

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TEMA

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
EXTRACTOS PUROS DE *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* Y SUS
MEZCLAS CONTRA *Rhizopus stolonifer* Y *Aspergillus niger*

AUTOR

FRANKLIN GABRIEL SÁNCHEZ SILVA

DIRECTORA

DRA. LAURA SCALVENZI FOGLIA

PASTAZA - ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Franklin Gabriel Sánchez Silva, con cédula de identidad 180536224-9, declaro que las actividades realizadas para la realización y culminación del presente proyecto de investigación, que tiene como tema “**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS PUROS DE *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* Y SUS MEZCLAS CONTRA *Rhizopus stolonifer* Y *Aspergillus niger***”, se basaron en la búsqueda de información, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, que me guiaron para estructurar mi trabajo y sea considerado para posibles investigaciones futuras, basándose en los resultados obtenidos; además que me responsabilizo en forma legal y académicamente como el autor del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniero Agroindustrial.

Franklin Gabriel Sánchez Silva

CI. 180536224-9

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente, Laura Scalvenzi Foglia con C.I.175277758-9 y Luis Ramón Bravo Sánchez con C.I. 175704145-2 certificamos que Franklin Gabriel Sánchez Silva egresado de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Estatal Amazónica, desarrolló el presente trabajo de investigación titulado “**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS PUROS DE *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* Y SUS MEZCLAS CONTRA *Rhizopus stolonifer* Y *Aspergillus niger***” previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial bajo nuestra supervisión.

Dra. Laura Scalvenzi Foglia
DIRECTORA DEL PROYECTO

INFORME DEL DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título: “EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS PUROS DE *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* Y SUS MEZCLAS CONTRA *Rhizopus stolonifer* Y *Aspergillus niger*”

Autor (a): Franklin Gabriel Sánchez Silva

Unidad de Titulación: Carrera Ingeniería Agroindustrial

Director del proyecto: Dra. Laura Scalvenzi Foglia

Fecha: 24 de junio del 2019

Introducción y contexto de la investigación:

El consumo de frutas y hortalizas en el mundo es alto, y la calidad de estos productos se ve seriamente afectada por el ataque de diferentes especies de hongos, especialmente en la etapa de post-cosecha. Con el fin de reducir las pérdidas de productos agrícolas provocadas por el ataque de hongos, y prolongar su vida útil se aplican tratamientos físicos y químicos.

En la actualidad la manera más común de combatir a los hongos que destruyen los productos agrícolas es mediante el uso de fungicidas sintéticos, sin embargo, la utilización indiscriminada de estos da como resultados microorganismos cada vez más resistentes y también contaminación del medio ambiente (Rodríguez, Ramírez, Bautista, & Cruz, 2012).

Los fitopatógenos pueden llegar a desarrollar resistencia a los fungicidas de síntesis, para lo cual, en algunos casos es necesario utilizar otros agroquímicos, debido a que los principios activos de estos fungicidas ya no tienen efecto sobre las diferentes especies de hongos (Ochoa, Cerna, Landeros, Hernández, & Delgado, 2012).

Para dar respuesta a estos problemas, en los últimos años se han desarrollado muchos estudios sobre extractos de plantas como agentes de control biológico de fitopatógenos.

Considerando los aspectos antes mencionados, con esta investigación se pretende buscar una alternativa ecológica al uso de fungicidas de síntesis con la combinación de dos extractos hidroalcohólicos de las plantas *Psidium guajava* y *Maytenus laevis*, sobre los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*, que afectan los productos agrícolas en la fase de post-cosecha (Velázquez, Bautista, Hernández, Guerra, & Amora, 2008).

Cumplimiento de objetivos

Los objetivos propuestos en la investigación se cumplieron satisfactoriamente. El objetivo general planteado fue evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos puros de *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* y sus mezclas, contra los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*. Además, el propósito era aplicar la extracción asistida por ultrasonidos para la obtención de extractos hidroalcohólicos de las dos plantas, así como evaluar la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos frente a los hongos *R. stolonifer* y *A. niger*, mediante ensayos *in vitro*.

Principales resultados obtenidos

La extracción asistida por ultrasonidos resultó eficaz para la obtención de extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales *P. guajava* y *M. laevis*, pues se obtuvo un rendimiento de 13,33% y 64,56% respectivamente. El extracto testigo de *N. tabacum* reportó un rendimiento de 34,38%, bajo la misma técnica de extracción.

Los extractos hidroalcohólicos de *P. guajava* y *M. laevis*, no resultaron eficaces para el control de *R. stolonifer* en ningún tratamiento estudiado, ya sea en extracto puro de cada especie vegetal o las mezclas de estos, incluyendo al extracto testigo (*N. tabacum*).

La actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos se registró frente a *A. niger*. Las mezclas de extractos dieron mejores resultados que los extractos puros, especialmente la mezcla GC3 a la

concentración de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$; las mezclas GC1 y GC2 mostraron mayor control a las concentraciones de 1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$. El extracto testigo (*N. tabacum*) mostró un significativo control sobre el hongo en las diferentes concentraciones.

El estudiante Franklin Gabriel Sánchez Silva mostró durante el desarrollo del proyecto de investigación un alto compromiso personal y científico, así como una elevada independencia en el trabajo de laboratorio. Además, se destaca por su rendimiento académico, y por la atención en el respeto de los tiempos. De esta manera ha cumplido con las 400 horas establecidas en el Reglamento de Régimen Académico de la UEA.

La presentación final del trabajo cumple con las normas establecidas en la reglamentación institucional.

La redacción, ortografía, calidad de los gráficos, tablas y anexos es adecuada.

Sin otro particular.

Atentamente,

Laura Scalvenzi Foglia

CI. 175277758-9

AVAL

Quien suscribe Dra. Laura Scalvenzi Foglia, Docente de la Universidad Estatal Amazónica avala el Proyecto de investigación:

Título: “EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS PUROS DE *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* Y SUS MEZCLAS CONTRA *Rhizopus stolonifer* Y *Aspergillus niger*”

Autor: Franklin Gabriel Sánchez Silva

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Investigación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución.

Por lo antes expuesto se avala el Proyecto de investigación para que sea presentado ante la Coordinación de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial como forma de titulación como Ingeniero Agroindustrial, y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que así conste, firmo la presente a los 29 días del mes de marzo del 2019.

Atentamente,

Dra. Laura Scalvenzi Foglia
C.I 175277758-9

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El Tribunal de sustentación del Proyecto de Investigación aprueba el proyecto de investigación
**“EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS
PUROS DE *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* Y SUS MEZCLAS CONTRA *Rhizopus
stolonifer* Y *Aspergillus niger*”**.

Dra. C. Karina Carrera Sánchez PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MSc. Franklin Villafuerte Carrillo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MSc. Bélgica Yaguache Camacho

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por bendecirme con la vida, agradezco también a la Universidad Estatal Amazónica por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico, así como también a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Laura Scalvenzi, Directora del proyecto, quien con mucha paciencia me ha brindado apoyo incondicional en la elaboración del Trabajo. Así también al Dr. Luis Bravo, Co-director del proyecto, quien siempre estuvo pendiente asesorándome y guiándome en el desarrollo del proyecto.

Y para finalizar agradezco a todos los que fueron mis compañeros y amigos durante toda mi etapa universitaria, y una mención especial para Alejandra quien siempre estuvo para mi apoyándome de una u otra manera.

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a mis padres Miguel y Julia quienes con su amor, paciencia y sacrificio me han permitido llegar a cumplir una meta más en la vida.

A mis hermanos, Diana, Lucía, Jairo y Ricardo quienes siempre estuvieron ayudándome en todo y confiaron en mí.

RESUMEN

La búsqueda de alternativas ecológicas para el control de hongos fitopatógenos que pueden atacar frutas y hortalizas, principalmente en la etapa de post-cosecha, últimamente ha tenido un importante auge. En esta investigación se evaluó el efecto antifúngico de los extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales *Psidium guajava* (guayaba) y *Maytenus laevis* (chuchuguazo), con rendimientos de extracción correspondientes a 13,33% y 64,56% respectivamente. Las plantas objeto de estudio son conocidas por la presencia de taninos y flavonoides, a los cuales se atribuyen propiedades antifúngicas. Los extractos hidroalcohólicos de *P. guajava* y *M. laevis* fueron probados para evaluar *in vitro* su control frente a los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*. Se evaluó la actividad antifúngica de los extractos puros y de sus mezclas en tres diferentes proporciones y concentraciones; la primera mezcla (GC1) estuvo compuesta de 50% *P. guajava* y 50% *M. laevis*, la segunda mezcla (GC2) constó de 30% *P. guajava* y 70 % *M. laevis*, y la última mezcla (GC3) tenía una proporción inversa a la mezcla dos. Todos los tratamientos se estudiaron a las siguientes concentraciones: 0,5; 1,5 y 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La mezcla GC3, a la concentración de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, fue la que dio mejores resultados en el control de *A. niger*, mientras para *R. stolonifer* ningún tratamiento mostró actividad antifúngica en el intervalo de concentraciones evaluado.

PALABRAS CLAVES

Guayaba, chuchuguazo, control biológico, patógenos vegetales, hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

The search for ecological alternatives to control phytopathogens that can attack fruits and vegetables in the post-harvest stage is gaining momentum. In this research, the antifungal effect of hydroalcoholic extracts from the plant species *Psidium guajava* (guayaba) and *Maytenus laevis* (chuchuguazo) was evaluated. Extraction yields were 13.33% and 64.56% respectively. The studied plants are known for their content on tannins and flavonoids, that are responsible of the antifungal properties. The hydroalcoholic extracts of *P. guajava* and *M. laevis* were tested to evaluate *in vitro* their control against the phytopathogenic fungi *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. The antifungal activity of pure extracts and their mixtures in different proportions and contents was investigated. The first mixture (GC1) was composed by 50% of *P. guajava* and 50% of *M. laevis*, the second mixture (GC2) consisted of 30% of *P. guajava* and 70% of *M. laevis*, and the last mix (GC3) had an inverse proportion of mixture two. Extracts and their mixtures were studied at the following concentration: 0.5, 1.5 and 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The mixture GC3, at the concentration of 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, showed antifungal activity against *A. niger*, whereas no control results were shown against *R. stolonifer*.

