



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA

AGROINDUSTRIAL

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICA DE EXTRACTO DE SEMILLA DE MANGO (*Mangifera indica* L.) EN *Colletotrichum* sp.

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

M.C. DEYSI GÓMEZ MALDONADO

Bajo la supervisión de:

Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros



APROBADA



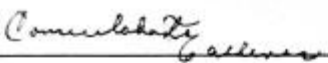
DCA

Doctorado en Ciencias Agroalimentarias

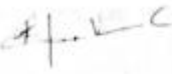
Chapingo, México, junio 2020

Tesis realizada por la **M.C. Deysi Gómez Maldonado** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

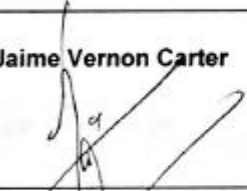
DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTORA: 

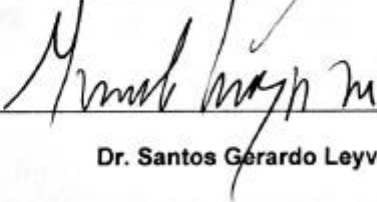
Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros

CO-DIRECTOR: 

Dr. E. Jaime Vernon Carter

ASESOR: 

Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

ASESOR: 

Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

LECTOR EXTERNO: 

Dra. Maria Eva Rodriguez Huevo

INDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
DEDICATORIAS.....	xi
AGRADECIMIENTOS	xii
DATOS BIOGRÁFICOS	xiv
RESUMEN GENERAL	xv
abstract.....	xvi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	17
2 Revisión de Literatura General	21
2.1 Origen y distribución del mango (<i>Mangifera indica</i> L.).....	21
2.2 Importancia económica del cultivo de mango	21
2.3 Países productores y exportadores de mango	22
2.4 Manejo postcosecha del mango	22
2.5 Enfermedades causadas por hongos	23
2.6 Importancia y distribución de la enfermedad de antracnosis	24
2.7 Agente causal de antracnosis.....	25
2.8 Tipos de control de antracnosis	26
2.8.1 Uso de cultivares tolerantes para el manejo de la antracnosis	26
2.8.2 Control biológico.....	26
2.8.3 Control químico	26
2.9 Técnicas moleculares para la identificación de hongos.....	28
2.10 Subproductos agroindustriales como fuente de compuestos bioactivos	28
2.10.1 Las semillas de mango como subproducto agroindustrial.....	30
2.10.2 Composición química de las semillas de mango.....	32
2.11 Antioxidantes	37

2.11.1	Clasificación de antioxidantes	38
2.11.2	Vitaminas	39
2.12	Reacciones oxido-reducción y su importancia.....	42
2.13	Factores que afectan la extracción de compuestos fenólicos.....	43
2.14	Literatura citada	46
3	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS POLIFENOLES DE LA ALMENDRA DE MANGO (<i>Mangifera indica</i> L.) EN FRUTOS DE MANGO INFECTADOS POR ANTRACNOSIS.....	57
3.1	Resumen	57
3.2	Abstract.....	58
3.3	Introduction	59
3.4	Materials and methods.....	60
3.4.1	Chemicals	60
3.4.2	Plant material	61
3.4.3	Pathogenic fungus.....	61
3.4.4	Extraction conditions	62
3.4.5	MKE characterization	63
3.4.6	Statistical analysis	67
3.5	Results and discussion	67
3.5.1	Proximate chemical composition of kernel flour	67
3.5.2	Effects of extraction conditions on AA and TPC of extracts	68
3.5.3	Total flavonoids, ascorbic acid, tannins and antioxidant activity of MKE.....	72
3.5.4	Determination of phenolic compounds	72
3.5.5	Effect of mango seed kernel extract on mycelial growth of <i>C. brevisporum</i>	74
3.5.6	Effect of MKE on spore germination of <i>C. brevisporum</i>	78
3.5.7	Effect of MKE on anthracnose disease on mango fruit.....	79
3.6	Conclusions	81
3.7	References	81

4	PRIMER INFORME DE <i>Colletotrichum brevisporum</i> ASOCIADO A ANTRACNOSIS AISLADO DE FRUTOS DE MANGO (<i>Mangifera indica</i> L.) EN MÉXICO.....	89
4.1	Resumen	89
4.2	Abstract.....	90
4.3	Introduction	91
4.4	Materials and methods.....	91
4.4.1	Sampling site and disease incidence¡Error! Marcador no definido.	
4.4.2	Isolation and indetification of the pathogen	91
4.4.3	Molecular identification.....	92
4.4.4	Pathogenicity test	93
4.5	Results.....	94
4.6	Discussion	99
5	Conclusiones Generales.....	104
6	Apéndices	106
6.1	Comprobante de registro de secuencia de DNA de <i>Colletotrichum brevisporum</i> , aislado en este estudio. ITS (espaciador transcrito interno). 106	
6.2	Comprobante de registro de secuencia de <i>Colletotrichum brevisporum</i> , aislado en este estudio. Amplificación del gen de ACTINA PARCIAL (ACT).	107

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en extractos de almendra de mango de diferentes variedades.....	36
Cuadro 2. Compuestos fenólicos presentes en almendra de mango (<i>Mangifera indica</i> L.) de diferentes variedades, determinados por HPLC-DAD y expresados en mg/ 100 g base seca.....	38
Cuadro 3. Análisis de varianza multifactorial para el contenido fenólico total y actividad antioxidante DPPH• de los extractos de almendra de mango.....	72
Cuadro 4. Compuestos fenólicos en extracto de almendra de mango.....	75
Cuadro 5. Secuencias de GenBank de especies de <i>Colletotrichum</i> junto con su número de acceso utilizado en el análisis filogenético.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales estados productores de mango en México en 2018. Elaboración propia con datos del SIAP, 2018.....	21
Fig. 2. síntomas de antracnosis (<i>Colletotrichum spp.</i>) en frutos de mango Manila (A) y Haden (B y C).....	23
Fig. 3. Frutos (A), semillas (B y C) y almendra (D, E y F) de mango Manila.....	33
Fig. 4. Harina (A) y extracto (B) obtenidos a partir de la almendra de mango Manila.....	33
Fig. 5. Estructura química de un flavonoide.....	43
Fig. 6. Ácidos fenólicos, p-hidroxibenzoico (a), 3,4 dihidroxibenzoico (b), ácido caféico (c), ácido p-cumárico (d), ácido ferúlico (e).....	44
Fig. 7. Estructura química de taninos hidrolizables y condensados.....	45
Fig. 8. Efecto de las variables de extracción relación sólido / líquido y tiempo de sonicación sobre: (A) contenido fenólico total (mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / g de grano) y (B) actividad antioxidante de DPPH (μmol de equivalentes de Trolox (TE) / g de grano). Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p \leq 0.05$).....	73
Figura 9. Crecimiento micelial de <i>C. brevisporum</i> después de la incubación durante 12 días a 28 ° C. Control sin extracto de almendra de mango (MKE); con tiabendazol (TBZ); y con MKE.....	78
Figura 10. Inhibición del crecimiento micelial (%) de <i>C. brevisporum</i> (28 °C, 12 días). Control, MKE (0.5-5 g/L) y TBZ (2 g/L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p \leq 0.05$).....	79

Figura 11. Germinación de esporas (%) de <i>C. brevisporum</i> después de 5 y 20 h de incubación a 28 ° C. Control, MKE (0.5-3 g / L) y TBZ (2 g / L).....	81
Figura 12. Desarrollo de antracnosis en frutos de mango después de 3, 6 y 9 días a 28 °C: (A) síntomas de antracnosis y (B) gravedad de la enfermedad (diámetro de la lesión de antracnosis).Control, MKE (1.5 y 3 g/L) y TBZ (2 g/L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias ($p \leq 0.05$).....	82
Fig. 13. Síntomas típicos de antracnosis en frutos, hojas y ramas en <i>Mangifera indica</i> L. var. Ataulfo: (A) fruto de mango saludable; (B) fruto de mango enfermo; (C) fruto de mango inmaduro enfermo; (D) antracnosis en las hojas; (E) antracnosis en las ramas.....	99
Fig. 14. Morfología de <i>Colletotrichum brevisporum</i> . (A) conidia; (B-D) apresorios(barra de escala: 10 μ m).....	99
Fig. 15. Árbol filogenético construido por el método de unión del vecino inferido del gen combinado ITS-rDNA y actina (ACT), secuencias de datos que muestran relaciones entre aislamientos de <i>Colletotrichum brevisporum</i> y especies de <i>Colletotrichum</i> relacionadas (modelo de sustitución Tamura-Nei y opciones de búsqueda de intercambio de vecino más cercano con 1000 réplicas de arranque).....	100
Fig. 16. Prueba de patogenicidad, desarrollo de antracnosis en frutos de mango después de 6 y 9 días de inoculación a 28 ° C (A y B); C: fruta tratada con agua (control).....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

MKE	Extracto de almendra de mango optimizado
KF	Harina de almendra de mango
TBZ	Fungicida comercial Tiabendazol (Tecto 60, 60% p/p).
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
ET	Equivalentes de Trolox
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ABTS	Sal de diamonio 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
TPC	Contenido de Fenoles Totales
AA	Actividad Antioxidante
TFC	Contenido de Flavonoides Totales
QE	Equivalentes de Quercetina
AscA	Ácido Ascórbico
CT	Taninos Condensados
CE	Equivalentes de Catequina
LRS	Relación Sólido/Líquido
ST	Tiempo de sonicación
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
PDA	Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar
SP	Germinación de esporas
MGI	Inhibición del crecimiento micelial
ITS	Espaciador Transcrito Interno
ACT	Gen de Actina Parcial

DEDICATORIAS

A mis hijos Said Alexander y Víctor Hugo, mi razón de ser y motor de lucha en esta vida, quienes me motivan a ser una mejor persona cada día.

A mis padres María Maldonado Espinoza y Antonio Gómez Gutiérrez, a quienes amo, admiro y respeto. Gracias por la entrega y dedicación, por las enseñanzas que me han regalado, por hacer de mí una persona con valores y determinación. Por la valentía y fortaleza que me inculcaron, son mi ejemplo de vida.

A mi esposo Víctor Hugo, por su apoyo incondicional en este camino que decidí tomar y por ser mi fortaleza interior.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi vida y darme fortaleza, salud y paciencia durante el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Autónoma Chapingo, mi *Alma Mater*, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado y permitirme crecer personal y profesionalmente.

Al programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, especialmente al Doctorado en Ciencias Agroalimentarias de la Universidad Autónoma Chapingo por los conocimientos obtenidos y las facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, especialmente al Dr. E. Jaime Vernon Carter, responsable del Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, por dirigir este proyecto con entrega y dedicación, por sus conocimientos y por conducirme exitosamente en este camino. Gracias por todas las facilidades otorgadas durante la realización de mi Estancia de Investigación Doctoral.

Al Departamento de Parasitología Agrícola, en especial al Dr. S. Gerardo Leyva Mir, responsable del Laboratorio de Micología, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de parte de la fase experimental del proyecto de investigación y por su acertada asesoría.

A la Asociación de Productores de Mango del municipio de Tuzantla, Michoacán, México, por proporcionarme la materia prima para este estudio.

A la Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros, por dirigir este proyecto con entusiasmo y profesionalismo, por creer en mí y en mi trabajo. Gracias por las lecciones y todos los aprendizajes que obtuve de su gran experiencia, por su disposición, paciencia y comprensión durante el desarrollo del proyecto de investigación y mi estancia en el doctorado, que me han ayudado a crecer como persona y profesionalmente. Gracias por ser un gran ser humano.

Dr. Eleazar Aguirre Mandujano, por sus valiosas aportaciones y acertadas observaciones en la revisión de este trabajo de investigación y por todo su apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez, responsable del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo, por el acceso a sus instalaciones y equipos, facilitando la realización de este trabajo de investigación y por su apoyo incondicional, por compartir sus valiosos conocimientos, su asesoría y acertadas sugerencias. Agradezco su disposición para contribuir en mi formación académica.

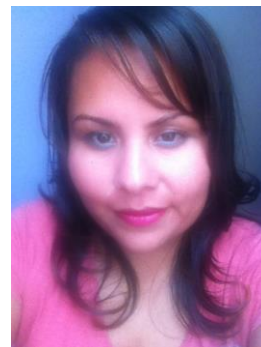
A la Dra. Irma Salazar, por su paciencia y asesoría.

A la Dra. Leticia Robles Yerena, por sus aportaciones y por compartir su experiencia para enriquecer el trabajo experimental.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Deysi Gómez Maldonado
Fecha de nacimiento: 21 de junio de 1986
Lugar de nacimiento: Michoacán, México.
CURP: GOMD860621MMNMLY08
Cedula profesional: 7048704



Desarrollo académico

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo (2005-2009). Maestría: Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo (2012-2014).

Experiencia profesional

En 2009, laboró como Técnico en el proyecto “Red Mexicana de Investigación en Política Agroalimentaria” (AGROPROSPECTA). En 2010, prestó sus servicios profesionales en la empresa Tepehuana S.A. de C.V., donde laboró como Auxiliar de Aseguramiento de Calidad. Durante el periodo 2011-2012, se desempeñó como Jefe de Control de Calidad en la empresa Fresco-Logística División Alimentos S.A. de C.V. Ha participado como asesor en tesis de licenciatura en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo (2014) y tesis de maestría, en la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo (2020). Participó como ponente en el II Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas (abril, 2014), en 3er Congreso Internacional de Ingeniería Agroindustrial (octubre, 2016) y en el 8° Congreso Internacional de Investigación en Ciencias Básicas y Agronómicas (septiembre, 2019). Realizó una estancia de investigación en la Universidad Autónoma Metropolitana, UAMI (2018). Durante su formación profesional y laboral ha recibido cursos de capacitación en las áreas de lácteos, microencapsulación, calorimetría, microscopía electrónica de barrido, reología y evaluación sensorial de los alimentos.

RESUMEN GENERAL

Actividad antioxidante y antifúngica de extracto de semilla de mango (*Mangifera indica* L.) en *Colletotrichum* sp.¹

Resumen

La antracnosis causada por *Colletotrichum* sp. es la enfermedad más importante pre y poscosecha del mango, y es controlada mediante la aplicación de fungicidas sintéticos, cuyo uso prolongado puede causar la aparición de cepas resistentes a fungicidas, y sus residuos en la fruta ser perjudiciales para los consumidores. Así, la búsqueda de fungicidas naturales ha aumentado. En este sentido, los extractos de almendra de mango constituyen una alternativa como fungicida natural debido a la actividad antioxidante y antibacteriana de sus compuestos fenólicos. En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica del extracto de la almendra de mango Manila (MKE) *in vitro* e *in vivo* contra antracnosis. El patógeno se aisló del tejido de mangos infectados y, en función de sus características morfológicas, culturales y moleculares, se identificó como *Colletotrichum brevisporum*. Se obtuvo un MKE óptimo con un contenido fenólico total de 461.7 mg EAG/g y una actividad antioxidante DPPH• de 2919.0 µmol ET/g, mediante la aplicación de ultrasonido de alta intensidad, usando una relación sólido/líquido de 1/20 g/mL y un tiempo de sonicación de 30 min. Los principales compuestos fenólicos en MKE fueron mangiferina, ácido clorogénico, miricetina, ácido ferúlico, quercetina, rutina y ácido cafeico. MKE con 3 g/L en PDA produjo inhibición del crecimiento micelial (MGI) del 100% después de 9 d y una germinación de esporas (SP) del 0% después de 20 h. En contraste, la dosis recomendada (2 g/L) del fungicida comercial tiabendazol (TBZ) alcanzó un MGI de 67.6% y un SP de 51.4% en los mismos períodos de tiempo. Los mangos sumergidos en una solución acuosa de MKE (3 g/L) durante 20 min e inoculados con *C. brevisporum* (10⁵ esporas/mL) presentaron lesiones de la enfermedad de 0 mm, mientras que aquellos que se sumergieron en TBZ (2 g/L) de 4.5 mm, ambos después de 9 d.

Palabras clave: mango, actividad antioxidante, compuestos fenólicos, *Colletotrichum brevisporum*, actividad antifúngica.

¹ Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Deysi Gómez Maldonado

Director de Tesis: Consuelo S.O. Lobato Calleros

ABSTRACT

Antioxidant and antifungal activity of mango (*Mangifera indica* L.) seed extract in *Colletotrichum* sp.²

Abstract

The most important field and postharvest disease of mango is the anthracnose caused by *Colletotrichum* sp., and it is controlled by the application of synthetic fungicides, whose use during extended periods may cause the emergence of fungicide-resistant strains, and their residues on the fruit may be harmful to consumers. Thus, the search for natural and effective fungicides has increased. In this sense, mango kernel extracts constitute an alternative as natural fungicide due to the antioxidant and antibacterial activities of their phenolic compounds. In this work, Mango cv. Manila kernel ethanolic extract (MKE) was assessed *in vitro* and *in vivo* for antifungal activity against anthracnose. The pathogen was isolated and identified as *Colletotrichum brevisporum* from infected mangoes tissue, based on its morphological, cultural and molecular characteristics. An optimum MKE with a total phenolic content of 461.7 mg GAE/g and DPPH[•] antioxidant activity of 2919.0 μ mol TE/g was obtained by applying high intensity ultrasound, using a solid/liquid ratio of 1/20 g/mL and a sonication time of 30 min. The major phenolic compounds in MKE were mangiferin, chlorogenic acid, myricetin, ferulic acid, quercetin, rutin and caffeic acid. The MKE at 3 g/L in PDA produced a mycelial growth inhibition (MGI) of 100% after 9 d and a spore germination (SP) of 0% after 20 h. In contrast, the recommended dosage (2 g/L) of the commercial fungicide thiabendazole (TBZ) achieved a MGI of 67.6% and a SP of 51.4% at the same time periods. The mango fruits immersed in MKE (3 g/L) aqueous solution for 20 min and inoculated with *C. brevisporum* (10^5 spores/mL) presented disease lesions of 0 mm, while when immersed in TBZ (2 g/L) the disease lesions were of 4.5 mm, both after 9 d.

