
- Yahia, E., and Gutierrez-Orozco, F., (2011). Mamey sapote (*Pouteria sapota* Jacq. H. E. Moore & Stearn). In: Elhadi M. Yahia (Ed.), *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. Volume 3. Cocona to mango. Woodhead Publishing, England, Ch. 21, pp. 482-491.
- Yamaji, B. K. and Ichihara Y., (2012). The role of catechin and epicatechin in chemical defense against damping-off fungi of current-year *Fagus crenata* seedlings in natural forest. *Forest Pathology* 42, pp. 1-7.