KEYWORDS

Guayaba, chuchuguazo, biological control, plant pathogens, phytopathogen fungi

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3 OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS	2
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
CAPÍTULO II.....	3
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1 PÉRDIDAS DE PRODUCTOS AGRICOLAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS EN POST-COSECHA	3
2.1.1 <i>Rhizopus stolonifer</i>	4
2.1.2 <i>Aspergillus niger</i>	5
2.2 CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS	6
2.3 CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE <i>P. guajava</i>	7
2.4 CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE <i>M. laevis</i>	8
CAPÍTULO III.....	9
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	9
3.1 LOCALIZACIÓN	9
3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN	9
3.3 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	9
3.3.1 RECURSOS Y MATERIALES	9
3.3.1.1 EQUIPOS	9
3.3.1.2 UTENSILLOS Y MATERIALES.....	9
3.3.1.3 REACTIVOS Y DISOLVENTES.....	10
3.3.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	10
3.3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS	10
3.3.3.1 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS	11
3.3.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES	12
3.3.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	13
CAPÍTULO IV.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS	14
4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES	14
CAPÍTULO V.....	25
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
5.1 CONCLUSIONES.....	25
5.2 RECOMENDACIONES	25

CAPÍTULO VI.....	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Clasificación taxonómica del hongo <i>R. stolonifer</i>	4
Tabla 2 - Clasificación taxonómica del hongo <i>A. niger</i>	5
Tabla 3 - Clasificación taxonómica de <i>P. guajava</i>	7
Tabla 4 - Clasificación taxonómica de <i>M. laevis</i>	8
Tabla 5 - Tratamientos en función a la proporción de los extractos de <i>P. guajava</i> y <i>M. laevis</i>	12
Tabla 6 - Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos mediante la extracción asistida por ultrasonidos	14
Tabla 7 - Análisis de varianza de diámetros de crecimiento del hongo <i>A. niger</i>	15
Tabla 8 - Análisis Tukey de un factor de la interacción entre tipo de extracto (A) y la concentración (B).	16
Tabla 9 - Diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de <i>A. niger</i> tratado con diferentes extractos a distintas concentraciones durante los 7 días de crecimiento.	18
Tabla 10 - Diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de <i>R. stolonifer</i> tratado con diferentes extractos a distintas concentraciones durante los 7 días de crecimiento.	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipo Baño de Ultrasonido	11
Figura 2 - Equipo Rotaevaporador	11
Figura 3 - Esquema de concentraciones y repeticiones por cada tratamiento	13
Figura 4 - Desarrollo de <i>R. stolonifer</i> tratado con extracto puro de <i>M. laevis</i> (A) y con el extracto testigo (B), al séptimo día del experimento en medio de cultivo PDA.	15
Figura 5 - Análisis de varianza de diámetros de crecimiento del hongo <i>A. niger</i>	16
Figura 6 - Efectos estandarizados positivos de la concentración de los extractos sobre el diámetro medio de los hongos	17
Figura 7 - Colonias de <i>A. niger</i> tratadas con la mezcla de extractos GC3 y control negativo (PDA), al tercer día del experimento.	20
Figura 8 - Gráfico de líneas de los diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de <i>A. niger</i> por tipo de extracto [G ; C ; GC1 (50%-50%); GC2 (30%G-70%C); GC3 (70%G-30%C); T] y concentración (B1 : 0,5 µL/mL; B2 : 1,5 µL/mL; B3 : 3µL/mL).	21
Figura 9 - Gráfico de barras de los diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de <i>A. niger</i> por tipo de extracto [G ; C ; GC1 (50%-50%); GC2 (30%G-70%C); GC3 (70%G-30%C); T] y concentración (B1 : 0,5 µL/mL; B2 : 1,5 µL/mL; B3 : 3µL/mL). Valores estadísticamente significativos están representados con las letras a, b, c y d.	22
Figura 10 - Crecimiento de las colonias fúngicas de <i>A. niger</i> frente a las mezclas de extractos GC1, GC2, GC3 a la concentración de 0,5 µL/mL y frente al testigo (<i>N. tabacum</i>).....	23
Figura 11 - Crecimiento de las colonias fúngicas de <i>A. niger</i> frente a las mezclas de extractos GC1, GC2, GC3 a la concentración de 1,5 µL/mL y frente al testigo (<i>N. tabacum</i>).....	23
Figura 12 - Crecimiento de las colonias fúngicas de <i>A. niger</i> frente a las mezclas de extractos GC1, GC2, GC3 a la concentración de 3 µL/mL y frente al testigo (<i>N. tabacum</i>).....	24

CAPÍTULO I.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN

El consumo de frutas y hortalizas en el mundo es alto, y la calidad de estos productos se ve seriamente afectada por el ataque de diferentes especies de hongos, especialmente en la etapa de post-cosecha. Esto implica que se limite el tiempo de vida comercial de los productos, dejando así cuantiosas pérdidas económicas tanto en productores como en comerciantes (Guamán, 2017). Así, por ejemplo, dentro del país la naranjilla (*Solanum quitoense*) es severamente perjudicada por varias especies de hongos en las cuales destacan: *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizopus*, este último responsable de la denominada “pudrición blanda” (Andrade, Moreno, Concellón, & Chicaiza, 2013).

Con el fin de reducir las pérdidas de frutas y verduras en la etapa de post-cosecha, provocadas por el ataque de hongos, y prolongar su vida útil se aplican tratamientos físicos y químicos. Dentro de los tratamientos físicos se han desarrollado tratamientos por medio de la Radiación UV-C (Andrade, Moreno, Concellón, & Chicaiza, 2013), mientras que dentro de los tratamientos químicos se ha probado diferentes tipos de extractos vegetales, tanto puros como mezclas, y también se ha ensayado con aceites esenciales (Hernández, Bautista, & Velázquez del Valle, 2007).

En la actualidad la manera más común de combatir a los hongos que destruyen los productos agrícolas es mediante el uso de fungicidas sintéticos, sin embargo, la utilización indiscriminada de estos productos da como resultados microorganismos cada vez más resistentes y también contaminación del medio ambiente (Rodríguez, Ramírez, Bautista, & Cruz, 2012).

Los fitopatógenos pueden llegar a desarrollar resistencia a los fungicidas de síntesis, para lo cual, en algunos casos es necesario utilizar otros agroquímicos, debido a que los principios activos de estos fungicidas ya no tienen efecto sobre las diferentes especies de hongos (Ochoa, Cerna, Landeros, Hernández, & Delgado, 2012).

Para dar respuesta a estos problemas, en los últimos años se han desarrollado muchos estudios sobre extractos de plantas como agentes de control biológico de fitopatógenos. Por ejemplo se ha descrito la bioactividad de extractos hidroalcohólicos de las *Psidium guajava* L. (guayaba) y *Maytenus laevis* Reissek (chuchuguazo) que contienen taninos y flavonoides los cuales posiblemente se atribuyen las propiedades antifúngicas (Davicino, Mattar, Casali, & Correa, 2007). Además de estudios sobre los extractos puros, en años recientes se han empleado mezclas de extractos para optimizar propiedades bioactivas mostrando resultados alentadores (Pulido & Salazar, 2008).

Considerando los aspectos antes mencionados se pretende buscar una alternativa ecológica al uso de fungicidas de síntesis con la combinación de dos extractos hidroalcohólicos de las plantas *P. guajava* y *M. laevis*, sobre los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. y *Aspergillus niger* Tiegh, que afectan los productos agrícolas en la fase de post-cosecha (Velázquez, Bautista, Hernández, Guerra, & Amora, 2008).

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cómo incide la actividad antifúngica de los extractos de las plantas *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* en el control de los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*?

1.3 OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos puros de *Psidium guajava* y *Maytenus laevis* y sus mezclas contra *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar la extracción asistida por ultrasonidos para la obtención de extractos hidroalcohólicos de las plantas *P. guajava* y *M. laevis*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos frente a los hongos *R. stolonifer* y *A. niger*, mediante ensayos *in vitro*.

CAPÍTULO II.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PÉRDIDAS DE PRODUCTOS AGRICOLAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS EN POST-COSECHA

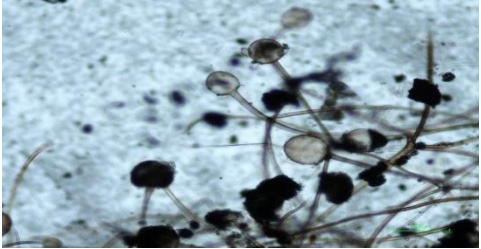
Las frutas y hortalizas son muy propensos al ataque de microorganismos patógenos principalmente en la etapa de post-cosecha, lo que genera grandes pérdidas económicas. Adicionalmente, algunos de estos microorganismos, como los hongos, tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios como por ejemplo las micotoxinas que son muy perjudiciales para la salud humana. Se estima que aproximadamente el 25% de las cosechas globales de productos alimenticios está contaminado con micotoxinas, lo cual representa un problema de salud pública muy grande. Por lo tanto, los ataques de microorganismos patógenos, y especialmente de hongos, en la post-cosecha tienen una dúplice afectación en el producto final: la pérdida del producto tal cual y/o la producción de micotoxinas. De acuerdo a un estudio realizado en México sobre 28 muestras de frutas y hortalizas, durante el periodo de un año, se pudo detectar la presencia de 27 géneros distintos de hongos fitopatógenos entre los cuales *Alternaria*, *Botrytis*, *Rhizopus* y *Aspergillus*. Todos ellos se conocen por ser agentes que causan alteraciones en el aspecto físico, nutricional y organoléptico de frutas y hortalizas, comprometiendo su consumo y venta (Trigos, Ramírez, & Salinas, 2008).