Keywords: mango, antioxidant activity, phenolic compounds, *Colletotrichum brevisporum*, antifungal activity

²Thesis: Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Deysi Gómez Maldonado

Advisor: PhD. Consuelo S.O. Lobato Calleros

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El mango (*Mangifera indica* L.), conocido como el "Rey de las Frutas Tropicales", pertenece a la familia *Anacardiaceae*, y es considerado como una de las frutas favoritas del mundo por su atractivo color, delicioso sabor, agradable fragancia y valor nutricional (Tharanathan, Yashoda, & Prabha, 2006). Originario de la India, posteriormente se introdujo en Tailandia, Malasia, China y otros países. En la actualidad, el mango se ha cultivado ampliamente en todo el mundo (Chen, Zhao, He, Ou, Hu & Wang, 2019). La producción global de mango en 2017 fue de 50.65 millones de ton. México es el cuarto productor de mango, con más de 50 variedades, entre las que destacan Manila, Ataulfo, Hadden, Kent, Keitt, Tommy Atkins, entre otras (Vázquez-Celestino, Ramos-Sotelo, Rivera-Pastrana, Vázquez-Barrios, & Mercado-Silva, 2016). Normalmente se consume en fresco o se utiliza para el procesamiento de jugos, néctares y mermeladas. Sin embargo, las frutas son altamente susceptibles a varios patógenos, los cuales provocan deterioro de la calidad y reducción del valor en el mercado. La antracnosis, causada por *Colletotrichum* sp., Es reconocida como la enfermedad de campo y poscosecha más importante del mango (Sefu, Satheesh, & Berecha, 2015). En el pasado, la aparición de antracnosis en el mango se atribuía exclusivamente a *C. gloeosporioides*, pero estudios moleculares recientes han identificado diferentes especies de *Colletotrichum* como prevalentes en las lesiones de antracnosis (Lima *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016; Noireung *et al.*, 2012; Shivas *et al.*, 2016). El enfoque principal para controlar las enfermedades de la fruta lo constituye la aplicación de fungicidas sintéticos, pero su uso durante períodos prolongados puede conducir a la aparición de cepas resistentes (Shi, Li, Qin, & Tian, 2012). Además, los residuos de estos productos químicos en la fruta pueden ser perjudiciales para los consumidores y el medio ambiente (Onyeani & Osunlaja, 2012).

Con base en lo expuesto, la búsqueda de agentes antimicrobianos naturales y efectivos ha aumentado en los últimos años. Varios estudios han demostrado que los metabolitos secundarios de las plantas, como los compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, tienen actividades antifúngicas y antibacterianas (Muller-

Riebau, Berger, & Yegen, 1995). Diversos investigadores han centrado sus esfuerzos en el estudio de residuos agroindustriales, con el fin de encontrar fuentes ricas en estos compuestos (Riciputi *et al.*, 2018; Sumere *et al.*, 2018) y al mismo tiempo mitigar el impacto ambiental. Las semillas de mango se desechan como residuos en el procesamiento del fruto para la elaboración de jugos, néctares y mermeladas, generando más de un millón de ton anuales a nivel mundial. Estas semillas constituyen una rica fuente de compuestos fenólicos, principalmente ácidos gálicos y elágicos, así como galatos (Puravankara, Boghra, & Sharma, 2000). Se ha informado que los extractos de semillas de mango son efectivos contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio vulnificus* y *Candida albicans* (Abdalla, Darwish, Ayad, & El-Hamahmy, 2007; Kaur *et al.*, 2010; Mutua, Imathiu, & Owino, 2017). Algunos estudios previos han estudiado la composición fenólica de semillas de diferentes variedades de mango. Ribeiro *et al.* (2008) y Abdel-Aty *et al.* (2018) utilizaron extracción convencional (metanol: agua) para extraer compuestos fenólicos a partir de las almendras de semillas de mango cv. Ubá e Hindi. En la primera variedad, la concentración fenólica en la almendra de la semilla fue 4.6 veces mayor que en la pulpa; mientras que, en la última, la hesperidina fue el principal compuesto fenólico. Dorta *et al.* (2014) utilizaron la extracción asistida por microondas para obtener compuestos fenólicos a partir de las almendras de las semillas de las variedades de mango Keitt, Sensation y Gomera, descubriendo que el galato de metilo y el penta-O-galloilglucósido eran los componentes principales de los extractos Keitt y Sensation, mientras que un derivado de rahmnetin era el compuesto principal del extracto de Gomera. Torres-León *et al.* (2017) informaron que los compuestos fenólicos de la almendra de mango cv. Ataulfo poseen una mayor actividad antioxidante que los antioxidantes comerciales. Se ha informado que la composición fenólica, cualitativa y cuantitativa de los extractos, depende de la variedad y procedencia del mango, el método y las condiciones de extracción (Dorta, González, Lobo, Sánchez-Moreno, & de Ancos, 2014; Torres-León, Rojas, Serna-Cock, Belmares-Cerda, & Aguilar, 2017; Dorta *et al.*, 2014; Torres-León *et al.*, 2017). El ultrasonido en combinación con la extracción empleando un

“disolvente verde” (no tóxico y amigable con el medio ambiente) constituye una opción interesante para obtener extractos de almendra de mango ricos en compuestos fenólicos totales. La cavitación acústica permite una mayor penetración del disolvente en el material vegetal debido a la interrupción de las paredes celulares y aumenta la superficie de contacto, área entre la fase sólida y líquida (Ramić *et al.*, 2015).

Hasta la fecha, no hay informes sobre el contenido de compuestos fenólicos y la composición de la almendra de la semilla de mango cv. Manila y sus propiedades antifúngicas no han sido exploradas, particularmente en la enfermedad de antracnosis. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener extractos de almendra de mango cv. Manila, usando un disolvente verde combinado con extracción asistida por ultrasonido, y evaluar su actividad antioxidante y el potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* en *Colletotrichum brevisporum*.

En el **Capítulo 3** se realizó un estudio para determinar el efecto de factores del proceso de extracción (relación sólido/líquido y tiempo de sonicación) sobre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de la almendra de mango Manila. Posteriormente, se obtuvo un extracto optimizado, el cual fue caracterizado mediante la determinación del contenido de fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados, ácido ascórbico y actividad antioxidante (ABTS y DPPH). Se identificaron los compuestos fenólicos presentes en el extracto usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y se cuantificaron para determinar el perfil fenólico. Finalmente, se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* del extracto sobre *Colletotrichum brevisporum* en frutos de mango Ataulfo en postcosecha.

En el **Capítulo 4** se realizó el aislamiento del hongo asociado a la enfermedad de antracnosis a partir de frutos de mango variedad Ataulfo colectados en el Municipio de Tapachula, Chiapas, México, una de las principales zonas productoras de este fruto. Por medio de caracterización morfológica, caracterización e identificación molecular a través de la región rDNA-ITS (ITS) y

del gen Actina parcial (ACT) se identificó el género *Colletotrichum*. Además, se realizó un análisis filogenético para confirmación adicional de la especie mediante la combinación de secuencias de ADN de los aislados de esta investigación y las secuencias de varios *Colletotrichum* spp. de GenBank, donde se encontró a *C. brevisporum* como el causante de síntomas de antracnosis en los frutos.

2 REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

2.1 Origen y distribución del mango (*Mangifera indica* L.)

El mango (*Mangifera indica* L.) es originario de la India y Asia, donde se ha cultivado por más de 4000 años. Posiblemente, los comerciantes indios y budistas introdujeron el mango a Malasia y otros países de Asia oriental, durante el cuarto o quinto siglo A.C., y a Filipinas, entre 1400 y 1450 D.C. Los portugueses fueron los primeros en establecer rutas comerciales con la India y transportaron el mango hacia el este de África y Brasil. Mientras que comerciantes españoles llevaron el mango de Filipinas a la costa del oeste de México. Este cultivo se introdujo a Hawái a partir de la costa oeste de México, entre los años 1800 y 1820, por el horticultor español Don Francisco de Paula Marín. Los mangos se introdujeron a Brasil se extendieron a Barbados y a otras islas de la zona del Caribe (Mukherjee & Litz, 2009; Paull & Duarte, 2011). Actualmente el mango se cultiva en todas las zonas tropicales de Asia, África y América, donde el consumo local es elevado (Mukherjee & Litz, 2009; Paull & Duarte, 2011; Prakash, 2004).

2.2 Importancia económica del cultivo de mango

El cultivo del mango ocupa el quinto lugar de producción en el mundo después de la banana, vid, manzana y naranja (FAOSTAT, 2017). En México, la producción de mango se distribuye en 23 estados; sin embargo, más del 97 % se concentra en solo 10 (Guerrero, Nayarit, Chiapas, Oaxaca, Sinaloa, Michoacán, Veracruz, Jalisco, Colima y Campeche). Cabe destacar que en México hubo un incremento importante (106 %) con respecto a la superficie total cultivada de este fruto durante el periodo de 2002 a 2008, siendo las principales variedades: Ataulfo, Haden, Keitt, Kent, Manila y Tommy Atkins, con un rendimiento promedio nacional de 10 t ha⁻¹.

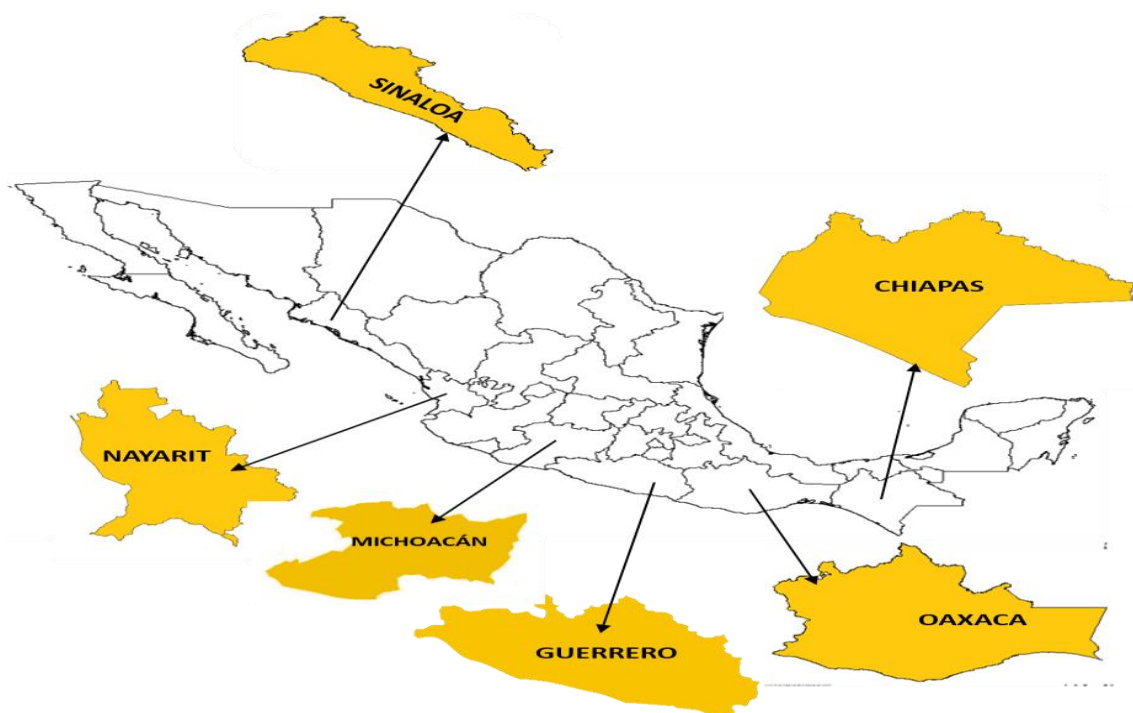


Fig. 1 Principales estados productores de mango en México en 2018. Elaboración propia con datos del SIAP, 2018.

2.3 Países productores y exportadores de mango

En 2018, los mayores productores de mango fueron la India, China, Tailandia, Pakistán y México, con producciones de 18.7, 4.7, 3.4, 2.1 y 2 millones de toneladas, respectivamente. Mientras que los principales países exportadores, en orden de importancia, fueron México, India y Brasil. México exportó casi el 20% de su producción (270 000 t) principalmente a EUA (FAOSTAT, 2017).

2.4 Manejo postcosecha del mango

El mango es afectado por diferentes enfermedades durante todas las etapas de su desarrollo, desde el cultivo hasta el manejo de los frutos después de la cosecha. Las enfermedades en campo provocan pérdidas económicas que se ven reflejadas en la postcosecha mientras que las enfermedades en la postcosecha están relacionadas con problemas para la exportación y comercialización en el mercado interno. Cualquier órgano de la planta es

susceptible a ser infectado, ramas, tallos, raíces, hojas, flores y frutos son afectados por varias enfermedades que se manifiestan con síntomas de pudrición, muerte descendente, tizón, necrosis, roña, cenicilla, mancha foliar, marchitez, crancos y malformaciones. Estas enfermedades pueden ser la limitante para la producción del cultivo del mango (Prakash, 2004). Aunque existen otros patógenos como algas y bacterias, la mayor parte de las enfermedades son causadas por hongos (Ploetz, 2003).

2.5 Enfermedades causadas por hongos

Se ha reportado que existen varias enfermedades inducidas por hongos y oomicetes, las cuales causan síntomas severos, reducción de la calidad y afectan severamente durante el cultivo como después de la cosecha (Ploetz, 2003). Las enfermedades más comunes en precosecha son: antracnosis (*Colletotrichum* sp.), cenicilla (*Pseudoidium anacardii*), escoba de bruja o malformación (*Fusarium* sp.), muerte descendente (especies de *Botryosphaeriaceae*), roña (*Denticularia mangiferae*), mancha plateada (*Pestalotiopsis mangiferae*), marchitez (*Verticillium albo-atrum*), mancha negra (*Alternaria* sp.), tizón Negro (*Meliola* sp.), mancha foliar oval (*Phoma* sp.), pudrición de la raíz y marchitez de plántulas (*Rhizoctonia solani*). A nivel mundial, las enfermedades del mango más importantes en postcosecha son: antracnosis (*Colletotrichum* sp.), pudrición del pedúnculo (especies de *Botryosphaeriaceae*) y pudrición del fruto (*Alternaria* sp.) (Ploetz & Freeman, 2009; Ploetz, 2003; Prakash, 2004; Prusky, Kobilier, & Miyara-Alkan, 2009). Mientras que en México, las principales enfermedades son antracnosis, escoba de bruja, cenicilla y muerte descendente. A medida que las condiciones climáticas favorecen a los patógenos, el daño de éstas ocasionado al cultivo es mayor (Mora-Aguilera, Vega, & Téliz-Ortíz, 2011).

2.6 Importancia y distribución de la enfermedad de antracnosis

La antracnosis causada por *Colletotrichum* sp. es la enfermedad más importante del mango, en casi todas las áreas de producción de este frutal, debido a que ocasiona daños en todo el cultivo (hojas, ramas, panículas y frutos) (Arauz, 2000; Paull & Duarte, 2011; Ploetz & Freeman, 2009; Ploetz, 2003; Sefu *et al.*, 2015). Sí la inflorescencia es infectada, la producción se reduce drásticamente. En los frutos inmaduros, la enfermedad se encuentra como infección quiescente y el daño que induce provoca pérdidas económicas significativas en la postcosecha (Prusky, Kobilier, Miyara, & Alkan, 2009). Además, la incidencia puede afectar al 100% de frutos cultivados en zonas con alta humedad, durante el periodo de floración, particularmente en huertos de mango con manejo deficiente (Arauz, 2000; Ploetz, & Freeman, 2009). La antracnosis del mango se encuentra en todos los lugares donde se cultiva el fruto en el mundo, pero su importancia no es la misma en cada país. En México, se distribuye en todos los estados productores de mango, causando daños significativos en la floración y postcosecha (Rojas-Martínez, Zavaleta-Mejía, Nieto-Angel, & Acosta-Ramos, 2008) causando en algunos casos pérdida total (Sefu *et al.*, 2015).

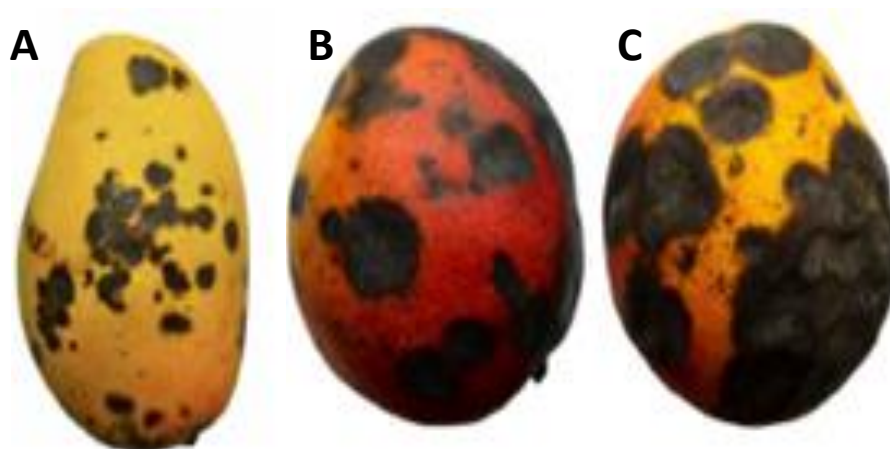


Fig. 2 Sintomas de antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en frutos de mango Manila (A) y Haden (B y C).

2.7 Agente causal de antracnosis

Históricamente la identificación de especies de *Colletotrichum* se había basado en el rango de hospedantes, síntomas de infección en determinados hospedantes, además de un conjunto de caracteres morfológicos (Hyde *et al.*, 2009a; Hyde *et al.*, 2009b). Investigaciones basadas únicamente en la identificación morfológica y cultural indicaron que las especies de *Colletotrichum* que se ha reportado infectan a mango son: *C. gloeosporioides* (Ploetz, 2003), *C. acatatum* (Taba, Takaesu, Ooshiro, Moromizato, & Takushi, 2004) y *C. boninense* (Afanador-Kafuri, Minz, Maymon, & Freeman, 2003). Sin embargo, utilizar caracteres taxonómicos convencionales en *Colletotrichum* resulta problemático, ya que se han tenido errores al identificar las diversas especies de este género de hongo fitopatógeno, por esta razón, las técnicas moleculares han sido utilizadas para inferir las relaciones evolutivas de las especies de *Colletotrichum* (Damm, Cannon, Woudenberg, & Crous, 2012; Hyde *et al.*, 2009a; Hyde *et al.*, 2009b; Rojas *et al.*, 2010). De acuerdo con investigaciones anteriores, la taxonomía de especies de *Colletotrichum* asociadas a tejidos de mango, se había clarificado utilizando análisis filogenéticos multilocus, en conjunto con caracterización fenotípica, donde se reporta a diferentes especies pertenecientes al complejo *gloeosporioides* (*C. asianum*, *C. gloeosporioides*, *C. tropicale*, *C. frutícola*, *C. dianesei*, *C. siamense*, *C. endomangiferae*) (Honger, Offei, Oduro, Odamtten, & Nyaku, 2014; Lima *et al.*, 2013; Phoulivong *et al.*, 2010; Udayanga, Manamgoda, Liu, Chukeatirote, & Hyde, 2013; Weir, Jonhston, & Damm, 2012).

En México, la antracnosis se había atribuido exclusivamente a *C. gloeosporioides* (Rojas-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, Honger *et al.* (2014) utilizaron análisis filogenético multilocus demostrando que *C. asianum* se encuentra asociado a la antracnosis en este país.

2.8 Tipos de control de antracnosis

2.8.1 Uso de cultivares tolerantes para el manejo de la antracnosis

Se ha reportado que todas las variedades comerciales de mango son susceptibles a ser infectadas por *Colletotrichum* sp. Sin embargo, algunas muestran cierto nivel de tolerancia (Dodd, Estrada, Matcham, & Jeffries, 1991). Las variedades Manila, Keitt y Tommy Atkins son tolerantes a la enfermedad, mientras que Haden es sensible y las variedades Ataulfo y Kent son muy sensibles (Dodd et al., 1991). La tolerancia de las variedades depende de las condiciones ambientales, debido a que varían de un lugar a otro (Ploetz, 2003; Prakash, 2004).

2.8.2 Control biológico

Los agentes de control biológico ofrecen la oportunidad de desarrollar métodos alternativos y económicos para aplicarse en la industria del mango a pequeña escala. Se ha reportado que algunas bacterias como, *Bacillus licheniformis* (Govender & Korsten, 2006), *Bacillus subtilis* (Senghor, Liang, & Ho, 2007), *Brevundimonas diminuta* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Kefialew & Ayalew, 2008) han mostrado resultados promisorios como agentes de control biológico. Además algunas levaduras como, *Candida membranifasciens* (Kefialew & Ayalew, 2008), *Rhodotorulaminuta* (Patiño-Vera et al., 2005) y *Debaryomyces nepalensis* (Zhou, Li, Zeng, & Shao, 2018) resultaron ser efectivas en tratamientos de frutos con antracnosis. A pesar de los resultados obtenidos, se requieren más investigaciones sobre los mecanismos de biocontrol que ejercen estos organismos y las implicaciones en la salud humana que conlleva su aplicación en frutos de mango.

2.8.3 Control químico

En los huertos de mango la aplicación de fungicidas se centra en reducir el daño por antracnosis en frutos e inflorescencias, mejorando el control de la

enfermedad cuando las aplicaciones se realizan antes de la floración, debido a que se elimina la fuente de inóculo presente en el follaje y en las ramas. La utilización de fungicidas ha sido el único método efectivo para el control de la antracnosis del mango, usándose con éxito en los países donde se cultiva este frutal. En los lugares, donde la fruta se desarrolla en condiciones favorables para la enfermedad, se han utilizado hasta 25 aplicaciones de fungicidas sistémicos y de contacto (Dodd, Estrada, Matcham, & Jeffries, 1991). Sin embargo, entre los países que importan mango, son pocos los fungicidas autorizados para su uso, por ello la utilización de éstos dependerá del destino final de la fruta (Arauz, 2000; Ploetz, 2003).

Entre los fungicidas de contacto, los ingredientes activos de clase de los ditiocarbamatos son eficaces para el control de la antracnosis, pero se encuentran restringidos en la mayoría de los países; mientras que los fungicidas a base de cobre se recomiendan ampliamente, pero su efectividad es menor (Arauz, 2000).

Para el control de antracnosis en mango entre los fungicidas con actividad sistémica se encuentran los ingredientes activos de la clase metil-benzimidazol-carbamatos (MBC), como son: benomil, carbendazim, tiofanatometil y tiabendazol. Particularmente el control de aislados de *Colletotrichum* sp. a partir de mango, se ha realizado de forma irregular en algunos huertos comerciales aplicando continuamente fungicidas MBC, como consecuencia de la expresión de resistencia por parte del patógeno, según lo reportado en EUA (Spalding, 1982), Tailandia (Farungsang & Farungsang, 1992; Nalumpang *et al.*, 2010), India (Kumar, Reddy, Reddy, & Devi, 2007) y China (Zhang *et al.*, 2013).

El precloraz es un fungicida DMI-Imidazol con actividad erradicante, se basa en la inhibición de la ruta de biosíntesis del ergosterol (Ma & Zhonghua, 2005). Este fungicida se ha empleado en combinación con agua caliente como tratamiento postcosecha en frutos de mango con destino a países de la Unión Europea (Prusky, Kobilier, Miyara, & Alkan, 2009). La frecuencia de las aplicaciones de precloraz depende de la incidencia de la enfermedad (Kuo, 2001), por ejemplo en Taiwán es de 1 a 6 por ciclo de cultivo.

2.9 Técnicas moleculares para la identificación de hongos

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que permite amplificar una determinada región del genoma de los seres vivos para facilitar su estudio (Botstein *et al.*, 1980). Actualmente esta técnica se utiliza en el área de micología molecular y sus aplicaciones para la detección, identificación y clasificación de hongos se incrementan día a día. Los RFLPs (polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción) y la secuenciación (determinación de la estructura primaria de los ácidos nucleicos) son utilizados en análisis molecular de regiones amplificadas (Pereira, 2008). Generalmente, la identificación de hongos se basaba en las características morfológicas y culturales de los patógenos, dificultando la separación de especies debido a que algunas de estas características morfológicas dependen de las condiciones ambientales, del hospedante y de la experiencia del investigador. Mientras que, las técnicas de identificación molecular no tienen este problema, ya que su objeto de estudio (el DNA) no depende de variaciones ambientales (De Priest, 1994).

La PCR permite la amplificación de ciertas regiones de DNA *in vitro* (bajo condiciones controladas) a partir de pequeñas cantidades de DNA del hongo (micelio). Los fragmentos de DNA amplificados pueden analizarse por técnicas moleculares y permitir establecer patrones únicos y estables, propios de cada organismo, y diferenciar organismos muy próximos entre sí. Además de que permiten deducir relaciones filogenéticas (Suzuki *et al.*, 1994).

2.10 Subproductos agroindustriales como fuente de compuestos bioactivos

En los últimos años, ha habido una preocupación mundial con respecto al uso de residuos agroindustriales, que se generan durante el procesamiento de materias primas en la industria alimentaria. La recolección insuficiente y la eliminación inadecuada de los desechos agroindustriales pueden causar problemas de

contaminación ambiental, generados principalmente por la degradación microbiana. El potencial de estos subproductos es de gran importancia debido a que contienen moléculas bioactivas, como las proteínas, carbohidratos, lípidos (ácidos grasos), compuestos fenólicos, alcaloides, saponinas, taninos, terpenoides, y esteroides. Los desechos agroindustriales, pueden servir como fuente de compuestos bioactivos para la producción innovadora de alimentos (Shyamala & Jamuna, 2010). Recientemente, la recuperación de estos compuestos bioactivos de los subproductos de la industria ha recibido una atención significativa, principalmente debido a sus posibles beneficios para la salud humana y a que son económicos y están disponibles en grandes cantidades (Reque *et al.*, 2014; Vodnar *et al.*, 2017).

Los residuos de frutas y verduras, como cáscaras, semillas y pulpa, en su mayoría, son generadas en las diferentes etapas de las cadenas de procesamiento y contienen diversos compuestos bioactivos que imparten beneficios para la salud más allá de la nutrición básica (Oomah & Mazza, 2000). Gran parte de los desechos son, las cáscaras de manzana, cáscaras de cítricos, pulpa de zanahoria, cáscaras y semillas de uva blanca y roja, cáscaras y pulpa de remolacha roja, cáscaras y semillas de mango, cáscaras de papa y orujo de oliva (Goldsmith, Vuong, Stathopoulos, Roach, & Scarlett, 2018; Kowalska, Czajkowska, Cichowska, & Lenart, 2017; Leanpolchareanchai, Padois, Falson, Bavovada, & Pithayanukul, 2014; Nipornram, Tochampa, Rattanatraiwong, & Singanusong, 2018; Riciputi *et al.*, 2018).

Se ha informado que la cáscara de manzana, además de su capacidad para inhibir la oxidación de los lípidos, tiene fitoquímicos que exhiben propiedades cardioprotectoras y anticancerígenas (Knekt *et al.*, 2002). Estas propiedades de las cáscaras de manzana están correlacionadas con la presencia de flavonoles, antocianinas, ácidos fenólicos (Boyer & Liu, 2004). Otros resultados anteriores han indicado que aproximadamente el 80% de los polifenoles se concentran en la cáscara de manzana (Leccese, Bartolini, & Viti, 2009), cuya capacidad antioxidante total es de cinco a seis veces mayor que la de la pulpa de manzana.

Además, la cáscara también posee flavonoides únicos, como los glucósidos de quercetina, que no se encuentran en la pulpa (Rupasinghe & Kean, 2008). Otro subproducto importante es la pulpa de zanahoria, que se ha informado tiene altas cantidades de compuestos fenólicos y fibra dietética, que le dan algunas características físicas a la zanahoria. Por ejemplo, las antocianinas y los carotenoides son responsables del color, aroma y amargor de las zanahorias (Gonçalves, Pinheiro, Abreu, Brandao, & Silva, 2010). Además, sus ácidos fenólicos tienen un fuerte potencial antioxidante, y se ha demostrado que las antocianinas reducen las enfermedades cardiovasculares al disminuir la oxidación de los lípidos (Arscott & Tanumihardjo, 2010). Se ha informado que la capacidad antioxidante de las frutas se correlaciona con su contenido fenólico total y su composición (Corral-Aguayo, Yahia, Carrilo-Lopez, & Gonzalez-Aguilar, 2008).

2.10.1 Las semillas de mango como subproducto agroindustrial

El mango (*Mangifera indica* L.) perteneciente a la familia de Anacardiaceae, es una de las frutas tropicales más importantes consumidas y comercializadas en forma fresca o procesada a nivel mundial (FAOSTAT, 2017). En el procesamiento industrial de este fruto para la elaboración de productos como puré, jugo y néctar se generan anualmente más de un millón de toneladas de semillas de mango como residuo (Leanpolchareanchai *et al.*, 2014), representando ello un problema importante de contaminación ambiental y eliminación de residuos (Dorta, Lobo, & González, 2012), por lo que existe la posibilidad de aprovechar este desecho agroindustrial y conferirle valor agregado (Serna-Cock, García-Gonzales, & Torres-León, 2016). La semilla representa aproximadamente del 20 al 60 % del peso total del fruto entero y el núcleo o almendra constituye más de la mitad de la semilla (45 a 78%) (Jyotshna, Srivastava, Killadi, & Shanker, 2015)(Fig.3). Esta almendra puede emplearse para la obtención de harina, a partir de la cual se obtienen extractos ricos en compuestos fenólicos. (Fig.4).

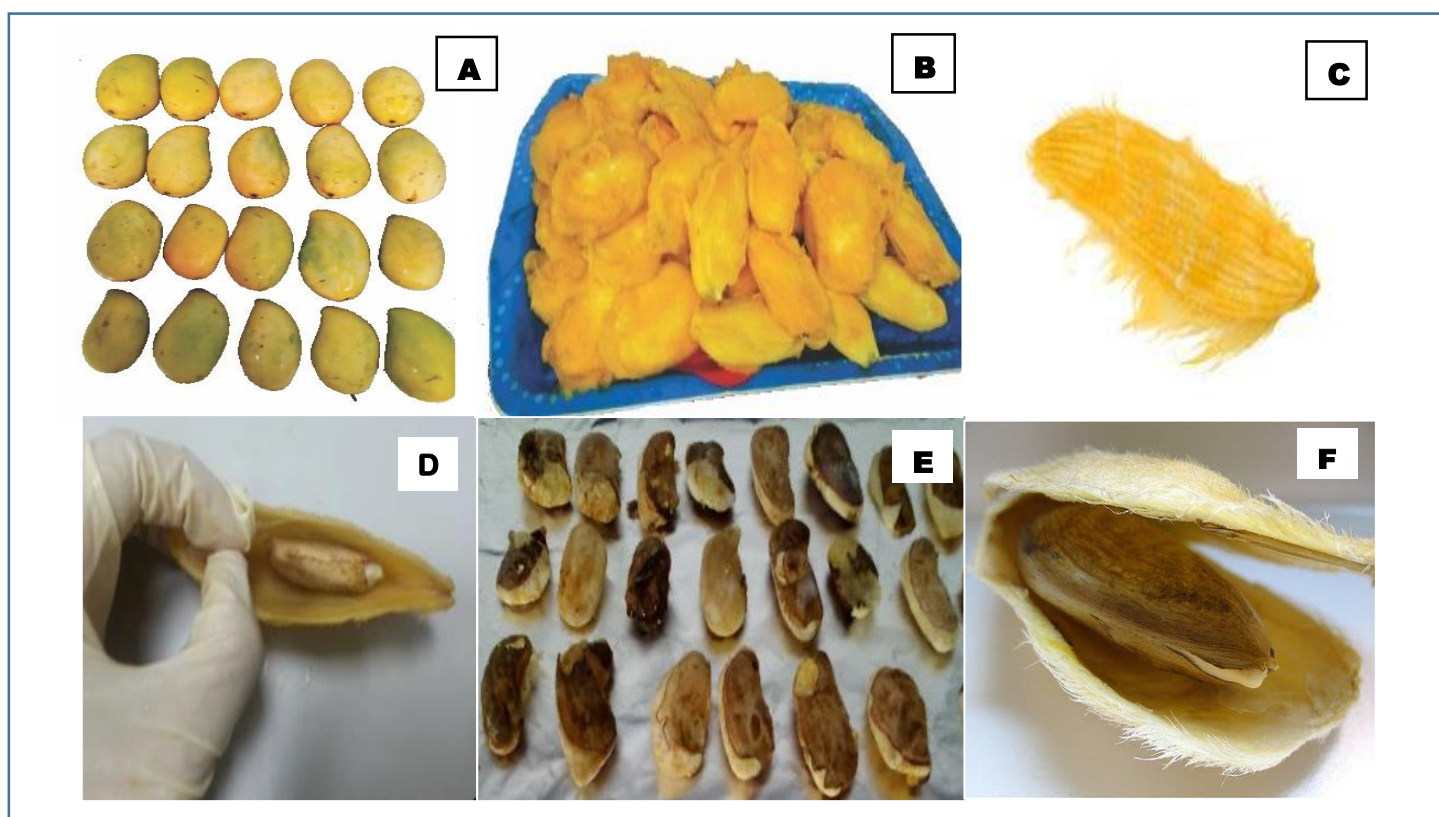


Fig. 3. Frutos (A), semillas (B y C) y almendra (D, E y F) de mango Manila.



Fig. 4. Harina (A) y extracto (B) obtenidos a partir de la almendra de mango Manila.

2.10.2 Composición química de las semillas de mango

Macronutrientes

Ha sido bien documentado que las frutas de mango son una fuente importante de micronutrientes, vitaminas y otros fitoquímicos. Los mangos proporcionan energía, fibra dietética, carbohidratos, proteínas, grasas y compuestos fenólicos (Tharanathan *et al.*, 2006), que son vitales al crecimiento humano normal, desarrollo y salud. Cada parte de un árbol de mango, como sus hojas, flores, corteza, fruta, pulpa, cáscara y las semillas contienen nutrientes esenciales que pueden ser utilizados.

Se ha reportado la composición química proximal de las almendras de mango, las cuales dependiendo de la variedad, contienen en promedio en peso seco 6% de proteína, 11% de grasa, 77% de carbohidratos, 2% de fibra cruda y 2% de cenizas (Mirghani, Kabbashi, Vejayam, & Yosuf, 2009). Mutua, Imathiu, & Owino, (2017) informaron para las variedades Apple, Sabine, Kent y Ngowe contenidos porcentuales de proteína, grasa, carbohidratos, fibra cruda y cenizas de 6.74 a 9.20, 9.84 a 13.08, 72.86 a 75.92, 3.10 a 3.71 y 1.78 a 2.89, respectivamente.