Las enfermedades que se dan en la post-cosecha muchas veces inician durante la formación vegetativa en la planta misma, y también se pueden dar después de la cosecha durante la maduración fisiológica. Especialmente en esta etapa, los frutos padecen unos procesos metabólicos celulares que son parte integrante de la maduración. Entre estos se menciona el aumento del agua libre y de los azúcares solubles, así como de la disminución de compuestos fenólicos que vuelven los frutos muy sensibles al daño mecánico y también al ataque de bacterias y hongos. Estos últimos son una de las mayores causas de pérdida del producto porque faltan controles fitosanitarios en la fase de cultivo en campo y también en la etapa de almacenamiento. Considerados estos antecedentes, es de gran importancia actuar medidas de control que reduzcan los daños ocasionados. Entre estas hay la aplicación de fungicidas tanto en el cultivo como en la fase de post-cosecha (Trigos et al., 2008).

2.1.1 *Rhizopus stolonifer*

R. stolonifer es un hongo fitopatógenos causante de la pudrición blanda tanto en frutas como en hortalizas, normalmente se lo encuentra habitando en el suelo de manera saprofita cuyo potencial es invadir los tejidos vegetales (Velázquez et al., 2008).

Tabla 1 - Clasificación taxonómica del hongo *R. stolonifer*

Reino	Fungi	
Clase	Ascomycota	
Orden	Mucorales	
Familia	Rhizopodaceae	
Género	<i>Rhizopus</i>	
Especie	<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	

Fuente: Naturalista, 2018

Las pudriciones ocasionadas por este hongo afectan la calidad de los productos agrícolas, lo que ocasiona que se reduzca el valor comercial de éstos. Además, el ataque del hongo ocasiona que se genere micotoxinas y metabolitos secundarios que influyen de manera negativa en la salud tanto de personas como en animales (Guédez, Cañizalez, Avendaño, & Scorza, 2014).

R. stolonifer se puede desarrollar en un rango de temperaturas que van desde los 10 hasta los 33 °C, y puede sobrevivir a humedades relativas muy variables. Se ha encontrado que se logra detener su crecimiento cuando se encuentra a una temperatura menor de 5 °C. Puede desarrollarse rápidamente sobre trozos de fruta o cualquier tipo de material orgánico, gracias a su micelio aéreo. Puede reproducirse tanto de manera sexual como asexual, e incluso puede sobrevivir a la carencia de agua (Tenorio, Olalde, Mena, Ceja, & Venegas, 2012).

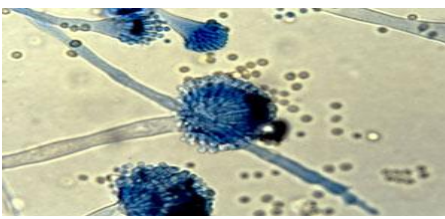
Este hongo presenta un crecimiento acelerado y una rápida transmisión por medio de las magulladuras o daños físicos en las frutas y verduras, causados muchas veces por una mala manipulación de estos productos en la fase de cosecha. Uno de los productos que se ven severamente afectados por *R. stolonifer* es el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), que representa uno de los productos más importantes dentro de la economía de varios países de América Latina. La manera más efectiva hasta hoy de combatirlo es la aplicación de fungicidas de síntesis que, muchas veces, generan residuos tóxicos para el ambiente y para los seres humanos (Alvarado, Barrera, Hernández, & Velázquez, 2011).

Los productos hortofrutícolas maduros y dañados son más propensos a ser infectados por *R. stolonifer*, puesto que se ha evidenciado una mayor concentración de esporas en los productos que presentan dichas características (Velázquez et al., 2008).

2.1.2 *Aspergillus niger*

Los hongos del genero *Aspergillus* son los principales causantes del deterioro de muchos alimentos y los compuestos metabólicos que estos producen son muy perjudiciales para la salud tanto de personas como de animales (Carrillo, 2003).

Tabla 2 - Clasificación taxonómica del hongo *A. niger*

Reino	Fungi	
Clase	Ascomycota	
Orden	Eurotiales	
Familia	Trichocomaceae	
Género	<i>Aspergillus</i>	
Especie	<i>A. niger</i> Tiegh	

Fuente: Naturalista, 2018

Cuando *A. niger* ataca a las semillas, impide su germinación, además de que ocasiona cambios físicos y químicos como el cambio de coloración y también la pudrición del producto (Carrillo, 2003).

Por otro lado, este hongo de carácter fitopatógeno es muy utilizado por la industria farmacéutica y de alimentos, ya que se lo aprovecha para obtener enzimas, ácidos orgánicos y especialmente ácido cítrico (Reyes, González, & López, 2013).

Este microorganismo es ampliamente utilizado de manera industrial, ya que se lo usa como biodegradador de los desechos que las industrias producen, y a partir de esto se elaboran productos comestibles y no comestibles (Gil, 2019).

Este hongo se encuentra en frutas y hortalizas, especialmente en la etapa de post-cosecha, es capaz de producir micotoxinas muy peligrosas para la salud de los consumidores ya que puede provocar intoxicaciones y enfermedades hepáticas y carcinógenas (Guédez, Cañizález, Castillo, & Olivar, 2009).

La versatilidad de este hongo es muy notoria ya que se lo puede encontrar habitando desde productos alimenticios enlatados, semillas, frutas y vegetales en almacenamiento e inclusive se lo ha detectado en cuartos de hospital (Rodríguez, 2016).

2.2 CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Diferentes extractos vegetales poseen propiedades antifúngicas, y se ha logrado evidenciar una inhibición en diferentes especies de hongos, especialmente en aquellos que se desarrollan en frutas y hortalizas en fase de post-cosecha. Actualmente se busca reemplazar los fungicidas de síntesis con otros de origen natural, ya que no solo contaminan el ambiente sino también tienen altos costos de adquisición. Por esta razón los extractos vegetales se están convirtiendo en una fuente natural y menos costosa de combatir los agentes causales de enfermedades fúngicas (Rodríguez, Morales, & Ramírez, 2000).

Como ventaja competitiva de los extractos vegetales frente a los productos agroquímicos sintéticos, está su fácil degradación, sus escasos residuos en el medio ambiente, lo cual mejoraría la salud general de los consumidores, y a la vez la posibilidad de abrir nuevos mercados mediante la venta directa a los consumidores (Guerrero, 2007).

En el Ecuador se tiene un sinnúmero de especies vegetales que comúnmente se utilizan para tratar enfermedades en las personas; sin embargo, estas especies no son aprovechadas para prevenir o controlar la proliferación de hongos u otros agentes fitopatógenos (Barrera & Bautista, 2008).

Dentro de la gama de especies botánicas con interés de aprovechamiento como fungicidas se encuentran *M. laevis* (chuchuguazo) y *P. guajava* (guayaba). De esta última se han obtenido extractos que han mostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani & Chalmers, 1919, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884 y *Candida albicans* (Robin) Berkhout (Martínez, Molina, & Boucourt, 1997).

Los extractos vegetales están compuestos por mezclas complejas de metabolitos secundarios, que se pueden obtener mediante diversos métodos. Los principales componentes que presentan estos extractos incluyen carbohidratos, alcoholes, éteres, cetonas, entre otros, que pueden actuar como biocidas ante algunos microorganismos (García, Martínez, Ortega, & Castro, 2010).

2.3 CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE *P. guajava*

El género *Psidium* tiene su origen en América tropical y se sabe que abarca más de un centenar de especies, de las cuales destaca *P. guajava* por su gran valor comercial. Para su desarrollo se necesita de algunos factores fundamentales como: temperatura, humedad, luz y sustrato. Así, la temperatura óptima para su desarrollo oscila entre los 23 y 30 °C, el rango de humedad relativa puede variar entre un 37 y 96%, en cuanto a la luz se necesita de una radiación solar directa y como sustrato se requiere de un suelo húmedo con un pH entre 6 y 7 (García, 2010).

Tabla 3 - Clasificación taxonómica de *P. guajava*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Género	<i>Psidium</i>
Especie	<i>P. guajava</i>



Fuente: (García, 2010)

P. guajava, de nombre común guayaba, pertenece a la familia de las Myrtaceae, y sus hojas, se usan comúnmente para preparar infusiones para tratar la disentería y los cólicos abdominales. Contiene diversos componentes, como la vitamina C que se encuentra principalmente en el fruto, en sus hojas se encuentran diversos flavonoides como quercetina, aviculatina y guaijaverina, los mismos que contribuyen a la actividad antimicrobiana del extracto de la planta (Martínez, López, Bentancourt, & Pérez, 2001).


La guayaba se produce a nivel mundial y su producción anual es aproximadamente de 1.2 millones de toneladas. Entre los principales países productores se encuentran la India y Pakistán con un 50% de la producción, seguidos por México con un 25% y países como Brasil, Colombia y Egipto complementan la producción mundial. La guayaba puede tener múltiples usos, especialmente en el ámbito industrial, ya que de su fruto se puede obtener pulpa, néctar, jalea, mermelada, de hecho, en la actualidad presenta cierta demanda en la industria alimentaria para bebés. En términos económicos y nutricionales la guayaba es un fruto muy importante, por lo que se analizan acciones de prolongar la vida útil de este producto. Al ser un fruto muy

percedero, su manipulación debe ser realizada con mucha atención, ya que esta puede ocasionar severos daños físicos (Yam, Villaseñor, & Soto, 2010).

2.4 CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE *M. laevis*

De acuerdo con Salazar (2013) *M. laevis* es conocida vulgarmente con el nombre de chuchuguazo y es una planta arbórea localizada en la región Amazónica de Colombia, Ecuador y Perú, habita en suelos no inundables (suelos de altura). Se caracteriza por presentar una altura que oscila entre los 12 y 25 metros, su corteza presenta una coloración rojiza, en su parte superior es muy ramificada y su tronco posee un diámetro promedio de 60 cm.

Tabla 4 - Clasificación taxonómica de *M. laevis*

Reino	Plantae	
División	Magnoliophyta	
Clase	Magnoliopsida	
Orden	Celastrales	
Familia	Celastraceae	
Género	<i>Maytenus</i>	
Especie	<i>M. laevis</i>	

Fuente: (Lombardi, Groppo, & Biral, 2015)

La planta se caracteriza por tener compuestos químicos de distintos tipos como alcaloides, ácidos fijos, auronas, catequinas, chalconas, cumarinas, fenoles simples, flavonoides, quinonas, saponinas y triterpenos (Siccha, 2018). Es utilizada tradicionalmente por las nacionalidades amazónicas del Ecuador, para la curación de ciertas enfermedades humanas. Las partes más utilizadas de *M. laevis* son las hojas y la corteza. Las hojas se utilizan principalmente para tratar erupciones cutáneas y para aliviar el dolor estomacal. La corteza se emplea para tratar el reumatismo y la artritis, además de que sirve como reconstituyente (Salazar, 2013).

Se ha demostrado que varias especies de *Maytenus* pueden presentar actividad anticonceptiva, antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante. Además, se ha constatado que este género presenta ciertos compuestos activos, como los maitansinoides, que ejercen actividad insecticida y dímeros triterpénicos con actividad antimicrobiana (Acosta, Vásquez, Núñez, Pinto, & Shiga, 2013). Considerando estas propiedades y especialmente las antimicrobianas, los extractos de plantas de este género podrían ser investigados como productos para el control de hongos fitopatógenos.

CAPÍTULO III.

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Química, Biología y Bromatología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en el kilómetro 2 ½ de la vía Puyo - Tena (Paso Lateral) de la ciudad de Puyo, Pastaza, Ecuador.

3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente proyecto ha sido de investigación aplicada, fundamentada en la experimentación.

3.3 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

Se emplearon métodos cuantitativos que permitieron controlar las variables dependientes que estuvieron presentes por el rendimiento de extracción y el diámetro de las colonias fúngicas. Se realizaron cálculos numéricos y análisis estadísticos de varianza para establecer modelos de comportamiento.

3.3.1 RECURSOS Y MATERIALES

3.3.1.1 EQUIPOS

- Balanza analítica ADAM. Alemania
- Balanza técnica THOMAS Scientific. TSXB4200C. Estados Unidos
- Baño ultrasónico. BRANSON. Estados Unidos.
- Autoclave. Shanan. China
- Plancha de calentamiento. Boeco. Alemania
- Estufa. Barnstead. Estados Unidos.
- Bomba de vacío. GE Motors & Industrial System. Estados Unidos.
- Evaporador rotatorio. Büchi. Alemania

3.3.1.2 UTENSILLOS Y MATERIALES

- Micropipeta Eppendorf Research Plus 100 – 1000 µL. Alemania
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 10 – 100 µL. Alemania
- Viales de plástico. Eppendorf 1 mL
- Espátulas de laboratorio

- Cristalería común de laboratorio, incluido material volumétrico
- Cajas de Petri de vidrio 9 x 1 cm

3.3.1.3 REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Agua destilada
- Etanol, MERCK. Alemania
- Medio de cultivo PDA, Difco™, Francia.

3.3.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para la obtención de los extractos hidroalcohólicos objeto de estudio, se emplearon las especies vegetales *P. guajava* y *M. laevis* en forma pulverulenta, ya que se encontraban disponibles en el laboratorio de Química de la UEA, debido a que fueron utilizadas en investigaciones previas. De *P. guajava* se utilizaron las hojas mientras que de *M. laevis* la corteza del tallo.

3.3.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

A partir de los sólidos pulverulentos de las plantas *P. guajava* y *M. laevis*, se pesaron 50 g de cada especie y posteriormente se elaboraron los extractos hidroalcohólicos (80% alcohol - 20% agua) en una relación “sólido - líquido” de 1:10.

Se empleó la extracción asistida por ultrasonidos debido a su mayor eficacia y menor tiempo de operación, a temperatura ambiente por un tiempo de 30 minutos y potencia máxima del equipo (Figura 1). Posteriormente se evaporó el disolvente mediante un rotaevaporador (Figura 2), que trabajó bajo los siguientes parámetros: presión 50 – 60 cm/Hg, temperatura de evaporación del etanol (70 °C) y tiempo de aproximadamente una hora (Moya, 2018).

La extracción asistida por ultrasonido se caracteriza por emplear sonidos de alta frecuencia, con el propósito de desprender el compuesto deseado del material vegetal. Como resultado de la acción ultrasónica las partículas sólidas y líquidas vibran, provocando que el soluto pase rápidamente de la fase sólida al disolvente. Se ha descrito que este método es el menos costoso en comparación con las demás tecnologías de extracción (Azuola & Vargas, 2007). La variable dependiente considerada fue el rendimiento de los extractos.



Figura 1 - Equipo Baño de Ultrasonido



Figura 2 - Equipo Rotaevaporador

3.3.3.1 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

Se determinó el rendimiento de cada uno de los extractos, el resultado se expresó en porcentaje basado en la fórmula del rendimiento.

$$\%R = \frac{MPI}{EO} \times 100\% \quad (1)$$

Dónde:

MPI= Material pulverulento inicial en g

EO= Extracto obtenido en g

3.3.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

La actividad antifúngica de los extractos se evaluó mediante el método de la difusión en agar, que consiste en adicionar los extractos al medio de cultivo PDA, de acuerdo a los distintos tratamientos establecidos, y posteriormente inocular los hongos en dicho medio. Se estudiaron tanto los extractos puros de *P. guajava* y *M. laevis*, así como sus mezclas, en diferentes proporciones, con el objetivo de evaluar eventuales efectos benéficos de la mezcla (Tabla 5).

La técnica de la difusión en agar es ampliamente difundida, ya que permite distinguir entre una cepa sensible o resistente al compuesto químico que se desea estudiar. Esta virtud ha sido reconocida por varios autores. Esta técnica se caracteriza por ser cualitativa y está diseñada para trabajar con microorganismos de crecimiento rápido (Balleste, 2006).

La actividad antifúngica se evaluó sobre los hongos fitopatógenos *R. stolonifer* y *A. niger*, presentes en la cepoteca de la UEA.

Tabla 5 - Tratamientos en función a la proporción de los extractos de *P. guajava* y *M. laevis*

PLANTAS	SIGLAS	PROPORCIÓN (%)
<i>P. guajava</i> (guayaba)	G	100
<i>M. laevis</i> (chuchuguazo)	C	100
<i>P. guajava</i> y <i>M. laevis</i>	GC1	50 - 50
<i>P. guajava</i> y <i>M. laevis</i>	GC2	30 - 70
<i>P. guajava</i> y <i>M. laevis</i>	GC3	70 - 30

Fuente: Elaboración propia

Se realizaron cinco repeticiones por cada tratamiento y, se utilizó como testigo el extracto de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) conocido por sus propiedades de control biológico. Los derivados de *N. tabacum* poseen actividad antifúngica, insecticida, acaricida y repelente, propiedades atribuidas por su principal componente que es la nicotina; este metabolito es capaz de actuar como sustancia tóxica por contacto o ingestión (Cruz, Rodríguez, & Ortíz, 2011).

Adicionalmente se contempló un control negativo a base de PDA sin extractos. Se consideraron tres diferentes concentraciones de extracto, tanto puro como en mezcla: 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Figura 3).

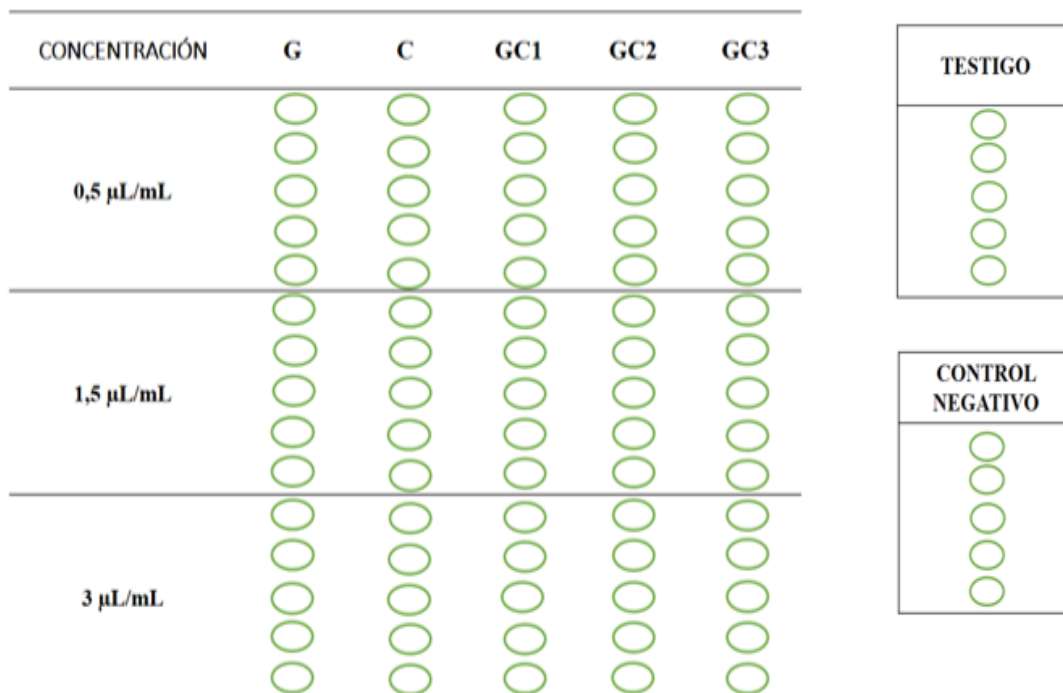


Figura 3 - Esquema de concentraciones y repeticiones por cada tratamiento

3.3.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para cada uno de los extractos puros o mezclas individuales, se realizó el análisis de varianza simple para determinar cuál fue el mejor tratamiento; posteriormente se aplicó la prueba de Tukey a todo el conjunto de datos, con vistas a seleccionar el extracto puro o la mezcla idónea para el control de los hongos *R. stolonifer* y *A. niger*. Se utilizó el programa estadístico Design-Expert versión 10.