La grasa de semilla de mango ha sido objeto de estudios debido a su composición y características fisicoquímicas, las cuales son similares a las de la manteca de cacao (Jahurul *et al.*, 2015; Muchiri, Mahungu, & Gituanja, 2012). Con base en lo anterior, la grasa de semilla de mango es una de las seis grasas tropicales permitidas que pueden reemplazar parcialmente el aceite de cacao en la elaboración de chocolate. Su perfil de lípidos le hace tener un potencial de comercialización importante (Jahurul *et al.*, 2015). Las grasas de mango son una fuente rica de ácidos palmítico (C16: 0), esteárico (C18: 0), oleico (C18: 1) y linoleico (C18: 2). Los ácidos esteárico y oleico son los ácidos grasos dominantes. Además de estos ácidos grasos, los ácidos alquídico, behénico, lignocérico y linolénico se encuentran presentes en menor cantidad en la grasa de almendra de mango. Se ha informado que los componentes de la grasa de la almendra de mango varían considerablemente dependiendo de la variedad (Jahurul *et al.*, 2015; Muchiri, Mahungu, & Gituanja, 2012).

El contenido de proteína de las almendras de mango es bajo en comparación con el trigo, el maíz y la cebada. Aunque la almendra de mango contiene una pequeña cantidad de proteína cruda (6.7% en base seca), la calidad de la proteína es alta porque es rica en todos los aminoácidos esenciales. Entre estos, la leucina y arginina son los aminoácidos dominantes, seguidos de valina, histidina, lisina, isoleucina, treonina y fenilalanina. Mientras que metionina y triptófano son los aminoácidos encontrados en menor cantidad (Abdalla et al., 2007; Arogba, 1997). Diferentes estudios han indicado que la composición de aminoácidos de las almendras de semilla de mango también depende de la variedad de mango (Abdalla et al., 2007; Jahurul et al., 2015).

Micronutrientes

Varios estudios han demostrado que el contenido mineral en la almendra de mango no es alto (Leterme, Buldgen, Estrada, & Londono, 2006) y, por lo tanto, la almendra no se considera una buena fuente dietética de estos nutrientes. En contraste, la fibra de la cáscara de mango (variedad Haden) presentó un alto contenido de algunos minerales que son importantes para la nutrición humana, incluido el calcio (4445 mg/kg), potasio (2910 mg/kg), magnesio (950 mg/kg), hierro (175 mg/kg) y zinc (32.5 mg/kg) (Larrauri, Rupap, Borroto, Sauraerez, & Calixto, 1996).

Compuestos bioactivos

Las frutas de mango y otras partes de la planta son una fuente de compuestos bioactivos con potencial actividad promotora de la salud. Investigaciones recientes han informado que los subproductos del mango, como las cáscaras y las semillas, contienen altos contenidos de diversas sustancias que mejoran la salud, como compuestos fenólicos, carotenoides, vitamina C y fibra dietética (Ajila, Naidu, Bhat, & Rao, 2007; Sogi, Siddiq, Greiby, & Dolan, 2013). La almendra (embrión) de la semilla de mango, es un residuo biológico con alto contenido de compuestos bioactivos, especialmente compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, galotaninos y ellagitaninos) (Dorta et al., 2014). Diversos autores como Sai-Ut, Benjakul, Kraithong y Rawdkuen (2015) han

reportado contenidos de fenoles totales en semillas de mango Dokmai y Tong-Dam de 15.3 a 266 (GAE/100 g de muestra seca); mientras que Dorta *et al.* (2012) informaron para mango ‘Keitt’ deshidratado de 3 500 a 7 400 (GAE/ 100 g de muestra seca) y Hung (2010) para mango “Tommy Atkins” de 10 749 a 20 005 (GAE/100 g de muestra seca) (Cuadro 1). Por lo tanto, la almendra de mango constituye una fuente potencial de antioxidantes naturales que pueden ser utilizados para la elaboración de productos funcionales y favorecer la salud de quien los consume (Torres-León *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en extractos de almendra de mango de diferentes variedades.

Variedad	Fenoles Totales (mg EAG/g)	Actividad antioxidante (μ Mol ET/g)		Referencia
		DPPH	ABTS	
Cultivar Hindi (Egypt)	174 -177.58	-	-	Abdel-Aty <i>et al.</i> ,2018
Ataulfo(Mexico)	23.9-399	990-4094	1923-14615	Torres-León <i>et al.</i> ,2017
Keitt, sensacion y Gomera	283.3-447.6	-	-	Dorta <i>et al.</i> ,2014
Tommy Atkins	112.2-200.3	1310-1800	1110.1-1724.0	Sogi <i>et al.</i> ,2013
Keitt, Gomera	40-120	311-1300	343.6-1278.5	Dorta <i>et al.</i> ,2012
Chok-Anan (Tailandia)	44.5-89.9	-	440-1030	Maisuthisakul y Gordon,2009
Haden, Tommy Atkins, Ubá y Palmer (Brasil)	82.5	-	-	Ribeiro <i>et al.</i> ,2008
Sin especificar (Singapur)	-	-	575-1496	Soong y Barlow,2006

Fuente: Elaboración propia

Las almendras contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos extraíbles, y hay diferencias varietales en su contenido (Ribeiro, Barbosa, Queiroz, Knödler, & Schieber, 2008). Se ha descrito un amplio patrón de compuestos fenólicos en las almendras (Ribeiro & Schieber, 2010). En particular, se han identificado y cuantificado los flavonoles y las xantonas (Barreto *et al.*, 2008). La quercetina, kaempferol y ramnetina se encuentran como O-glucósidos, mientras que la mangiferina es un C-glucósido que está presente tanto en su forma no esterificada como conjugada con ácido gálico.

La quercetina y el kaempferol pertenecen a la clase de flavonoides y han recibido gran atención como compuestos bioactivos durante mucho tiempo. Diversas actividades biológicas, incluidos los efectos antibacterianos, antitrombóticos, vasodilatadores, antiinflamatorios y anticancerígenos mediados por diferentes mecanismos, se asocian con los flavonoides (Middleton, 2000). La mangiferina, una xantona presente en el mango, la cual al aplicarse en una dosis de 100 mg/kg/día a ratas sometidas a periodontitis experimental, demostró propiedades antiinflamatorias, acelerando el proceso de curación de tejidos lesionados (Carvalho *et al.*, 2009).

Existen diferencias en el perfil fenólico dependiendo de la variedad (Cuadro 2), contenido de flavonoles y xantonas en mangos originarios de varios países (Berardini *et al.*, 2005). Los compuestos fenólicos son los principales componentes antioxidantes con mayor variación en el mango, ya que son metabolitos secundarios de las plantas y sus contenidos difieren no solo por las características genéticas y la etapa de madurez, sino también por las prácticas agrícolas (Ribeiro & Schieber, 2010).

Cuadro 2. Compuestos fenólicos presentes en almendra de mango (*Mangifera Indica* L.) de diferentes variedades, determinados por HPLC-DAD y expresados en mg/100 g base seca.

Compuesto encontrado	Cantidad mg /100 g	Variedad	Referencia
Hesperidina	3000 ± 112	Hindi	Abdel-Aty <i>et al.</i> ,2018
Ácido Cinámico	1200 ± 52		
Ácido Tánico	987 ± 44		
Ácido Gálico	156 ± 7.8		
Ácido Protocateico	21 ± 2.0		
Catequina	15 ± 1.5		
Ácido p-coumarico	12.5 ± 1.0		
Ácido Clorogénico	8.5 ± 0.82	Keiit, Sensación y Gomera	López Cobo <i>et al.</i> , 2017
Ácido Quínico	62.5-67.51		
Ácido Cítrico	59.77-75.15		
Ácido Gálico	13.24-26.08		
Metil Galato	94.43-271.19		
Catequina	10.91-25.37		
Mangiferina	22.48-72.75	Waterlily	Abdullah <i>et al.</i> ,2015
Ácido Gálico	111 ± 0.04		
Epicatequina	267 ± 0.16		
Acido p-coumarico	243 ± 0.13		
Mangiferina	177 ± 0.05		
Rutina	249 ± 0.08		
Ácido Clorogénico	1366 ± 0.05		
4- Hidroxibenzoico	121 ± 0.03		
Ácido Sirínico	52 ± 0.01		
Miricetina	198 ± 0.06		
Quercetina	75 ± 0.01		
Apigenina	321 ± 0.81		

Fuente: Elaboración propia. HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta resolución, usando un detector con Arreglo de Diodos.

En adición se ha informado que el extracto metanólico de la semilla de mango presenta actividad antimicrobiana contra patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus* y *Shigella dysenteriae*; esta última asociada con enfermedades gastrointestinales (Abdalla *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2010; Rajan, Thirunalasundari, & Jeeva, 2011).

2.11 Antioxidantes

Los antioxidantes pueden definirse como sustancias que, cuando están presentes en los alimentos, retrasan, controlan o inhiben la oxidación y el deterioro de la calidad de los alimentos (Shahidi, 2015). También son compuestos o sistemas que pueden interactuar de manera segura con los radicales libres y terminar la reacción en cadena antes de que se dañen las moléculas vitales. Pueden usar varios mecanismos: (i) eliminar especies que inician la peroxidación, (ii) quelar iones metálicos para que no puedan generar especies reactivas o descomponer peróxidos, (iii) inactivar *O_2 - prevenir la formación de peróxidos, (iv) romper la reacción en cadena autooxidativa y/o (v) reducir las concentraciones localizadas de O_2 (Asimi, Sahu, & Pal, 2013). En el cuerpo los antioxidantes reducen el riesgo de enfermedades degenerativas derivadas del estrés oxidativo (Shahidi, 2015). Los antioxidantes (p. Ej., flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, vitamina C, vitamina E) presentan diversas propiedades biológicas, como efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y antiateroscleróticos, reducen la incidencia de enfermedades coronarias y contribuyen al mantenimiento de la salud intestinal modulando el equilibrio microbiano intestinal (Cardona, Andrés-Lacueva, Tulipani, Tinahones, & Queipo-Ortuño, 2013; Toro-Funes *et al.*, 2012).

Los antioxidantes sintéticos como el hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), y la tertbutilhidroquinona (TBHQ) se han utilizado como antioxidantes primarios para detener los radicales libres y controlar la oxidación y el desarrollo del mal sabor. Sin embargo, en los últimos años el interés de estudiar los antioxidantes naturales se ha incrementado, debido a la toxicidad y los efectos cancerígenos de algunos antioxidantes sintéticos en animales,

cuando son usados en altas concentraciones. De tal modo que, el número de publicaciones sobre compuestos fenólicos alimentarios, que se consideran antioxidantes potenciales, ha aumentado dramáticamente en los últimos 20 años.

Los compuestos fenólicos y polifenólicos son metabolitos secundarios que se producen en las plantas a través de la vía del ácido shikímico. Los precursores de los compuestos fenólicos son la fenilalanina y, en menor medida, la tirosina. La eliminación de una molécula de amoníaco de estos aminoácidos se produce a través de la acción de la fenilalanina amoniaco liasa (PAL) o la tirosina amoniaco liasa (TAL), respectivamente (Ahmed *et al.*, 2015). La pérdida de un resto de dos carbonos de la última clase de compuestos conduce a la formación de la familia del ácido hidroxibenzoico de los compuestos fenólicos alimentarios que son dominantes en los cereales, granos y legumbres. Además, los fenilpropanoides pueden reaccionar con tres moléculas de malonil coenzima A para producir chalcones que posteriormente pueden ciclarse para proporcionar diferentes subclases de flavonoides (Ahmed *et al.*, 2015). La condensación de compuestos fenólicos puede conducir a la formación de taninos, tanto hidrolizables como condensados (no hidrolizables). (Oroian & Escriche, 2015).

2.11.1 Clasificación de antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser primarios o secundarios. Los antioxidantes primarios son aquellos que neutralizan los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno (transferencia de átomos de hidrógeno o HAT) o mediante un mecanismo de transferencia de electrones (ET). Mientras tanto, los antioxidantes secundarios son aquellos que neutralizan los catalizadores prooxidantes. Estos incluyen quelantes de iones metálicos prooxidantes (por ejemplo, hierro y cobre), ejemplificados por ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido cítrico (CA) o desactivan especies reactivas como oxígeno singlete (por ejemplo, betacaroteno) (Shahidi, 2015).

Los antioxidantes abarcan diferentes clases de compuestos que pueden interferir con los ciclos oxidativos para inhibir o retrasar el daño oxidativo de las

biomoléculas. Las principales clases de compuestos con actividad antioxidante son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos). (Oroian & Escriche, 2015).

2.11.2 Vitaminas

Vitamina C

Se cree que la Vitamina C es el antioxidante hidrófilo más importante y que es eficaz para eliminar aniones radicales superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, especies reactivas de nitrógeno y oxígeno singlete. También puede actuar como un eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibe la oxidación, sin embargo, a niveles bajos, la vitamina C puede catalizar la oxidación (Ahn,Grün, & Mustapha, 2007). A nivel estructural, la vitamina C tiene 4 grupos -OH que pueden donar hidrógeno a un sistema oxidante (Brewer, 2011).

Vitamina E

El término vitamina E se refiere a un grupo de compuestos químicos (tocoferoles y tocotrienoles). La vitamina E es generalmente aceptada como el antioxidante liposoluble primario en humanos y actúa como antioxidante a través de dos mecanismos primarios: (i) donador y (ii) aceptor de electrones. (Oroian & Escriche, 2015).

Carotenoides

Al menos 60 carotenoides se producen en frutas y verduras consumidas por humanos. Los principales carotenoides presentes en la dieta diaria son: α -, β -caroteno y licopeno (como carotenos) y los hidroxicarotenoides (xantofilas: zeaxantina y luteína). Los carotenoides son importantes no solo por su actividad de provitamina A, sino también por un espectro de otras acciones en los sistemas biológicos. Al igual que los tocoferoles (Nowicka & Kruk, 2012), los carotenos y las xantofilas son inhibidores efectivos del oxígeno (singlete) (Ramel *et al.*, 2012) y secuestradores de radicales libres (especies reactivas de oxígeno).

Polifenoles

Los compuestos polifenólicos se encuentran en todos los órganos de las plantas y son, por lo tanto, una parte integral de la dieta humana. Se han reportado más de 8000 estructuras fenólicas y están ampliamente dispersas en todo el reino vegetal; muchas de ellas en los alimentos. Los compuestos fenólicos van desde compuestos simples, de bajo peso molecular, de un solo anillo aromático hasta los taninos complejos grandes y los polifenoles derivados (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009) Se sintetizan por las rutas shikimico, policétido y mevalonato o rutas mixtas, que producen la gran variedad de fenoles vegetales. En la última parte del siglo XX, el interés por los compuestos fenólicos alimentarios ha aumentado debido a sus capacidades antioxidantes y de eliminación de radicales libres (Shahidi, 2015), antiinflamatorias, modulación de la transducción de señales, actividades antimicrobianas y antiproliferación. Los principales grupos de polifenoles son flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos (Ahmed *et al.*, 2015).

Flavonoides

Los flavonoides, muchos de los cuales son pigmentos vegetales, son abundantes en la naturaleza (Majer, Neugart, Krumbein, Schreiner, & Hideg, 2014). Los flavonoides se pueden dividir en varias subclases, de las cuales las más representativas son: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanoles (también llamados flavan-3-ols o catequinas), antocianidinas e isoflavonas (Zibera, Fornasaro, Čvorović, Tramer, & Passamonti, 2014). La estructura general de los flavonoides incluye un esqueleto C₁₅ (C₆ – C₃ – C₆).

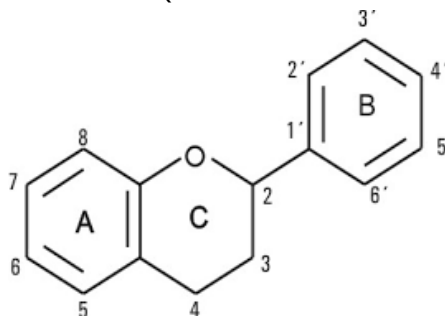


Fig.5. Estructura química de un Flavonoide.

Ácidos fenólicos: se pueden dividir en dos categorías según su estructura: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Estos compuestos consisten en un anillo de benceno unido a un grupo carboxílico (ácidos benzoicos) o a un ácido propenoico (ácidos cinámicos). En muchas frutas y verduras, los ácidos cinámicos (especialmente el ácido cafeico) están presentes como derivados de éster (ácido clorogénico, otros ácidos cinnamoil quínicos, glucósidos feniletanoicos) que muestran un alto potencial como antioxidantes (Sova, 2012). Los ácidos hidroxibenzoicos incluyen al ácido gálico, p-hidroxibenzoico, protocatechuico, vanílico y siringico (Fig. 6). Los ácidos hidroxicinámicos más importantes son el ácido cafeico, ferúlico y p-cumarico (Abramovič, 2015) (Fig. 6).

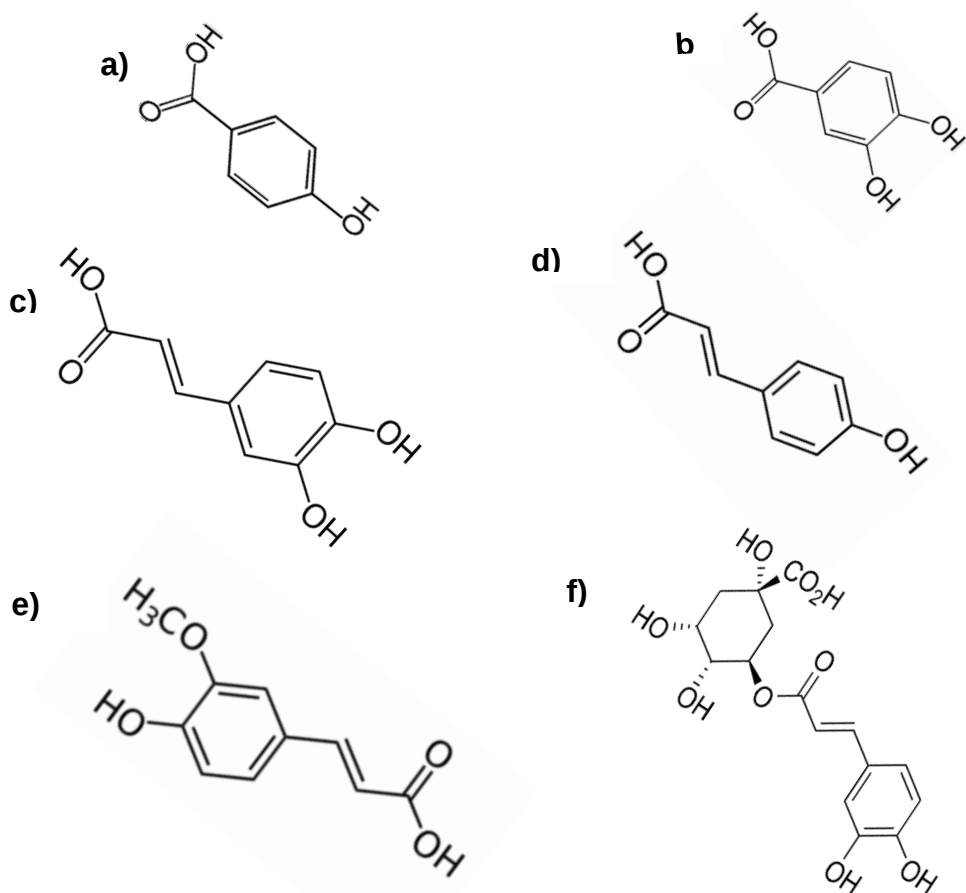


Fig.6 Ácidos fenólicos, p-hidroxibenzoico (a), 3-4 dihidroxibenzoico (b), ácido caféico (c), ácido p-coumárcio(d), ácido ferúlico (e) y clorogénico (f).