CAPÍTULO IV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

Se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos de *P. guajava*, *M. laevis* y *N. tabacum*, mediante la extracción asistida por ultrasonido. De los extractos antes mencionados se realizó el cálculo del rendimiento, mismo que se reporta en la Tabla 6. Para *P. guajava* se observó un rendimiento de 13,33% parecido al de 10,7% obtenido por Martínez (1997). En el caso de *M. laevis* fue de 64,56%. El rendimiento del extracto testigo de *N. tabacum* fue de 34,38% que fue superior el rendimiento de 19,55% obtenido por (Puripattanavong, Songkram, Lomlim, & Amnuait, 2013).

Tabla 6 - Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos mediante la extracción asistida por ultrasonidos

PLANTAS	CANTIDAD		RENDIMIENTO (%)
	DROGA:SOLVENTE (1:10) (g)	EXTRACTO OBTENIDO (g)	
<i>P. guajava</i>	50:500	6,67	13,33
<i>M. laevis</i>	50:500	32,28	64,56
<i>N. tabacum</i>	8,28:82,8	2,85	34,38

Fuente: Elaboración propia

4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Para el hongo *R. stolonifer* no fue necesario realizar el análisis de varianza ya que ningún tratamiento logró inhibir su crecimiento, incluyendo el testigo (*N. tabacum*), y al cabo de dos días el hongo se desarrolló por completo ocupando toda la caja de Petri (Figura 4).

En la Tabla 7 están reportados los resultados del análisis de varianza para *A. niger*, los mismos que confirmaron que el modelo utilizado fue significativo ($p < 0,05$) y que el “tipo de extracto (A)” así como la combinación “extracto-concentración (AB)” evidenciaron diferencias significativas (puntos alejados de la línea, Figura 5) mientras el parámetro “concentración (B)”

por sí solo no mostró diferencias (puntos cercanos a la línea, Figura 5). En la Tabla 8 se reportan los resultados de la prueba de Tukey relacionados a la interacción AB (tipo de extracto-concentración).

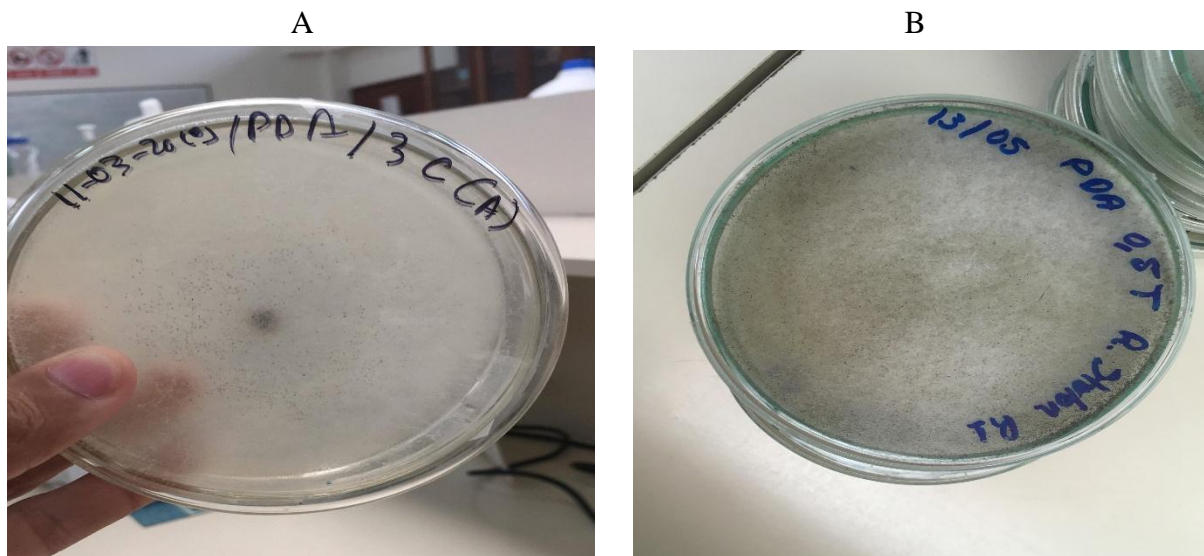


Figura 4 - Desarrollo de *R. stolonifer* tratado con extracto puro de *M. laevis* (A) y con el extracto testigo (B), al séptimo día del experimento en medio de cultivo PDA.

Tabla 7 - Análisis de varianza de diámetros de crecimiento del hongo *A. niger*

	Suma de cuadrados	df	Cuadrado de las medias	Valor F	p-valor	
Modelo	33702,32	17	1982,49	60,26	< 0,0001	significativo
A-Extracto	21443,79	5	4288,76	130,36	< 0,0001	
B-Concentración	52,82	2	26,41	0,80	0,4521	
AB	12205,71	10	1220,57	37,10	< 0,0001	
Error Puro	2368,80	72	32,90			
Correlación Total	36071,12	89				

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8 - Análisis Tukey de un factor de la interacción entre tipo de extracto (A) y la concentración (B).

Factor	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
		a	b	c	d
GC3 0,5	5	25,00			
T 1,5	5	27,40			
T 0,5	5	27,60			
T 3	5	30,60			
GC1 3	5		48,00		
GC2 3	5		48,60		
GC2 1,5	5		49,00		
GC1 1,5	5		50,00		
GC3 3	5		60,00	60,00	
G 0,5	5			70,00	70,00
C 0,5	5			70,00	70,00
GC3 1,5	5				74,00
G 3	5				74,00
G 1,5	5				76,00
C 1,5	5				76,00
GC2 0,5	5				76,40
GC1 0,5	5				78,80
C 3	5				80,00
Sig.		0,984	0,113	0,363	0,363

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

HSD Tukey^a

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

Fuente: Elaboración propia

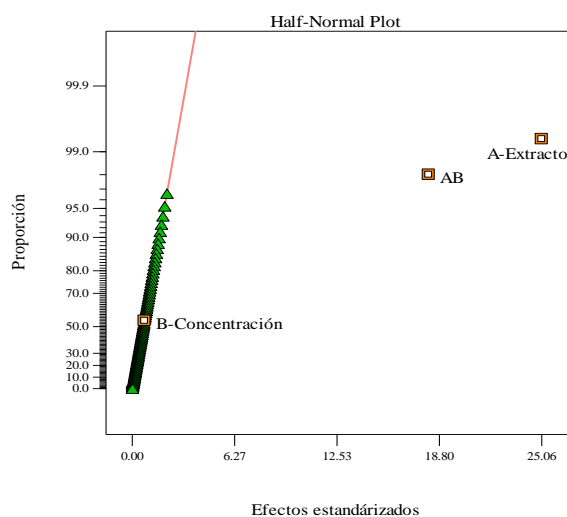


Figura 5 - Análisis de varianza de diámetros de crecimiento del hongo *A. niger*

En la Figura 6 se observa un conjunto de puntos que representan los diámetros de crecimiento registrados durante el experimento; los puntos van desde el valor mínimo hasta el valor máximo. Además, se observa que los valores de R^2 ajustado (0,91) y R^2 predicho (0,89) están cercanos (inferior a 0,2), lo cual significa que el modelo fue adecuado de acuerdo a las especificaciones del software estadístico utilizado.

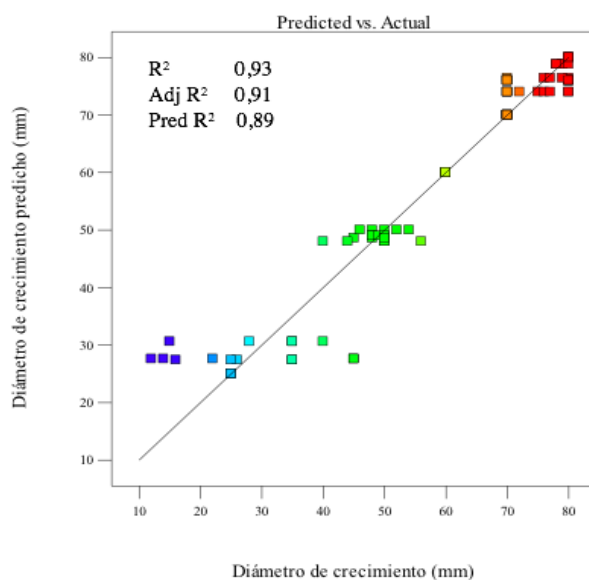


Figura 6 - Efectos estandarizados positivos de la concentración de los extractos sobre el diámetro medio de los hongos

Los resultados obtenidos referidos a los diámetros promedio de crecimiento en función de la concentración, durante los siete días de experimentación, para ambos hongos fitopatógenos, se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9 - Diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de *A. niger* tratado con diferentes extractos a distintas concentraciones durante los 7 días de crecimiento.