Taninos: poseen una masa molecular de hasta 30,000 Da, son producidos por las plantas como metabolitos secundarios (Saric *et al.*, 2015). Según su estructura, los taninos se pueden dividir ampliamente en dos clases de macromoléculas, denominados taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables tienen una masa molecular que oscila entre 500 y 5000 Da (Arapitsas, 2012). Además de su carácter astringente, tienen una importante actividad antioxidante (Figueroa-Espinoza, Zafimahova, Alvarado, Dubreucq, & Poncet-Legrand, 2015; Hosu, Cristea, & Cimpoiu, 2014). Mientras que, los taninos condensados o las proantocianidinas son polímeros de alto peso molecular hasta 30000 Da. La forma monomérica es un flavan-3-ol (catequina, epicatequina, etc.), con un flavan-3, 4-diol o aleucoantocianidina molécula como su precursor.

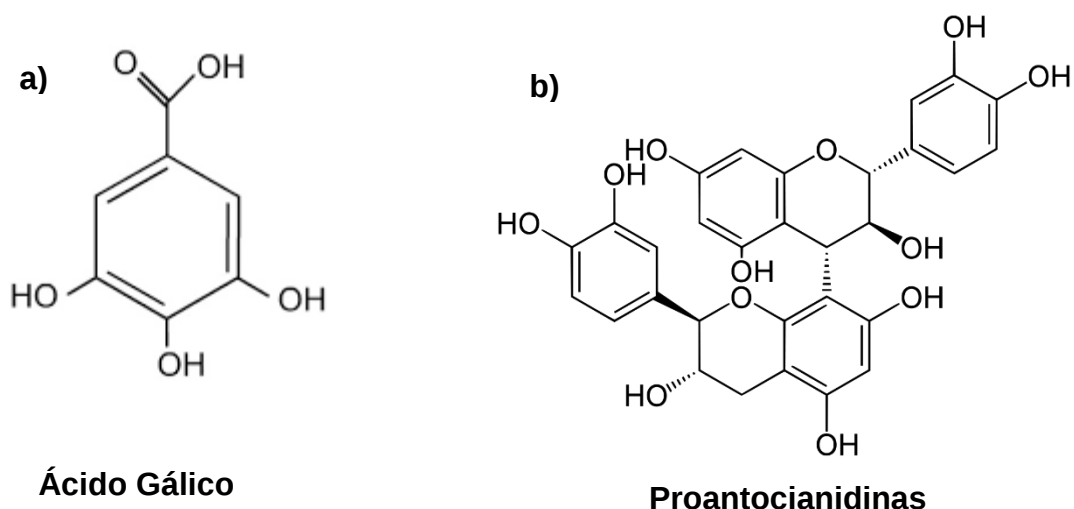


Fig.7. Estructura química de taninos hidrolizables (a) y condensados (b).

2.12 Los antioxidantes y el estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre oxidantes y reductores (antioxidantes) a nivel celular o individual (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Este estado es originado por la producción de especies reactivas en organismos vivos

en concentraciones altas, estas especies se generan como resultado de reacciones endógenas, como la cadena respiratoria, y por la exposición a agentes físicos y químicos como la radiación UV y los contaminantes del aire. Con la formación de especies reactivas, pueden afectarse las moléculas vitales (lípidos, ADN y proteínas) y algunos procesos, provocando daño oxidativo, que consiste en la modificación oxidativa de macromoléculas celulares, muerte celular por apoptosis y daño estructural del tejido. (Shahidi, 2015).

Los organismos vivos poseen un complejo sistema de protección, que se activa para prevenir el daño oxidativo. En este proceso de defensa, los agentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos promueven el equilibrio oxidativo al reducir la concentración de especies reactivas (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007). Sin embargo, este sistema de defensa puede verse afectado por la generación constante de especies reactivas, por lo que se requiere protección adicional para equilibrar el estado oxidativo. La red antioxidante es el primer nivel de defensa, en la cual los antioxidantes son capaces de donar electrones a oxidantes y hacerlos menos reactivos e inofensivos para las macromoléculas celulares (Lykkesfeldt *et al.*, 2003).

2.13 Factores que afectan la extracción de compuestos fenólicos

Los principales factores que afectan la separación de compuestos bioactivos de residuos agroindustriales y que determinan la cantidad, el tipo y calidad de estos compuestos son: el tipo y composición de disolventes, métodos de extracción, pH, relación sólido/disolvente y la temperatura (Oroian & Escriche, 2015).

La extracción con disolvente consiste en separar un componente deseado (solute) del material sólido. El disolvente utilizado en este proceso, debe tener alta capacidad para que el soluto se separe en él, debe ser selectivo, disolver el componente específico en gran medida y tener una capacidad mínima para los otros componentes. Además, debe ser químicamente estable (sin reacciones irreversibles con los componentes en contacto) y debe tener baja viscosidad para facilitar el bombeo y el transporte (Fanali *et al.*, 2018).

Entre los disolventes más utilizados para la extracción de antioxidantes se encuentran el etanol y el agua, debido a que son seguros (no tóxicos), no contaminan al medio ambiente, son baratos y pueden utilizarse en la industria alimentaria. Por esta razón, también se les conoce como disolventes verdes (Chew *et al.*, 2011).

La extracción de compuestos fenólicos con diferentes concentraciones de etanol acuoso ofrecen muchas ventajas como la recuperación de compuestos hidrofílicos y lipofílicos al mismo tiempo en diferentes proporciones, lo que favorece interacciones sinérgicas dentro del medio (McDonald, Prenzler, Antonolovich, & Robards, 2001).

La extracción de compuestos fenólicos basada en el principio de extracción sólido/líquido permite que el componente soluble del material sólido sea separado por un disolvente o una mezcla de ellos (Sai-Ut *et al.*, 2015). Este proceso involucra el transporte del disolvente a la matriz (transporte interno), la liberación de los solutos y la liberación de solutos de una matriz sólida a la fase global del disolvente (transporte externo) (Oroian & Escriche, 2015). En la extracción de compuestos fenólicos, uno de los aspectos más importantes es la relación material/disolvente, debido a que el disolvente debe proporcionar una gran superficie de intercambio para facilitar la extracción de los componentes solubles. En general, cuanto más disolvente se use, mayor será la solubilidad de los materiales sólidos (Candrawinata, Golding, Roach, & Stathopoulos, 2014).

La temperatura del disolvente también influye en la extracción de compuestos fenólicos, un incremento en este factor, aumenta la velocidad de separación de los solutos en el disolvente, ya que el coeficiente de difusión es mayor y se favorece la extracción (Rodríguez-Rojo *et al.*, 2012). Sin embargo, en la extracción de antioxidantes uno de los principales problemas es su preservación, ya que al incrementar la temperatura hay una reducción importante en el contenido de fenoles totales. Por lo tanto, la extracción usando altas temperaturas requiere tiempos relativamente cortos (máximo 15 min) (Candrawinata, Golding, Roach, & Stathopoulos, 2014).

Actualmente, se ha estudiado el uso de tecnologías emergentes, como el ultrasonido, para incrementar la extracción de compuestos fenólicos sin el uso de temperaturas elevadas (Ramic *et al.*, 2015; Ye y Liu, 2015; Prakash *et al.*, 2013). El método de extracción asistida por ultrasonido, es una tecnología en la cual los generadores de ultrasonido transforman la energía eléctrica en energía ultrasónica, que es energía mecánica. El efecto mecánico del ultrasonido proporciona mayor penetración del disolvente en los materiales celulares, mejora la transferencia de masa utilizando menor cantidad de disolvente y menos tiempo de extracción, aumentando así la liberación de compuestos extraíbles (Nipornram, Tochampa, Rattanatraiwong, & Singanusong, 2018; Chemat, Zill, & Khan, 2011) y garantizando una mayor actividad biológica del extracto obtenido (Espinosa-Muñoz *et al.*, 2015), en comparación con las técnicas de extracción tradicionales.

La extracción asistida por ultrasonido se ha usado para mejorar la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos de diversos materiales vegetales, debido a que favorece el proceso de extracción, es un método fácil de operar, puede emplearse como complemento de procesos ya existentes y ser una aplicación alternativa al uso de solventes nocivos para la salud (Hartonen & Riekkola, 2017).

2.14 Literatura citada

- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., & El-Hamahmy, R. M. (2007). Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103(4), 1141–1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.026>
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., & Freeman, S. (2003). Characterization of Colletotrichum isolates tamarillo, pasiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopatology*, 93, 579–587.
- Ahn, J., Grün, I. U., & Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24(1), 7–14.
- Ajila, C. M., Naidu, K. A., Bhat, S. G., & Rao, U. J. S. P. (2007). Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105(3), 982–988. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.052>
- Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose: Economic Impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, 84(6), 600–611.
- Arogba, S. S. (1997). Physical, chemical and functional properties of Nigerian mango (*Mangifera indica*) kernel and its processed flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 321–328.
- Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., De Brito, E. S., Pfundstein, B., Wurtele, G., Bertold, S., & Owen, R. W. (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5599–5610. <https://doi.org/10.1021/jf800738r>
- Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1563–1570.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3, 5.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247. <https://doi.org/10.16194/j.cnki.31-1059/g4.2011.07.016>

- Candrawinata, V. I., Golding, J. B., Roach, P. D., & Stathopoulos, C. E. (2014). Total phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extract: effect of time, temperature and water to pomace ratio. *International Food Research Journal*, 21(6), 2337-2344.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422.
- Carvalho, R. R., Pellizon, C. H., Justulin, L., Jr., Felisbino, S. L., Vilegas, W., Bruni, F., Lopes-Ferreira, M., & Hiruma-Lima, C. A. (2009). Effect of mangiferin on the development of periodontal disease: Involvement of lipoxin A4, anti-chemotactic action in leucocyte rolling. *Chemico-Biological Interactions*, 179, 344–350.
- Chan, C., & Hung, C. (2014). Lycopene and retinal pigment epithelial cells: Molecular aspects. *Handbook of Nutrition, Diet and Eye*. Academic Press. Londres, RU. pp. 587–598.
- Chemat, F., Zill, E. H., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonic Sonochemistry*, 18,813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Condon, K. N., Lemenager, R. P., Claeys, M. C., Lipkie, T. E., & Schoonmaker, J. P. (2014). Supplemental β -carotene I: Effect on plasma vitamin A, growth, performance, and carcass characteristics of feedlot cattle. *Meat Science*, 98(4), 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M., Carrilo-Lopez, A., & Gonzalez-Aguilar, G. (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498–10504.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043.
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M., & Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 571-578.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- De Priest, P.T. (1994).- Variation in the *Cladonia chlorophaea* Complex 11: Ribosomal DNA variation in a Southern Appalachian Population. *The Bryologist*. 97 (2),96-126.

- Dodd, J. C., Estrada, A.B., Matcham, J., & Jeffries, P., J. M. J. (1991). The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathology*, 40, 568–575.
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., & de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.012>
- Dorta, E., Lobo, M. G., & González, M. (2012). Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.016>
- FAOSTAT, (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (accessed 15.06.18.).
- Fanali, Ch., Tripodo, G., Russo, M., Posta, S.D., Pasqualetti, V., & De gara, L. (2018). Effect of solvent on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of hazelnut kerne.Electrophoresis. *Foodomics and Advanced Food Analysis*. 39(13),1683-1691. <https://doi.org/10.1002/elps.201800014>
- Farungsang, U., and Farungsang, N. (1992). Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. Associated with rambutan and mango fruit rot in Thailand. *Acta Horticulture*, 321,891–897.<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.321.113>
- Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J. (2018). Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.065>
- Gonçalves, E. M., Pinheiro, J., Abreu, M., Brandao, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2010). Carrot (*Daucus carota* L.) peroxidase inactivation, phenolic content and physical changes kinetics due to blanching. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 574–581.
- Govender, V., & Korsten, L. (2006). Evaluation of different formulations of *Bacillus licheniformis* in mango pack house trials. *Biological Control*, 37(2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.012>
- Hartonen, K., & Riekkola, M.L. (2017). Chapter 2-water as the first choice green solvent A2-pena-pereira, Francisco. In M. Tobiszewski (Ed.). The application of green solvents in separation processes. Elsevier, pp. 19–55.

- Honger, J. O., Offei, S. K., Oduro, K. A., Odamtten, G. T., & Nyaku, S. T. (2014). Identification and species status of the mango biotype of *Colletotrichum gloeosporioides* in Ghana. *European Journal of Plant Pathology*, 140(3), 455–467. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0480-z>
- Hyde, K.D. Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z., & Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39, 1–17.
- Hyde, K.D. Canon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycok, S.R., Pfenning, L.H., Phoulivong, S., Cai L., Chen, H., & Abdelsalam, K., E. (2009). *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity*, 39, 147–182.
- Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F. Y., Nyam, K. L., Norulaini, N. A. N., Sahena, F., & Mohd Omar, A. K. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. *Food Chemistry*, 183, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.046>
- Jyotshna, Srivastava, P., Killadi, B., & Shanker, K. (2015). Uni-dimensional double development HPTLC-densitometry method for simultaneous analysis of mangiferin and lupeol content in mango (*Mangifera indica*) pulp and peel during storage. *Food Chemistry*, 176, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.034>
- Kaur, J., Rathinam, X., Kasi, M., Leng, K. M., Ayyalu, R., Kathiresan, S., & Subramaniam, S. (2010). Preliminary investigation on the antibacterial activity of mango (*Mangifera indica* L.: Anacardiaceae) seed kernel. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(9), 707–710. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60170-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60170-8)
- Kefialew, Y., & Ayalew, A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.007>
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen T, Aromaa A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560–568. DOI:10.1093/ajcn/76.3.560
- Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>
- Kumar, A., Reddy, N., Reddy, K., & Devi, M. (2007). Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology*

Bulletin, 16(3), 157–160.

- Kuo, K. C. (2001). Sensitivity of mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, to the fungicide prochloraz in Taiwan. *Proceedings of the National Science Council*, 25(3), 174–179.
- Larrauri, J. A., RupaP., Borroto, B., Sauraerez, & Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: Preparation and characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 29(8), 729 – 733. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0113>
- Leanpolchareanchai, J., Padois, K., Falson, F., Bavovada, R., & Pithayanukul, P. (2014). Microemulsion system for topical delivery of Thai mango seed kernel extract: Development, physicochemical characterisation and ex vivo skin permeation studies. *Molecules*, 19(11), 17107–17129. <https://doi.org/10.3390/molecules191117107>
- Leccese, A., Bartolini, S., & Viti, R. (2009). Antioxidant property of peel and flesh in “GoldRush” and “Fiorina” scab -resistant apple (*Malus domestica*) cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37, 71 – 78.
- Leterme, P., Buldgen, A., Estrada, F., & Londono, A. M. (2006). Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia., *Food Chemistry*, 95, 644 – 652.
- Lima, N.B., Batista, M.V.A., Morais M.A. Jr., Barbosa, M.A.G., Michereff, S.J., Hyde, K.D., & Camara, M. P. S. (2013). Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, 61, 75–88.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang, Y., Zhang, S., Gong, G. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific Reports*, 6(April), 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep32761>
- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*. 173,502–511. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005>
- Lykkesfeldt, J., Viscovich, M., & Poulsen, H.E., 2003. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 1439–1447. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.006>
- Ma, Zhonghua, Ñ, T. J. M. (2005). *Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi*. *Crop Protection*. 24, 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011B>

- McDonald, S., Prenzler, P. D., Antonolovich, M., & Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1), 73–84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00288-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0).
- Middleton Jr E, K. C. & T. T. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673–751.
- Mirghani, M.E.S., Kabbashi, N.A., Vejayan, J. & Yosuf, Z. M. B. (2009). Antibacterial activity of mango kernel extracts. *Journal of Applied Sciences*, 9(17), 3013–3019.
- Mora-Aguilera, J. A., Vega, P. A., & Téliz-Ortíz, D. (2011). Enfermedades del mango. GIIIM. Grupo Interdisciplinario de Investigación en Mango. *In: El mango y su manejo integrado en Michoacán*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. pp 18-44.
- Muchiri, D. R., Mahungu, S. M., & Gituanja, S. N. (2012). Studies on Mango (*Mangifera indica*, L.) kernel fat of some Kenyan varieties in Meru. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 89, 1567 – 1575.
- Mukherjee, S.K. & Litz, R. E. (2009). Fruit Diseases. *In: The Mango: Botany production and uses*. (ed); P. CABI, Ed.). Londres, RU. pp.1-18.
- Muller-Riebau, F., Berger, B., Yegen, O. (1995). Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chemistry*, 43, 2262 – 2266.
- Mutua, J. K., Imathiu, S., & Owino, W. (2017). Evaluation of the proximate composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of mango seed kernel extracts. *Food Science and Nutrition*, 5(2), 349–357. <https://doi.org/10.1002/fsn3.399>
- Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Miyake, C., Izumi, Y., Akitmitsu, K., & Kongtragoul, P. (2010). Point mutations in the beta-tubulin gene conferred carbendazim-resistant phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* causing ‘ Nam Dok Mai’ mango anthracnose. *Journal of Agricultural Technology*, 6(2), 365–378.
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food Chemistry*, 241, 338–345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food Chemistry*, 241(August 2017), 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>

- Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Jones, E.B.G., Bahkali, A.H., Hyde, K. D. (2012). Novel Species of *Colletotrichum* Revealed by Morphology and Molecular Analysis. *Cryptogamie, Mycologie*, 33(3), 347–362. <https://doi.org/10.7872/crym.v33.iss3.2012.347>
- Nowicka, B., & Kruk, J. (2012). Plastoquinol is more active than α -tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817, 389–394.
- Onyeani, C., & Osunlaja, S. (2012). Comparative Effect of Nigerian Indigenous Plants In The Control of Anthracnose Disease of Mango Fruits. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 1(5), 80–85.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- Patiño-Vera, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., & Galindo, E. (2005). Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 540–550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02646.x>
- Paull, R.E., & Duarte, O. (2011). *Tropical fruits* (Second ed., Vol. 1). London, UK: CABI Publishing. Londres, RU. pp. 400.
- Pereira, F., Carneiro, J., & Amorim, A. (2008). Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2(3), 187–200. doi:10.2174/187221508786241738
- Perretti, G., Troilo, A., Bravi, E., Marconi, O., Galgano, F., & Fantozzi, P. (2013). Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 177 – 182.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, 44(April 2015), 33–43. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0046-0>
- Ploetz, R.C. & Freeman, S. (2009). Foliar floral and soilborne Diseases in: *Mango: Botany production and uses*. (ed.). Londres, RU. CABI Publishing. pp. 231–302.
- Ploetz, R. C. (2003). *Diseases of mango in: Diseases of Tropical Crops*. ((ed.)). Londres, RU. CABI Publishing. pp. 327–363.