Conc. ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Tiempo (días)	Diámetro promedio (mm)					
		G	C	GC1	GC2	GC3	T
0,5	1	13,2	8,6	7,4	8,6	8,4	10
0,5	2	26,2	16,2	22,8	21,4	15,4	16,4
0,5	3	28,4	29	33,4	28,4	18,2	25,6
0,5	4	37,4	34,8	47	57,2	25	27,6
0,5	5	70	70	78,8	76,4	25	27,6
0,5	6	70	70	78,8	76,4	25	27,6
0,5	7	70	70	78,8	76,4	25	27,6
1,5	1	9,6	11,6	8,4	8,8	7	10,8
1,5	2	18	16,2	13	17,6	23,2	19,4
1,5	3	27,8	28	17,8	20,2	33,8	23,4
1,5	4	35,4	35,8	50	49	45,8	25,4
1,5	5	76	76	50	49	74	25,4
1,5	6	76	76	50	49	74	25,4
1,5	7	76	76	50	49	74	25,4
3	1	11,4	11,4	7,6	8,4	9	11,4
3	2	17	16,2	14	14,4	15,6	25,8
3	3	27,4	28,4	18,2	18,2	19,2	29,6
3	4	35	39	48	48,6	60	30,6
3	5	74	80	48	48,6	60	30,6
3	6	74	80	48	48,6	60	30,6
3	7	74	80	48	48,6	60	30,6

Fuente: Elaboración propia

Leyenda

G: guayaba

C: chuchuguazo

GC1: 50% guayaba - 50% chuchuguazo

GC2: 30% guayaba - 70% chuchuguazo

GC3: 70% guayaba - 30% chuchuguazo

Tabla 10 - Diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de *R. stolonifer* tratado con diferentes extractos a distintas concentraciones durante los 7 días de crecimiento.

Conc. ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Tiempo (días)	Diámetro promedio (mm)					
		G	C	GC1	GC2	GC3	T
0,5	1	46,2	46,2	46	46,8	45,6	70,6
0,5	2	90	90	90	90	90	90
0,5	3	90	90	90	90	90	90
0,5	4	90	90	90	90	90	90
0,5	5	90	90	90	90	90	90
0,5	6	90	90	90	90	90	90
0,5	7	90	90	90	90	90	90
1,5	1	44,4	46,4	45,6	44,6	42,8	68,4
1,5	2	90	90	90	90	90	90
1,5	3	90	90	90	90	90	90
1,5	4	90	90	90	90	90	90
1,5	5	90	90	90	90	90	90
1,5	6	90	90	90	90	90	90
1,5	7	90	90	90	90	90	90
3	1	41,6	37,2	40,4	42	46,2	66,6
3	2	90	90	90	90	90	90
3	3	90	90	90	90	90	90
3	4	90	90	90	90	90	90
3	5	90	90	90	90	90	90
3	6	90	90	90	90	90	90
3	7	90	90	90	90	90	90

Fuente: Elaboración propia

Leyenda

G: guayaba

C: chuchuguazo

GC1: 50% guayaba - 50% chuchuguazo

GC2: 30% guayaba - 70% chuchuguazo

GC3: 70% guayaba - 30% chuchuguazo

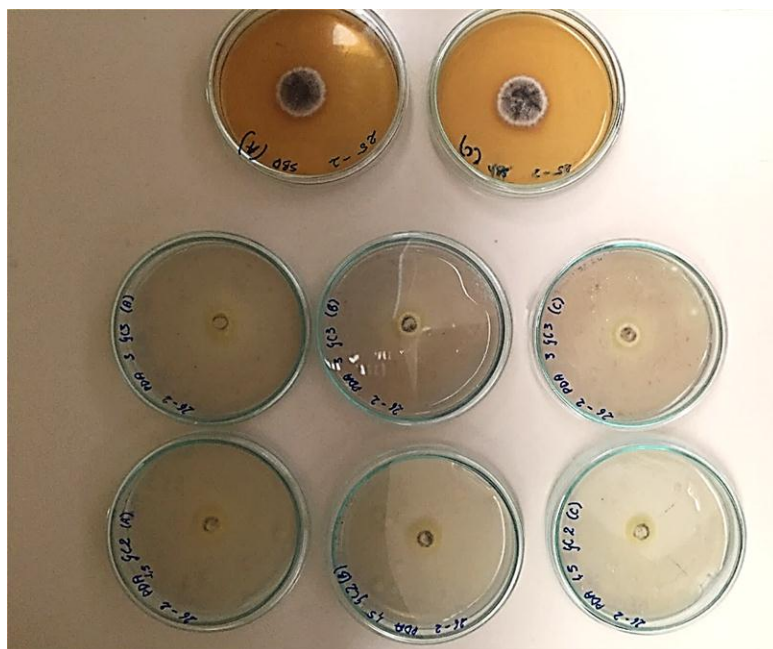


Figura 7 - Colonias de *A. niger* tratadas con la mezcla de extractos GC3 y control negativo (PDA), al tercer día del experimento.

El análisis estadístico de los datos obtenidos (diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas) mostró un comportamiento distinto de los hongos estudiados. *R. stolonifer* no registró ninguna inhibición en el crecimiento de las colonias por parte de los extractos considerados y sus mezclas, así como por parte del extracto de tabaco, considerado como testigo.

Por lo contrario, se registraron diferencias significativas en los resultados relacionados con el comportamiento del hongo *A. niger* (Figura 7).

Los extractos puros de guayaba y chuchuguazo no tuvieron un efecto de inhibición notorio sobre *A. niger*, mientras que sus mezclas presentaron un control de crecimiento más visible (Figura 8). De acuerdo al análisis de la varianza (Tabla 7), las interacciones entre tipo de extracto (A) y concentración (B) resultaron significativas ($p < 0,05$), como también se muestra visualmente en la Figura 8. Las mayores interacciones AB se mostraron en las mezclas GC1, GC2 y GC3; efectivamente se observaron valores de diámetros de crecimiento estadísticamente diferentes, mientras en los extractos puros (G, C) y el testigo esto no sucede.

La mezcla CG1 (50% guayaba-50% chuchuguazo) tuvo mayor efecto a las concentraciones de 1,5 μ L y 3 μ L, con diámetros que no superan los 50 mm, mientras que a la concentración de 0,5 μ L no tuvo efecto ya que alcanzó un diámetro de 70 mm. La mezcla GC2 (30% guayaba-70% chuchuguazo) a las concentraciones de 1,5 y 3 μ L se reportó un mayor control de crecimiento sobre el hongo fitopatógeno, con diámetros máximos de 49 mm, mientras que a la concentración de 0,5 μ L no se tuvo un efecto positivo, puesto que se reportaron diámetros aproximados de 79 mm. La mezcla GC3 (70% guayaba-30% chuchuguazo) mostró el mayor efecto inhibitorio a la concentración de 0,5 μ L, dando un diámetro de 25 mm, mientras que a las concentraciones de 1,5 y 3 μ L no se reportó un control inhibitorio positivo, al reportar diámetros entre 60 y 70 mm. El testigo que fue el extracto puro de tabaco, a las mismas concentraciones, se tuvo un control inhibitorio notable sobre el crecimiento de *A. niger* con un diámetro que oscilan entre 25 y 30 mm (Figura 8).

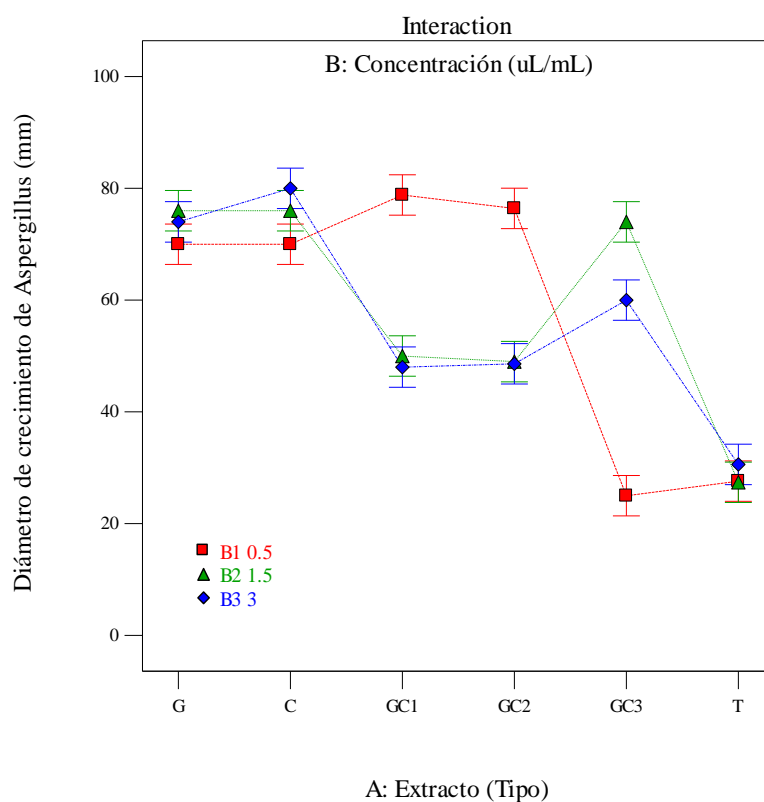


Figura 8 - Gráfico de líneas de los diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de *A. niger* por tipo de extracto [G; C; GC1 (50%-50%); GC2 (30%G-70%C); GC3 (70%G-30%C); T] y concentración (B1: 0,5 μ L/mL; B2: 1,5 μ L/mL; B3: 3 μ L/mL).