- Prakash, O. (2004). *Diseases and Disorders of mango and their Management in: Diseases of fruits and vegetables*. (ed.), Vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Países Bajos.pp.511-619.
- Prusky, D., Kobiler, I., Miyara, I., & Alkan, N. (2009). *Fruit Diseases. In: The Mango: Botany production and uses*. (ed.). Londres, RU. CABI Publishing.pp. 210-230.
- Puravankara, D., Boghra, v., & Sharma, R. S. (2000). Effect of Antioxidant Principles Isolated from Mango (*Mangifera indica* L.) Seed Kernels on Oxidative Stability of Ghee (Butter fat). *Journal of Food Science and Technology*, 37(1), 6–10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200003\)80:4<522::AID-JSFA560>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200003)80:4<522::AID-JSFA560>3.0.CO;2-R)
- Rajan, S., Thirunalasundari, T., & Jeeva, S. (2011). Anti-enteric bacterial activity and phytochemical analysis of the seed kernel extract of *Mangifera indica* Linnaeus against *Shigella dysenteriae* (Shiga, corrig.) Castellani and Chalmers. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(4), 294–300. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60089-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60089-8)
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., & H. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5535–5.
- Ramić, M., Vidović, S., Zeković, Z., Vladić, J., Cvejin, A., & Pavlić, B. (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.002>
- Reque, P. M., Stefens, R. S., da Silva, A. M., Jablonski, A., Flores, S. H., De Oliveira Rios, A., et al. (2014). Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. *Food Science and Technology*, 34(4), 773–779.
- Ribeiro, S. M.R., Barbosa, L. C. A., Queiroz, J. H., Knödler, M., & Schieber, A. (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110(3), 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.067>
- Ribeiro, Sônia Machado Rocha, & Schieber, A. (2010). Bioactive compounds in mango (*Mangifera indica* L.). *Bioactive Foods in Promoting Health*, 507–523. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00034-7>
- Riciputi, Y., Diaz-de-Cerio, E., Akyol, H., Capanoglu, E., Cerretani, L., Caboni, M. F., & Verardo, V. (2018). Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*, 269, 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.154>

- Rincón-Hernández, C. A., De La Pérez, J. L. S., & Espinosa-García, F. J. (2011). Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(2), 395–412.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., & Cocero, M. J. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109,98-103. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.029>
- Rojas-Martínez, R.I., Zavaleta-Mejía, E., Nieto-Angel, D., & Acosta-Ramos, M. (2008). Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc.on mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(1), 61–64.
- Rojas, E.I., Rehner, S.A., Samuels, G.J., Van, Bael S. A., Herre, E.A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Y.Q., & Sha, T. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and others plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host- associated phatogens from assintomatic endophytes. 102(6), 1318–1338.
- Rupasinghe, H. P. V., & Kean, C. (2008). Polyphenol concentrations in apple processing by-products determined using electrospray ionization mass spectrometry. *Canadian Journal of Plant Science*, 88, 759 – 762.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Kraithong, S., & Rawdkuen, S. (2015). Optimization of antioxidants and tyrosinase inhibitory activity in mango peels using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 742–749. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.003>
- Saito, K., Kohno, M., Yoshizaki, F., & Niwano, Y. (2008). Extensive screening for edible herbal extracts with potent scavenging activity against superoxide anions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(2), 65–70. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0071-2>
- Sánchez-Perez, J. de la L. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5(1101), 7–18.
- Sefu, G., Satheesh, N., & Berecha, G. (2015). Effect of Essential Oils Treatment on Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) Disease Development , Quality and Shelf Life of Mango Fruits (*Mangifera indica* L). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences.*, 15(11), 2160–2169. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2015.15.11.96140>
- Senghor, A.L., Liang, W.J., & Ho, W. C. (2007). Integrated control of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit in Taiwan by the combination of *Bacillus subtilis* and fruit bagging. *Biocontrol Science and Technology*, 17(8), 865–870.

- Serna-Cock, L., García-Gonzales, E., & Torres-León, C. (2016). Agroindustrial potential of the mango peel based on its nutritional and functional properties. *Journal Food Reviews International*, 32, 364–376.
- Shahidi, F. (2015). Antioxidants: principles and applications. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation Elsevier Ltd.* Woodhead Publishing. Limited, Cambridge. pp. 1-14. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Sharma, G., Pinnaka, A. K., & Shenoy, B. D. (2015). Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. *Fungal Diversity*, 71(1), 247–264. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0312-7>
- Shi, X., Li, B., Qin, G., & Tian, S. (2012). Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores. *Postharvest Biology and Technology*, 67, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.01.003>
- Shivas, R. G., Tan, Y. P., Edwards, J., Dinh, Q., Maxwell, A., Andjic, V., Liberato, J. R., Anderson, Ch., Beasley, D. R., Bransgrove, K., Coates, L. M., Cowan, K., Daniel, R., Dean, J. R., Lomavatu, M. F., Mercado-Escueta, D., Mitchell, R. W., Thangavel, R., Tran-Nguyen, L. T. T., & Weir, B. S. (2016). *Colletotrichum* species in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 45(5), 447–464. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0443-2>
- Shyamala, B. N., & Jamuna, P. (2010). Nutritional content and antioxidant properties of pulp waste from *Daucus carota* and *Beta vulgaris*. *Malaysian Journal of Nutrition*, 16(3), 397–408.
- Sogi, D. S., Siddiq, M., Greiby, I., & Dolan, K. D. (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of “Tommy Atkins” mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chemistry*, 141(3), 2649–2655. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.053>
- Spalding, D. H. (1982). Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. *Plant Disease*, 66, 1185–1186.
- Sumere, B. R., de Souza, M. C., dos Santos, M. P., Bezerra, R. M. N., da Cunha, D. T., Martinez, J., & Rostagno, M. A. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>
- Suzuki, O. T., Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., & Lewontin, R. E. (1994). - Genética. - 4ª Edición. McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A. Madrid. pp. 800.
- Taba, S., Takaesu, K., Ooshiro, A., Moromizato, Z., & Takushi, T. (2004). Anthracnose of mango caused by *Colletotrichum acutatum*. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 48, 57–61.

- Tharanathan, R. N., Yashoda, H. M., & Prabha, T. N. (2006). Mango (*Mangifera indica* L.), "the king of fruits" - An overview. In *Food Reviews International* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1080/87559120600574493>
- Toro-Funes, N., Odriozola-Serrano, I., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M. L., VecianaNogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M.C. (2012). Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV. *Food Chemistry*, 135(4), 2832–2838. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.011>
- Torres-León, C., Rojas, R., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R., & Aguilar, C. N. (2017). Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave. *Food and Bioprocess Processing*, 105, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.005>
- Udayanga, D., Manamgoda, D.S., Liu, X., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2013). What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits. *Fungal Diversity*, 61, 165–179.
- Vázquez-Celestino, D., Ramos-Sotelo, H., Rivera-Pastrana, D. M., Vázquez-Barrios, M. E., & Mercado-Silva, E. M. (2016). Effects of waxing, microperforated polyethylene bag, 1-methylcyclopropene and nitric oxide on firmness and shrivel and weight loss of "Manila" mango fruit during ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.030>
- Vieira, W. A. S., Michereff, S. J., de Moraes, M. A., Hyde, K. D., & Câmara, M. P. S. (2014). Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, 67(1), 181–202. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0293-6>
- Vodnar, D. C., Călinoiu, L. F., Dulf, F. V., Ștefănescu, B. E., Crișan, G., & Socaciu, C. (2017). Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. *Food Chemistry*, 231, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.131>
- Weir, B.S., Jonhston, P.R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 115–180.
- Zhang, L.H., Li, M., Gao, Z.Y., Zhang, Z.K., Yang, F.Z., Xie, Y.X., Hu, M.J., & Yang, Y. (2013). Screening and cross resistance analysis of alternative fungicides against carbendazim-resitant *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. From mango (*Mangifera indica* L.). *Acta Horticulturae*, 992, 415–421.
- Zhou, Y., Li, W., Zeng, J., & Shao, Y. (2018). Mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces nepalensis* for control of the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruit. *Biological Control*, 123, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.014>

3 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS POLIFENOLES DE LA ALMENDRA DE MANGO (MANGIFERA INDICA L.) EN FRUTOS DE MANGO INFECTADOS POR ANTRACNOSIS

3.1 Resumen

Se evaluó la actividad antifúngica del extracto etanólico de la almendra de Mango cv. Manila (MKE) *in vitro* y en frutos de mango cv. Ataulfo contra la antracnosis (*Colletotrichum brevisporum*). Se obtuvo un MKE óptimo con un contenido fenólico total de 461.7 mg EAG/ g y una actividad DPPH• de 2919.0 $\mu\text{mol ET/ g}$ mediante la aplicación de ultrasonido de alta intensidad, usando una relación sólido / líquido de 1/20 g / mL y un tiempo de sonicación de 30 minutos. En contraste, la dosis recomendada (2 g / L) del fungicida comercial tiabendazol (TBZ) alcanzó un MGI de 67.6% y un SG de 51.4% en los mismos períodos de tiempo. Las frutas de mango sumergidas en solución acuosa de MKE (3 g / L) durante 20 min e inoculadas con *C. brevisporum* (10⁵ esporas / ml) presentaron lesiones de la enfermedad de 0 mm, mientras que cuando se sumergieron en TBZ (2 g / L) las lesiones de la enfermedad fueron de 4,5 mm, ambos después de 9 d. Por lo tanto, MKE puede considerarse como un agente antifúngico efectivo. Los principales compuestos fenólicos en MKE fueron mangiferina, ácido clorogénico, miricetina, ácido ferúlico, quercetina, rutina y ácido cafeico. Los estudios *in vitro* revelaron que MKE a 3 g / L en medio de cultivo PDA produjo una inhibición del crecimiento micelial (MGI) del 100% después de 9 días y una germinación de esporas (SP) del 0% después de 20 h. En contraste, la dosis recomendada (2 g / L) del fungicida comercial tiabendazol (TBZ) alcanzó un MGI de 67.6% y un SG de 51.4% en los mismos períodos de tiempo. Las frutas de mango sumergidas en solución acuosa de MKE (3 g / L) durante 20 min e inoculadas con *C. brevisporum* (10⁵ esporas / ml) presentaron lesiones de la enfermedad de 0 mm, mientras que cuando se sumergieron en TBZ (2 g / L) las lesiones de la enfermedad fueron de 4,5 mm, ambos después de 9 d. Por lo tanto, MKE puede considerarse como un agente antifúngico efectivo.

Palabras clave: extracto de almendra de mango; actividad antioxidante; *Colletotrichum brevisporum*; actividad antifúngica *in vitro*; frutas de mango; actividad antifúngica *in vivo*

³ Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Deysi Gómez Maldonado

Director de Tesis: Consuelo S.O. Lobato Calleros

3.2 Abstract

Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose

Mango cv. Manila kernel ethanolic extract (MKE) was assessed *in vitro* and in mango cv. Ataulfo fruits for antifungal activity against anthracnose (*Colletotrichum brevisporum*). An optimum MKE with a total phenolic content of 461.7 mg GAE/g and DPPH^{*} antioxidant activity of 2919.0 $\mu\text{mol TE/g}$ was obtained by applying high intensity ultrasound, using a solid/liquid of 1/20 g/mL and a sonication time of 30 min. The major phenolic compounds in MKE were mangiferin, chlorogenic acid, myricetin, ferulic acid, quercetin, rutin and caffeic acid. *In vitro* studies revealed that MKE at 3 g/L in culture medium produced a mycelial growth inhibition (MGI) of 100% after 9 d and a spore germination (SP) of 0% after 20 h. In contrast, the recommended dosage (2 g/L) of the commercial fungicide thiabendazole (TBZ) achieved a MGI of 67.6% and a SG of 51.4% at the same time periods. Mango fruits immersed in MKE (3 g/L) aqueous solution for 20 min and inoculated with *C. brevisporum* (10^5 spores/mL) presented disease lesions of 0 mm, while when immersed in TBZ (2 g/L) the disease lesions were of 4.5 mm, both after 9 d. Thus, MKE may be considered as effective antifungal agent.

Key words: mango kernel extract; antioxidant activity; *Colletotrichum brevisporum*; *in vitro* antifungal activity; mango fruits; *in vivo* antifungal activity

⁴Thesis: Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Deysi Gómez Maldonado

Advisor: PhD. Consuelo S.O. Lobato Calleros

3.3 Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) with a global production of 50.65 million tons in 2017, is one of the most important tropical fruits in the world due to its high sensory quality and nutritional value (Shahbandeh, 2018). Mexico is the fourth world producer of mango, with more than 50 varieties, and among them the “Manila” is one of the most appreciated due to its attractive color, delicious taste, and pleasant fragrance (Vázquez-Celestino, Ramos-Sotelo, Rivera-Pastrana, Vázquez-Barrios, & Mercado-Silva, 2016). However, the fruits are highly susceptible to various pathogens, leading to quality deterioration and reduced market value. Anthracnose, caused by *Colletotrichum* sp., is recognized as the most important field and postharvest disease of mango (Sefu, Satheesh, & Berecha, 2015). In the past, the occurrence of anthracnose in mango was exclusively attributed to *C. gloeosporioides*, but recent molecular studies have identified different species of *Colletotrichum* as prevalent in anthracnose lesions (Lima, Lima, Tovar-Pedraza, Michereff, & Cámara, 2015). Application of synthetic fungicides is the major approach for controlling fruit diseases, but their use during extended periods may lead to the emergence of fungicide-resistant strains, and residues of these chemical products on the fruit may be harmful to consumers and the environment (Onyeani & Osunlaja, 2012). Thus, the search for natural and effective antimicrobial agents has increased in the last years. Several studies have shown that plant secondary metabolites such as phenolic compounds, flavonoids and tannins have antifungal and antibacterial activities (Muller-Riebau, Berger, & Yegen, 1995). In this regard, the mango seed kernel constitutes a rich source of phenolic compounds, mainly gallic and ellagic acids, as well as gallates (Puravankara, Boghra, & Sharma, 2000). Furthermore, mango seed kernel extracts have been reported as being effective against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio vulnificus* and *Candida albicans* (Abdalla, Darwish, Ayad, & El-Hamahmy, 2007; Kaur et al., 2010; Mutua, Imathiu, & Owino, 2017). Some previous studies have determined the phenolic composition of seed kernels of different mango varieties. Ribeiro, Barbosa, Queiroz, Knodler, and Schieber (2008) and Abdel-Aty, Salama, Hamed, Fahmy, and Mohamed (2018) used

conventional extraction (methanol:water) for extracting phenolic compounds from seed kernels of the mango cv. Ubá and Hindi. In the former variety the phenolic concentration in the seed kernel was 4.6 times higher than in the pulp; while in the latter, hesperidin was the major phenolic compound. Dorta, González, Lobo, Sánchez-Moreno, and Ancos, 2014 used microwave assisted extraction for obtaining phenolic compounds from kernels of the Keitt, Sensation and Gomera mango varieties, finding that methyl gallate and penta-O-galloylglucoside were the major components of the Keitt and Sensation extracts, while a rahmnetin derivative was the principal compound of Gomera extract. Torres-León, Rojas, Serna-Cock, Belmares-Cerda, and Aguilar (2017) reported that the phenolic compounds of mango cv. Ataulfo kernel possessed a greater antioxidant activity than commercial antioxidants. It has been informed that qualitative and quantitative phenolic composition of the extracts depend on the variety and provenance of the mango, the conditions of extraction and extraction method employed (Dorta et al., 2014; Torres-León et al., 2017). Ultrasound in combination with green solvent extraction is a process that may help to obtain mango kernel extracts rich in total phenolic compounds. Acoustic cavitation disrupts the cell walls, allowing greater penetration of solvent into the plant material, and for a larger contact surface area between solid and liquid phase (Ramić et al., 2015). This opens the way to explore, for the first time, the assessment of the possible antifungal properties mango cv. Manila kernel extracts for controlling postharvest mango anthracnose disease. Therefore, the aim of this work was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of mango cv. Manila kernel extracts against *C. brevisporum*.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Chemicals

Methanol (99.85%) and ethanol (99.85%) were purchased from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). Aluminum chloride, metaphosphoric acid, glacial acetic acid, sodium acetate, sodium carbonate, 2,6-dichloroindophenol, xylene, ascorbic acid (99.8 %), vanillin, hydrochloric acid, catechin (99.8 %),

acetic acid (HPLC, 99.9%), acetonitrile (HPLC, 99.9%), Folin-Ciocalteu reagent (2N), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,20-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, and the standards gallic acid, ellagic acid, ferulic acid, caffeic acid, syringic acid, chlorogenic acid, benzoic acid, vanillic acid, mangiferin, epicatechin, rutin and quercetin were purchased from Sigma Aldrich (Toluca, State of Mexico, Mexico). Synthetic fungicide thiabendazole (TBZ, Tecto 60, 60% w/w) was purchased from Syngenta Agro SA de CV (Mexico City, Mexico). Distilled water (DW) was used in all cases, unless otherwise stated.

3.4.2 Plant material

Mango cv. Manila fruit was kindly supplied by the Local Agricultural Association of mango growers of the Municipality of Tuzantla, State of Michoacan, Mexico, located at 19°12' N and 100°34' W, at an elevation above sea level of 580 m. The fruit was harvested at commercial maturity stage (based on skin color and firmness), with soluble solids content of 9-16 °Brix and pH of 4.9-5.4. Fruits were washed with tap water, kernels were manually separated from seeds and dried to constant weight in a hot air oven HCF-62 (Riossa Digital, Mexico City, Mexico) at 45 °C for 72 h. The dried mango kernels were milled (Cereal Mill mod. 200, Pulvex-Mexico®, Guadalajara, State of Jalisco, Mexico) and passed through a 0.84 mm sieve (< 18 mesh) (Sai-Ut et al., 2015) obtaining the mango kernel flour (KF). Moisture, protein (conversion factor of 6.25), fat, crude fiber, and ash contents were determined (AOAC, 2005), and total carbohydrate content was evaluated by difference.

3.4.3 Pathogenic fungus

Colletotrichum brevisporum was provided by the Mycology Laboratory of the Universidad Autonoma Chapingo (State of Mexico, Mexico) and used as target organism in antifungal assays. *C. brevisporum* was isolated from infected peel of mango cv. Ataulfo harvested in Tapachula, State of Chiapas, Mexico, purified by single-spore cultures on potato dextrose agar (PDA, Dicfo®, Becton Dickinson,

East Rutherford, NJ, USA), identified through phylogenetic inference (Liu et al., 2016), and maintained in PDA slants at 10 °C (Yenjit et al., 2010).

3.4.4 Extraction conditions

A 3² factorial experiment was used to determine the effects of sonication time and solid/liquid ratio on the total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AA, by DPPH) of the extracts. Samples (1 g) of KF were added with a water-ethanol (20:80 v/v) solution for obtaining different solid/liquid ratios (1/5, 1/10, 1/20 g/mL), and pH was adjusted to 3.0 (Barros et al., 2019) with HCl 0.1 N (pH meter model HI-221, Hanna Instruments Inc., Smithfield, RI, USA). The mixtures were stirred at 1000 rpm (IKA® WERKE, Model Ro 15 Power, Works Inc., Wilmington, NC, USA) during 3 h at room temperature (20 ± 2 ° C) under dark conditions, and then ultrasonicated (Ultrasonic processor, Model VCX 130 PB 500/750 W, Sonics and Materials, Inc., Newtown, CT, USA), coupled to an 8-mm diam. stainless steel probe applying a frequency of 20 kHz and 50% of amplitude (Espinosa-Muñoz et al., 2016) during the corresponding time (10, 20, 30 min). An ice-water bath was used to dissipate the heat produced during sonication. The extracts were centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min at 10 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany), and the supernatants were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore Co., Milford, NH, USA). Afterwards, supernatants were concentrated under vacuum (Hahnvapor, Model HS-2005S, Bucheon, Korea) at 40 °C, freeze-dried (Lyophilizer Free Zone 2.5, Labonco, Corporation, MO, USA) and stored at -20 °C until required. A control conventional extraction was conducted using a solid/liquid ratio of 1/20 g/mL without ultrasound.

The ultrasonication conditions (solid/liquid ratio (LSR) and sonication time (ST)) yielding the significantly highest total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AA, by DPPH) in the extracts were used for obtaining an optimized mango kernel extract (MKE). MKE was characterized for total flavonoids, ascorbic acid, condensed tannins, antioxidant activity by ABTS and phenolic compounds composition by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). All the results reported from hereon are given per gram of KF in dry basis.

3.4.5 MKE characterization

Total phenolic content (TPC)

TPC was analyzed using the Folin-Ciocalteu reagent, as described by Singleton and Rossi (1965) with slight modifications. An aliquot (250 μ L) of MKE (0.25 mg/mL in 80 % ethanol) solution was transferred to a test tube containing 200 μ L of Folin-Ciocalteu reagent and 1250 μ L of DW. The mixture was stirred and after 3 min, 300 μ L of Na₂CO₃ (15% w/v) were added. Solution was incubated during 30 min at room temperature, and absorbance was measured at 760 nm with a UV/VIS spectrophotometer (HP 8453; Hewlett Packard, NY, USA) at 760 nm. TPC was expressed as milligrams gallic acid equivalents (GAE) per g.

DPPH• assay

The AA of the extracts was determined using the DPPH• radical scavenging assay following the method of Brand-Williams et al. (1995) with slight modifications. Briefly, 100 μ L of the extracts, after appropriate dilution, were added to 1.5 mL of 0.1mM DPPH solution in methanol. The mixture was shaken gently and allowed to stand in the dark for 30 min at room temperature. Afterwards, the absorbance at 517 nm was measured against methanol using the HP 8453 spectrophotometer. The DPPH• radical scavenging activity of extracts was calculated from the standard curve of Trolox (0.01 to 0.1 mM) and expressed as μ moles of Trolox equivalents (TE) per g.

ABTS•⁺ assay

The scavenging activity against the ABTS•⁺ radical cation was determined according to Re et al. (1999), with slight modifications. Briefly, 7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate solutions were mixed in a 1:1 volume ratio, allowed to stand in dark for 16 h for obtaining the ABTS•⁺ radical cation stock solution. This solution was diluted with methanol: water (80:20, v/v, blank solution) until reaching an absorbance of 0.70 ± 0.020 at 734 nm. The ABTS•⁺ stock solution (3 mL) was mixed with 20 μ L of either blank, Trolox or MKE solutions,

and after 6 min of reaction, the absorbance was measured at 734 nm using the HP 8453 spectrophotometer. A standard curve of Trolox (0.3-1.5 mM) was obtained, and AA was expressed as μ moles of Trolox equivalents (TE) per g.

Total flavonoid content (TFC)

The total flavonoid content (TFC) was determined by the aluminum chloride colorimetric method according to Chang et al. (2002), with slight modifications. A diluted MKE in ethanol solution (0.02 g/mL) was prepared, and 0.5 mL were mixed with 1.5 mL of 95% ethanol, 0.1 mL of 10% AlCl_3 , 0.1 mL of 1 M potassium acetate and 2.8 mL of DW. After incubation at room temperature for 30 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm with the HP 8453 spectrophotometer. TFC was estimated based on a standard calibration curve of quercetin (0.5-50 mg/mL), and results were expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per g.

Ascorbic acid (AscA)

AscA was determined as described by Robinson and Stotz (1945) with slight modifications. One mL of extract was made up to volume (10 mL) with 3% metaphosphoric acid (w/v). An Erlenmeyer flask was added with 400 μ L of the above solution, 400 μ L of an acidity regulator (acetate buffer solution pH = 4, glacial acetic acid: sodium acetate 5%, w/v), 600 μ L of 2,6-dichloroindophenol and 3 mL of xylene, in rapid succession. The mixture was vortexed for 3 min, and the aqueous phase then separated with the help of a separation funnel. Anhydrous sodium sulfate crystals were added to the organic phase to eliminate traces of water, and the absorbance was measured at 500 nm with the HP 8453 spectrophotometer. The milligrams of AscA per g were estimated based on a standard calibration curve (0.5-50 mg/mL) of AscA.

Condensed tannins

Condensed tannins (CT) were determined according to the method reported by Saad et al. (2012) with slight modifications. An aliquot (25 μ L) of MKE solution was mixed with 750 μ L of vanillin methanolic solution (4% w/v) and 375 μ L of hydrochloric acid were added. The solution was vortexed and kept in the dark for

20 min at room temperature. The absorbance was measured at 500 nm with the HP 8453 spectrophotometer. A catechin standard curve (0.1-1.50 mg/mL) was obtained, and the results were expressed as mg catechin equivalents (CE)/g.

Quantification of phenolic compounds

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed for determining the composition of the phenolic compounds contained in 1 mg MKE/1 mL methanol solution as described by Womeni et al. (2016), with slight modifications. The HPLC system (Agilent Technologies, 1200 series, Santa Clara, CA, USA), was equipped with a quaternary pump model G11311A and diode array detector (DAD) model G11315B in combination with Chemstation software. For separations, a Nucleosil C18 column (100 × 4 mm, 5 µm particles of reverse phase, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a mobile phase composed of A (1% trifluoroacetic acid in water) and B (acetonitrile) were used. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 5 µL. DAD detection was at 280 nm. Identification of the phenolic compounds was achieved by comparing their retention time to those of standards (gallic, ellagic, chlorogenic, caffeic, ferulic, syringic, p-hydroxybenzoic acids and mangiferin). The results were expressed as mg/g.

Antifungal activity

In vitro experiments

Mycelial growth inhibition was assessed as described by Yenjit et al. (2010), with slight modifications. Appropriate dilutions of MKE in sterile DW were added to PDA at 40 °C in order to attain concentrations of 0.5, 1, 1.5, 2, 3 and 5 g/L of MKE. The media were poured into 9-cm-diameter Petri dishes and incubated at 28 °C for 72 h under dark conditions for ensuring that no growth of microorganisms occurred and that sterile conditions were maintained. At the same time, a 6 days old culture of the pathogenic fungus (subsection 2.3) in PDA at 28 °C was obtained. A 5-mm-diameter plug of the fungi was removed from the fungus colony located on the margin of the Petri dish. This plug was then placed in center of the sterile MKE-PDA media described above, and incubated at 28 °C

for 12 days. The inhibition of mycelial growth (in mm) was used for evaluating the efficiency of the concentrations of MKE, using as controls an untreated PDA culture (without MKE) and a treatment with TBZ (2 g/L in PDA).

A digital vernier was used for measuring the growth of *C. brevisporum* every 36 h. Results were expressed as mycelial growth inhibition (%) with the help of the following equation:

$$\text{Mycelial growth inhibition (\%)} = \frac{(CD_C - CD_T) \times 100}{CD_C} \quad (1)$$

where CD_C is the diameter of the colony in untreated PDA culture and CD_T is the colony diameter of the MKE-PDA cultures.

The effect on *C. brevisporum* spore germination was assayed with the 0 (control), 0.5, 1.5 and 3 g/L MKE-PDA media, and TBZ (2 g/L in PDA). The media were poured into 5-cm-diameter Petri dishes and incubated at 28 °C for 72 h. Then, 0.05 mL spore suspension (10^5 spores/mL) was placed on the agar plates center. After 5 and 20 h of incubation at 28 °C, the number of germinated spores was examined from a total of 100 spores in each of three randomly selected fields under a dissecting microscope at 400× magnification, and the results were expressed as spore germination (%).

***In vivo* experiments**

Fresh almost ripe mango cv. Ataulfo fruits were washed with tap water and the surface was sterilized by immersion in a 1.0% sodium hypochlorite (NaClO) solution for 2 min, and were rinsed thrice with sterilized water. The mangoes were immersed for 20 min in MKE (1.5 and 3 g/L) aqueous solutions. Then, the mangoes were inflicted with a 1-mm-deep wound in the middle of each fruit with a sterile needle, and each wound was inoculated with the 20 µL of spore suspension (10^5 spores/mL). The inoculated fruits were incubated (28 °C, 96% RH) for 9 days in a moist plastic box containing within sterile moistened paper and

hermetically sealed. Disease development was assessed by measuring the diameter of the anthracnose lesion on mango fruits (Yenjit et al., 2010). The anthracnose lesion diameter with TBZ (2g/L) was used for comparison purposes. Fruits inoculated with sterile water were used as control.

3.4.6 Statistical analysis

Analyses were carried out in triplicate from three independent experiments performed using a randomized experimental design, except the analyses for the *in vitro* determination that were carried out by sixtiplicate. Data were subjected to Simple Classification Analysis of Variance and to Significant Minimum Difference (LSD) means comparison analysis. Multifactor analysis of variance was performed to determine which factors, solid/liquid ratio and the sonication time, had a statistically significant effect on the AA and TPC of the mango kernel extract. Significance was established at $p \leq 0.05$. Data analysis was done using the Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, USA).

3.5 Results and discussion

The yields of pulp, peel and seed of mango were 61.7 ± 2.5 , 17.8 ± 2.1 , and $20.5 \pm 0.9\%$, respectively, and the kernel represented $78.0 \pm 2.1\%$ of the seed. Torres et al. (2017) reported seed (9.5%) and kernel (51.5%) yields for mango cv. Ataulfo.

3.5.1 Proximate chemical composition of kernel flour

The protein, fat, crude fiber, ashes and total carbohydrate contents of KF were 8.8 ± 0.3 , 8.4 ± 0.1 , 3.4 ± 0.1 , 2.9 ± 0.1 and 76.6 ± 0.6 g/100g, respectively. Mirghani et al. (2009) reported average values of 6% of protein, 11% of fat, 2% of crude fiber, 2% of ash and 77% of carbohydrates for kernel of different mango varieties. Mutua et al. (2017) found that KF of Kent, Apple, Sabine and Ngowe

mango varieties contained 6.7–9.2% of protein, 9.8-13.1% of fat, 2.6-3.7% of crude fiber, 1. 8-2.9% of ash and 72.9-75.9% of carbohydrates.

3.5.2 Effects of extraction conditions on AA and TPC of extracts

Multifactor ANOVA showed that as solid/liquid ratio and sonication time increased, both the TPC and the DPPH• antioxidant activity of the extracts increased significantly (Table 3). As presented in Fig. 8 A the TPC ranged from 167.6 ± 1.9 mg GAE/g for the lowest solid/liquid ratio (1/5 g/mL) and shortest sonication time (10 min) to 461.7 ± 3.9 mg GAE/g for the highest solid/liquid ratio (1/20 g/mL) and sonication time (30 min). DPPH• antioxidant activity (Fig. 8 B) ranged from 838.0 ± 20.0 μ mol TE/g at lowest SLR and shortest ST to 2919.0 ± 4.8 μ mol TE/g at highest SLR and longest ST. Our results indicated a direct relationship between TPC and AA, which is in agreement with findings made by other authors (Dorta et al., 2012; Torres-León et al., 2017). It has been reported that shear forces created by the ultrasonic cavitation disrupt cell walls, allowing the solvent to penetrate the cells, and increase the mass transfer of intracellular components into the extraction solvent (Yingngam et al., 2014; Chen et al., 2018), resulting in increased AA and TPC content of extracts from diverse plant materials (Altemimi et al., 2016). During ultrasound processing, mechanical waves propagate by rarefactions and compression, resulting in surface peeling, erosion, and particle breakdown, which might be beneficial in releasing more bioactive compounds and enhancing the total flavonoids content (Vilkhu et al., 2008). Deng et al. (2017) reported that the liquid/solid ratio, extraction temperature, and the sonication time significantly affected the yield of TPC extracted from olive fruits. The optimized conditions for TPC ultrasound assisted extraction reported by these authors were liquid/solid ratio of 22 mL/g, extraction temperature of 47 °C and extraction time of 30 min. Sai-Ut et al. (2015) reported that the selection of solid/liquid ratio influences the efficacy of the extraction and yield. They found that as the sample to solvent ratio increased from 1/5 to 1/30, the TPC increased significantly ($p < 0.001$). The driving force for mass transfer was the concentration gradient between the solid and the solvent.

For the highest SLR and ST conditions the TPC obtained was significantly higher than that reported for cv. Hindi (Abdel-Aty et al., 2018), Ataulfo (Torres-Leon et al., 2017), Keitt, Sensation and Gomera (Dorta et al., 2014), Tommy Atkins (Sogi et al., 2013); Chok-Anan (Maisuthisakul and Gordon, 2009), whose TPC ranged from 23.9-447.6 mg GAE/g. The value for DPPH• antioxidant activity for the highest SLR and ST conditions was significantly higher than that found in mango kernel extracts from cv. Tommy Atkins (1310-1800 µmol TE/g; Sogi et al., 2013), and from cv. Keitt and Gomera (311-1300 µmol TE/g; Dorta et al., 2012). Based on our above mentioned results, the extraction conditions selected for obtaining MKE were 1/20 g/mL SLR and 30 min ST.

Table 3 - Multifactor analysis of variance for the total phenolic content and DPPH* antioxidant activity of the mango kernel extracts.

Parameter	Sonication time (min)			Solid/liquid ratio (g/mL)		
	10	20	30	1:5	1:10	1:20
Total phenolic content						
(mg GAE/g)	245.6 ± 4.7 ^a	289.0 ± 4.3 ^b	321.5 ± 4.7 ^c	186.9 ± 4.4 ^a	263.1 ± 4.4 ^b	406.0 ± 4.3 ^c
Antioxidant activity						
(μmol TE/g)	1808.9 ± 5.9 ^a	1977.9 ± 5.9 ^b	2226.3 ± 5.9 ^c	1024.8 ± 5.9 ^a	2231.9 ± 5.9 ^b	2756.4 ± 5.9 ^c
Different superscripts in the same row indicate significant difference between means (p≤0.05).						