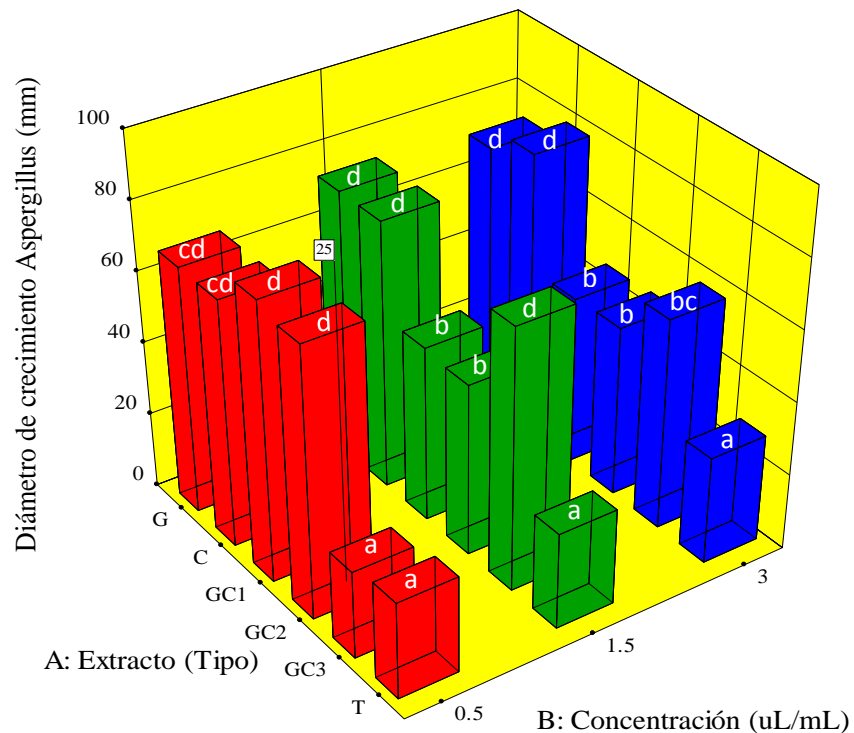


Figura 9 - Gráfico de barras de los diámetros de crecimiento de las colonias fúngicas de *A. niger* por tipo de extracto [G; C; GC1 (50%-50%); GC2 (30%G-70%C); GC3 (70%G-30%C); T] y concentración (B1: 0,5 μ L/mL; B2: 1,5 μ L/mL; B3: 3 μ L/mL). Valores estadísticamente significativos están representados con las letras a, b, c y d.

A continuación, se reportan los gráficos del crecimiento de las colonias de hongos *A. niger* durante los siete días del experimento. Los extractos puros de guayaba y chuchuguazo no lograron inhibir dicho crecimiento, por lo tanto, se reportan los gráficos de los tratamientos de las mezclas de extractos.

Como se observa en la Figura 10, el tratamiento testigo tuvo un control notorio sobre el desarrollo de las colonias fúngicas. El tratamiento GC3 a la concentración de 0,5 μ L/mL fue el que mejores resultados dio y de hecho se registraron los menores diámetros de crecimiento de las colonias, llegando a ser más efectivo que el testigo. Por lo contrario, los tratamientos GC1 y GC2 tuvieron un comportamiento parecido y su efecto inhibitorio fue escaso.

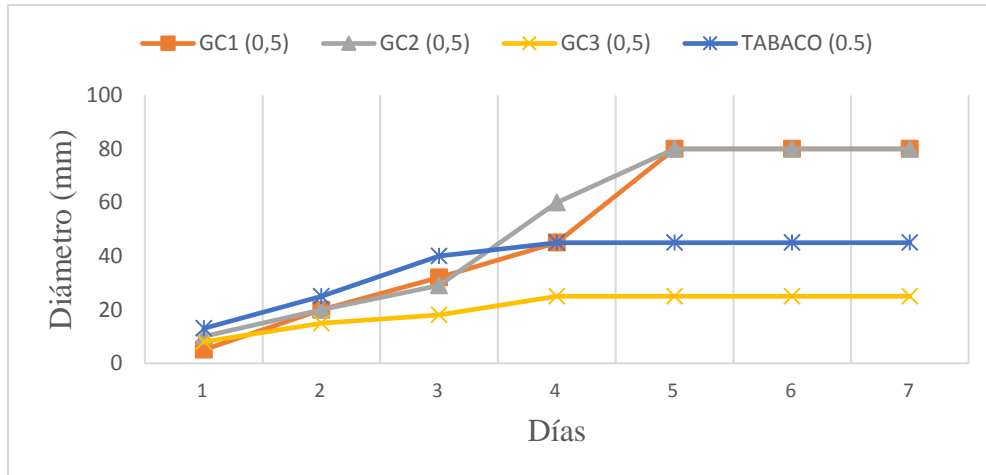


Figura 10 - Crecimiento de las colonias fúngicas de *A. niger* frente a las mezclas de extractos GC1, GC2, GC3 a la concentración de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y frente al testigo (*N. tabacum*)

A la concentración de 1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, el tratamiento testigo fue el que mejores resultados dio y de hecho se registraron los menores diámetros de crecimiento de los hongos tratados con las mezclas de extractos (Figura 11). Durante los tres primeros días desde la inoculación, todos los hongos tuvieron un crecimiento parecido alcanzando diámetros entre 20 y 30 mm, a partir del cuarto día se observó un comportamiento distinto dependiendo del tratamiento, con el testigo resultó ser más efectivo como se esperaba.

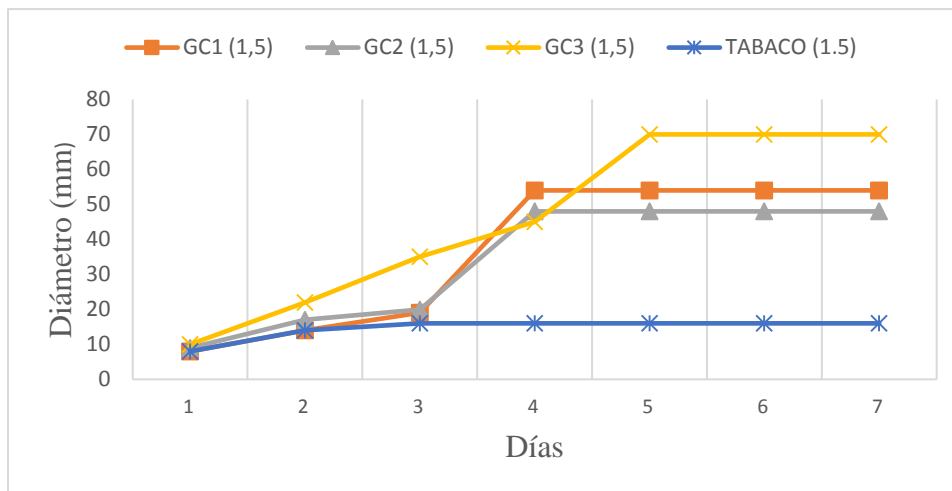


Figura 11 - Crecimiento de las colonias fúngicas de *A. niger* frente a las mezclas de extractos GC1, GC2, GC3 a la concentración de 1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y frente al testigo (*N. tabacum*)

En cuanto a la concentración de 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$, como se observa en la Figura 12, también se observó un comportamiento parecido entre el testigo y los demás tratamientos hasta el tercer día y luego

el tratamiento testigo fue el que mejores resultados dio y de hecho se registraron los menores diámetros de crecimiento de las colonias. En cambio, los tratamientos GC1, GC2 y GC3 tuvieron un comportamiento parecido y su efecto inhibitorio fue escaso.

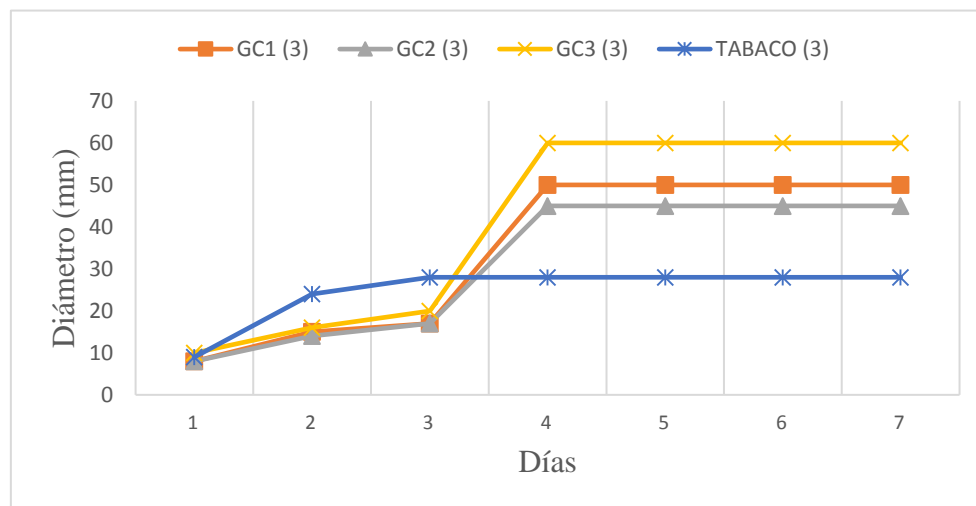


Figura 12 - Crecimiento de las colonias fúngicas de *A. niger* frente a las mezclas de extractos GC1, GC2, GC3 a la concentración de 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y frente al testigo (*N. tabacum*)

Cabe recalcar que también en otros estudios se ha demostrado la actividad antifúngica de extractos de *P. guajava*. Por ejemplo, Dhiman et al. (2011) realizaron estudios de inhibición fúngica del extracto metanólico de dicha planta sobre *A. niger*, y los resultados mostraron un elevado control en el crecimiento de dicho hongo, así como el estudio de Hema et al. (2009) realizado con extracto alcohólico de *P. guajava*.

En cuanto al extracto de *M. laevis*, Malanik et al. (2019) realizaron un amplio estudio en el cual dicho extracto mostró actividad antifúngica, antimicrobiana, antiviral y también antiparasítica.

Finalmente, es importante destacar que, a la hora de una aplicación práctica de estos resultados, puede recomendarse el empleo de la mezcla GC3 (70 % del extracto de *P. guajava* y 30 % del extracto de *M. laevis*) a la concentración de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, para el tratamiento post-cosecha de frutas y verduras, con el objetivo de prolongar su vida útil, siempre y cuando no se afecten sus características sensoriales.

CAPÍTULO V.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La extracción asistida por ultrasonidos resultó eficaz para la obtención de extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales *P. guajava* y *M. laevis*, pues se obtuvo un rendimiento de 13,33% y 64,56% respectivamente. El extracto testigo de *N. tabacum* reportó un rendimiento de 34,38%, bajo la misma técnica de extracción.
- Los extractos hidroalcohólicos de *P. guajava* y *M. laevis*, no resultaron eficaces para el control de *R. stolonifer* en ningún tratamiento estudiado, ya sea en extracto puro de cada especie vegetal o las mezclas de estos, incluyendo al extracto testigo (*N. tabacum*).
- La actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos se pudo evidenciar frente a *A. niger*. Las mezclas de extractos dieron mejores resultados que los extractos puros, especialmente la mezcla GC3 a la concentración de 0,5 $\mu\text{L/mL}$; las mezclas GC1 y GC2 mostraron mayor control a las concentraciones de 1,5 $\mu\text{L/mL}$ y 3 $\mu\text{L/mL}$. El extracto testigo (*N. tabacum*) mostró un significativo control sobre el hongo en las diferentes concentraciones.

5.2 RECOMENDACIONES

- Evaluar concentraciones de los extractos hidroalcohólicos superiores a 3 $\mu\text{L/mL}$, tanto puros como sus mezclas, de *P. guajava* y *M. laevis* obtenidos sobre el hongo *R. stolonifer*, así como otro tipo de extractos de estas de especies vegetales sobre *A. niger*.
- Evaluar la efectividad del mejor tratamiento obtenido en condiciones de campo para el control de *A. niger*.

CAPÍTULO VI.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, L., Vásquez, J., Núñez, V., Pinto, J., & Shiga, B. (2013). Efecto de *Maytenus macrocarpa* (Chuchuhuasi) en el sistema reproductor masculino del ratón (*Mus musculus*). *Revista Peruana de Biología*, 20(3). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332013000300004
- Alvarado, A., Barrera, L., Hernández, A., & Velázquez, M. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2). Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752011000200011&script=sci_arttext&tlng=en
- Andrade, M., Moreno, C., Concellón, A., & Chicaiza, B. (2013). Efecto hormético de la radiación UV-C sobre el desarrollo de *Rhizopus* y *Phytophthora* en naranjilla (*Solanum quitoense*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14(1), 64-71. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/813/81327871012/>
- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*, 20(4). Obtenido de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/449/377
- Balleste, R. (2006). Evaluación del desempeño diagnóstico del medio de difusión en agar Etest® para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Médica del Uruguay*, 22(2). Obtenido de <http://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v22n2/v22n2a08.pdf>
- Barrera, L., & Bautista, S. (2008). Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1). Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092008000100005&script=sci_arttext&tlng=pt
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Salta*, 44. Argentina. Obtenido de <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/4aspergilos.pdf>
- Cruz, A., Rodríguez, C., & Ortíz, C. (2011). Efecto insecticida *in vitro* del extracto etanólico de algunas plantas sobre la mosca adulta *Haematobia irritans*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*,

16(3). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000300001

Davicino, R., Mattar, M., Casali, Y., & Correa, S. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *14(2)*. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300011

Dhiman, A., Nanda, A., Ahmad, S., & Narasimhan, B. (2011). *In vitro* antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. *J Pharm Bioallied Sci*, *3(2)*, 226-229. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3103916/>

García , M. (2010). Guía Técnica del Cultivo de la Guayaba. *Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdoba"*.

García, L., Martínez, A., Ortega, J., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *9(2)*. Argentina. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/863/86314868005/>

Gil, M. (2019). *Aspergillus niger: características, taxonomía, morfología y patologías*. Obtenido de Liferder: <https://www.liferder.com/aspergillus-niger/>

Guamán, J. (2017). Evaluación de *Trichoderma harzianum* Rafai y dos extractos vegetales en mora, fresa y tomate en post-cosecha, contra *Botrytis* sp., *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp. (*Maestría en Agroecología y Ambiente*). Universidad de Cuenca, Cuenca.

Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *29(1)*. Caracas. Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562009000100007&script=sci_arttext&tlng=en

Guédez, C., Cañizález, L., Avendaño, L., & Scorza, J. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *34(2)*, 81-85. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/1994/199437912007/>

Guerrero, E. (2007). *In vitro* biological activity of extracts of *Flourensia cernua* D.C. on postharvest pathogens: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. *Revista mexicana de fitopatología*, *25(1)*.

- Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092007000100007&script=sci_abstract&tlng=en
- Hema, R., Kumaravel, S., & Elanchezhian, N. (2009). Antimicrobial activity of some of the South-Indian spices and herbals against food pathogens. *Global Journal of Pharmacology*, 3(1), 38-40. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/9ace/c7112f3a1cb3942d3f0065ee032d6e1ad79f.pdf>
- Hernández, A., Bautista, S., & Velázquez del Valle, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 119-123. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/610/61030202/>
- Infoagro. (s.f.). *El cultivo de la guayaba*. Obtenido de infoAgro.com: https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_guayaba.asp
- Lombardi, J., Groppo, M., & Biral, L. (2015). *Lista de especies da flora do Brasil*. Obtenido de Instituto de Investigaciones Jardín Botánico de Río de Janeiro: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB126794>
- Malanik, M., Treml, J., Kaucká, P., & Kubatka, P. (2019). *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq: Phytochemistry and pharmacological activity. *Molecules*, 24(288).
- Martínez, M., López, M., Bentancourt, J., & Pérez, H. (2001). Estudio toxicológico preclínico de la *Psidium guajava* L. (guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2001(2). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962001000200005
- Martínez, M., Molina, N., & Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47961997000100003&script=sci_arttext&tlng=en
- Moya, A. (2018). Optimización de actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de mezclas de extractos acuosos de plantas amazónicas. (*Proyecto de Investigación y Desarrollo previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial*). Universidad Estatal Amazónica, Puyo.
- Naturalista. (2018). *Rhizopus stolonifer*. Obtenido de Naturalista: <https://www.naturalista.mx/taxa/245693-Rhizopus-stolonifer>

- Ochoa, Y., Cerna, E., Landeros, J., Hernández, S., & Delgado, J. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Revista internacional de botánica experimental*, 81, 69-73. Obtenido de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38675754/evaluacion_in-vitro_de_la_actividad_antifungica_de_cuatro_extractos_vegetales_metanolicas.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1554836220&Signature=IfrXVpPam%2FEU4gyWyhsg9s3JzF0%3D&resp
- Pulido, H., & Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda ed.). México: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. Obtenido de http://gc.initelabs.com/recursos/files/r161r/w19537w/analisis_y_diseno_experimentos.pdf
- Puripattanavong, J., Songkram, C., Lomlim, L., & Amnuait, T. (Noviembre de 2013). Development of concentrated emulsion containing *Nicotiana tabacum* extract for use as pesticide. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(11), 16-21. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/273759589_Development_of_Concentrated_Emulsion_containing_Nicotiana_tabacum_Extract_for_Use_as_Pesticide_ARTICLE_INFO_ABSTRACT
- Reyes, I., González, M., & López, F. (2013). Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 41-56. México. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/620/62028007005.pdf>
- Rodríguez, A., Morales, D., & Ramírez, M. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 21(2). Cuba. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/1932/193215024014/>
- Rodríguez, A., Ramírez, M., Bautista, S., & Cruz, A. (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. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4277990>
- Rodríguez, B. (22 de junio de 2016). *Aspergillus* spp. Obtenido de Atlas de identificación micológica: <https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/06/22/aspergillus-spp/>
- Salazar, D. (2013). Desarrollo de un medicamento analgésico tópico de *Maytenus laevis* Reissek (Chuchuguaso). (Tesis para optar por el título profesional de químico farmacéutico). Universidad

Central del Ecuador, Quito, Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1465/1/T-UCE-0008-14.pdf>

Siccha, S. (2018). Caracterización físico química del extracto fluido de *Maytenus laevis* (chuchuhuasi) y su toxicidad sobre *Artemia salina*. (Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico). Universidad Católica de los Ángeles de Chimbote, Trujillo, Perú. Obtenido de http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/7932/CARACTERISTICAS_TOXICIDAD_SICCHA_SANCHEZ_SILVIA_CRISTINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Tenorio, R., Olalde, V., Mena, H., Ceja, L., & Venegas, J. (2012). Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs. *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 8(3), 103-110. Obtenido de http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25aarticulosPDF/11.-ANTAGONISMO%20IN%20VITRO%20DE%20AISLADOS_Rosa-Victor-Hortencia-Luis-Jose-Guadalupe-Valentina.pdf

Trigos, Á., Ramírez, K., & 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. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300015

Velázquez, M., Bautista, S., Hernández, A., Guerra, M., & Amora, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1). Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092008000100008&script=sci_arttext

Yam, A., Villaseñor, C., & Soto, M. (2010). Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 19(4). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542010000400012