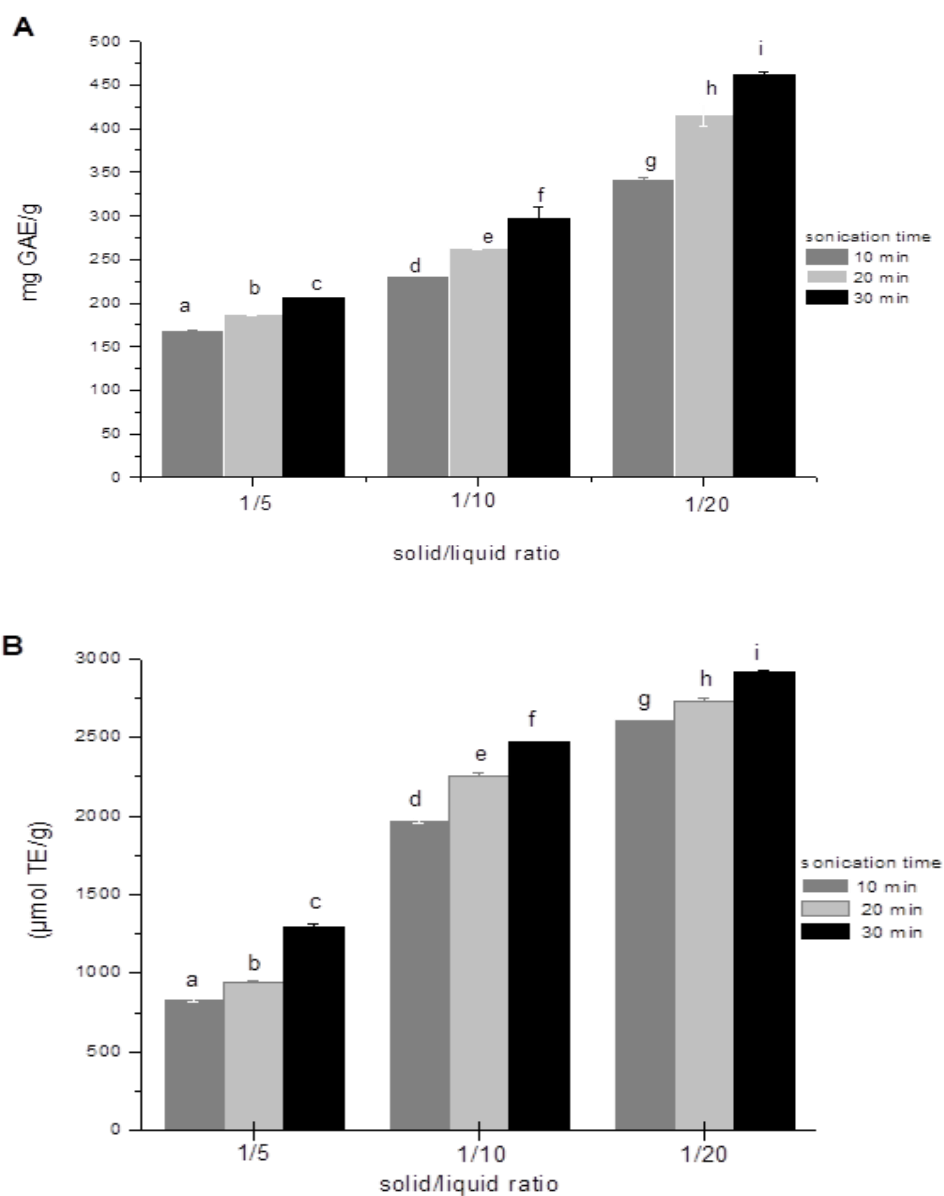


Fig. 8 - Effect of the extraction variables solid/liquid ratio and sonication time on: (A) total phenolic content (mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of kernel) and (B) DPPH antioxidant activity (μ mol of Trolox equivalents (TE)/g of kernel). Different letters indicate significant difference between means ($p \leq 0.05$).

3.5.3 Total flavonoids, ascorbic acid, tannins and antioxidant activity of MKE

The capacity of MKE to scavenge the ABTS^{•+} free radical cation ($2472.40 \pm 46.93 \mu\text{M TE/g}$) was similar to $2919.0 \pm 4.8 \mu\text{mol TE/g}$ obtained for the DPPH[•] antioxidant activity, and significantly higher than the ABTS^{•+} free radical cation values of 440-1030 $\mu\text{M TE/g}$ reported for cv. Chok-Anan (Maisuthisakul and Gordon, 2009), 343.6-1278.5 $\mu\text{M TE/g}$ for Keitt and Gomera and 1110.1-1724.1 $\mu\text{M TE/g}$ for Tommy Atkins (Sogi et al., 2013).

The total flavonoids, ascorbic acid and condensed tannins contents of MKE were $28.13 \pm 1.4 \text{ mg QE/g}$, $0.80 \pm 0.0 \text{ mg/g}$, and $13.8 \pm 0.1 \text{ mg CE/g}$, respectively. TFC values was higher than $1.64 \pm 1.02 \text{ mg QE/g}$ reported for processed mango kernel extracts of cv. Ikanekpo (Arogba and Omede, 2012), while the AscA content was higher than 0.64 mg/g found in Tommy Atkins mango seeds (Sogi et al., 2013). On the other hand, CT was lower than $14.4 \pm 0.33 \text{ mg CE/g}$ found in Ataulfo mango kernel (Torres- León et al., 2017).

3.5.4 Determination of phenolic compounds

Reverse phase HPLC was used to analyze MKE, and the phenolic compounds were identified by the relative retention times (Table 4) and UV-VIS spectra. Quantification of these compounds was performed with the calibration curve of the respective standards (López-Cobo et al., 2017). Mangiferin was the major phenolic compound found in MKE (17.89 mg/g), followed by chlorogenic acid (6.88 mg/g), myricetin (4.94 mg/g), ferulic acid (4.49 mg/g), quercetin (3.87 mg/g), rutin (2.95 mg/g) and caffeic acid (2.04 mg/g). Mangiferin is has been recognized as a natural plant polyphenol with various pharmacological activities such as analgesic, antidiabetic, antisclerotic, antimicrobial and antiviral, antiinflammatory and antiallergic (Jyotshna et al., 2015; Matkowski et al., 2013). The mangiferin content found in this work was significantly higher than 6.40-8.48 mg/g for cv. Van

Dyke (Barreto et al., 2008), 0.04-0.72 mg/g for cv. Keitt, Osteen and Sensación (López-Cobo et al., 2017), ~ 0.046-0.047 mg/g for Egyptian (Abdala et al., 2007a; Ribeiro et al., 2008), and 1.77 mg/g for cv. Waterlily (Abdullah et al., 2015) kernels. MKE also contained minor amounts of ellagic acid, gallic acid, syringic acid, p-hydroxybenzoic acid and apigenin.

Table 4 - Phenolic compounds in mango kernel extract.

Phenolic Compound	Retention time (min)	mg/g kernel
Mangiferin	2.12	17.21 ± 3.46
chlorogenic acid	4.23	6.88 ± 1.68
Myricetin	7.39	4.92 ± 0.09
ferulic acid	1.95	4.49 ± 1.02
Quercetin	11.2	3.87 ± 0.36
Rutin	4.41	2.95 ± 0.16
caffeic acid	6.44	2.04 ± 0.48
ellagic acid	12.68	0.77 ± 0.08
syringic acid	5.13	0.63 ± 0.14
galic acid	1.71	0.61 ± 0.37
p-hydroxybenzoic acid	5.73	0.54 ± 0.10
Apigenin	14.7	0.53 ± 0.23

Values are presented as means ± SD (n = 3).

Abdullah et al. (2015) reported the main phenolic compounds found in cv. Waterlily were epigallocatechin, chlorogenic acid, apigenin, epicatechin, rutin, p-coumaric acid, myricetin, mangiferin, 4-hydroxybenzoic acid, gallic acid, quercetin and syringic acid at concentrations of 21.8, 13.7, 3.2, 2.7, 2.5, 2.4, 2.0, 1.8, 1.2, 1.1, 0.8 and 0.5 mg/g, respectively. López-Cobo et al. (2017) reported that in kernels from mango cv. Keitt, Osteen and Sensación the compounds present were ellagic acid, methyl gallate, mangiferin, quinic acid, citric acid, gallic acid, syringic acid, catechin and p-hydroxybenzoic acid. Abdel-Aty et al. (2018) found hesperidin, cinnamic acid, tannic acid, gallic acid, protocatechuic acid, catechin, p-coumaric acid and chlorogenic acid in kernel from cv. Hindi. Torres-León et al. (2017) reported penta-O-galloyl-glucoside, ethyl gallate and rhamnetin for kernel from cv. Ataulfo. It has been informed that the phenolic compounds are the main antioxidant constituents with greater variation in mango. The variations in phenolic compounds and differences in their contents have been attributed to factors such as variety, genetic, environmental, ripening stage and agricultural practices (Ribeiro and Schieber, 2010). Ribeiro et al. (2008) suggested that growing mangoes using simple management practices and pesticide-free technology enables the natural plant and fruit to develop defenses against environmental adversities and as a result there is an increase in synthesis of secondary metabolites (phenolic compounds), resulting in an improvement of functional properties of the fruits.

3.5.5 Effect of mango seed kernel extract on mycelial growth of *C. brevisporum*

The antifungal activity was evaluated by comparing the effect of MKE concentration (0.5, 1, 1.5, 2, 3 and 5 g/L) on the micelial growth inhibition (%) (MGI) of *C. brevisporum*, in relation to the micelial growth of the control without MKE during 12 d. Additionally, the MGI was also determined for the synthetic

commercial fungicide TBZ (2 g/L) (Fig. 9). Compared to the control, *C. brevisporum* colony diameter was significantly inhibited by TBZ and MKE treatments during 12 d (Fig. 9). MGI of 100 % were achieved with MKE (3 and 5 g/L) after 9 days, and with MKE (5g/L) after 12 d of inoculation. In contrast, TBZ (2 g/L) only achieved an MGI of between 67.6 % after 3 d to 76.3% after 12 d (Fig. 3). Higher MGI was achieved with MKE at 2 g/L than for TBZ (2 g/L) throughout the 12 d, varying from 84.9% at day 3 to about 81.4% at day 12 (Fig. 10).

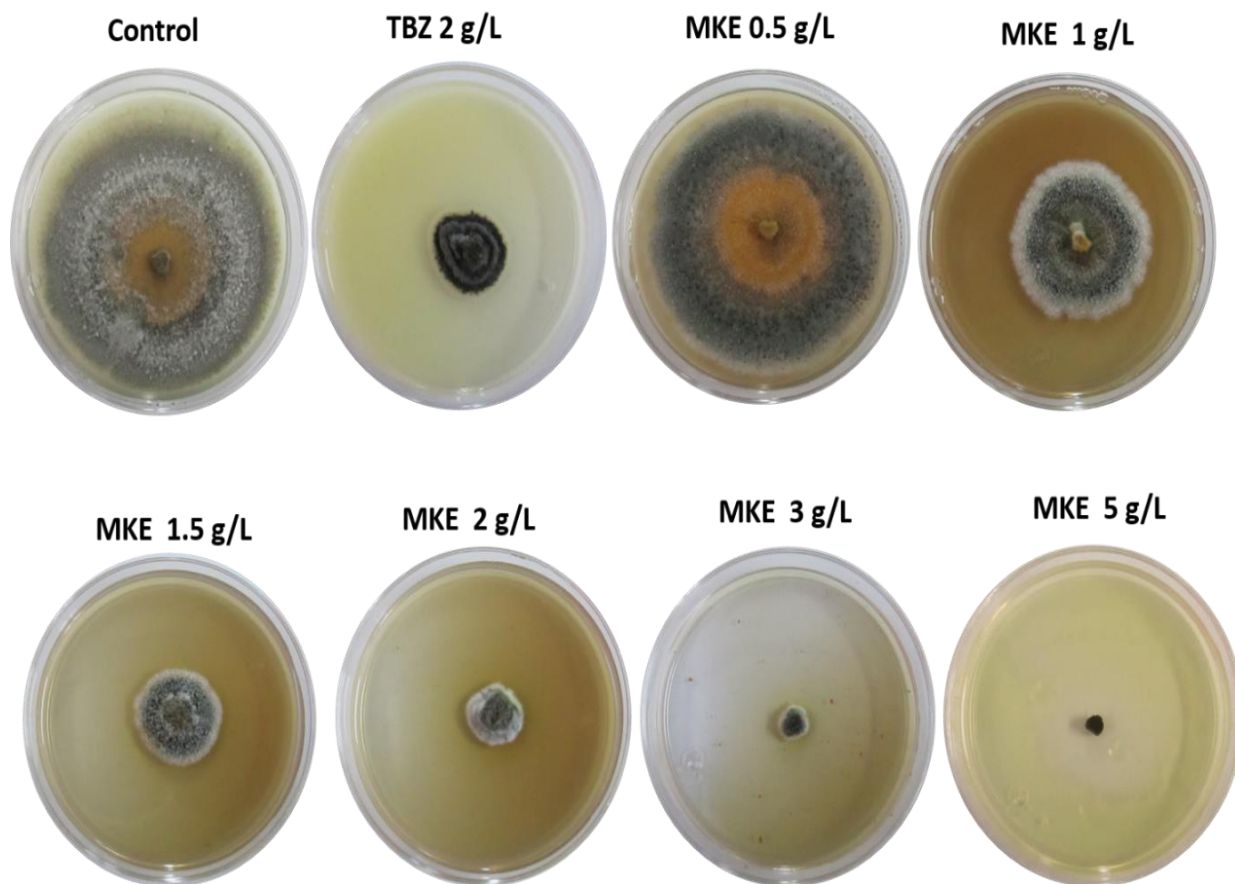


Fig. 9 - Mycelial growth of *C. brevisporum* after incubation for 12 days at 28 °C. Control without added mango kernel extract (MKE); with thiabendazole (TBZ); and with MKE.

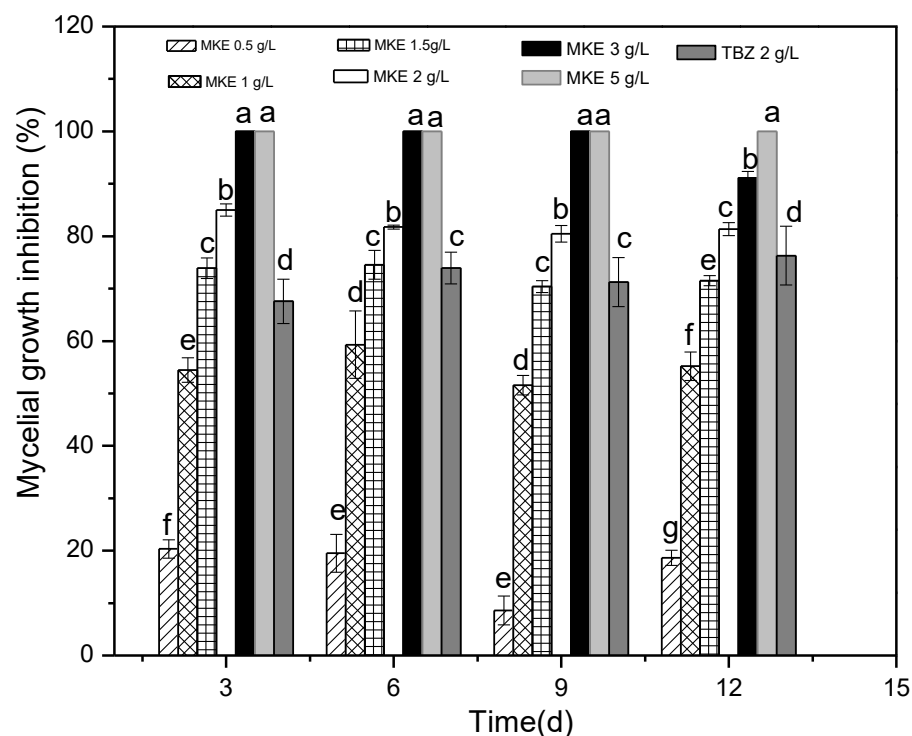


Fig. 10 - Mycelial growth inhibition (%) of *C. brevisporum* (28 °C, 12 days) by: Control, MKE (0.5-5 g/L) and TBZ (2 g/L). Different letters indicate significant difference between means ($p \leq 0.05$).

The potent antifungal activity demonstrated by the MKE could be attributed to the presence of secondary metabolites such as phenolic compounds, flavonoids and tannins which exhibit a wide range of biological activities (Jasso de Rodriguez et al., 2017). The mechanisms of action of these compounds against microorganisms is variable. For example, gallic, ellagic, ferulic, caffeic, and chlorogenic acids, which are contained in MKE (Table 4) have been reported as having antifungal activity (Patzke and Schieber, 2018; Xu et al., 2018; Martínez et al., 2017; Osorio et al., 2010). This effect has been associated to enzymatic inhibition produced via their oxidation, while tannins inhibit the synthesis of

proteins in the cell (Rodriguez-Pedroso et al., 2012). A higher concentration of phenolic compounds in MKE promotes a higher antioxidant activity, which in turn promotes a higher antifungal activity (Jasso de Rodriguez et al., 2017). Mutua et al. (2017) reported that kernel methanolic extracts from Kent, Apple, Sabine and Ngowe mango varieties had antifungal activity against *Candida albicans*. To our knowledge, this is the first report regarding the antifungal activity of mango seed kernel extracts from Manila variety against *C. brevisporum*.

3.5.6 Effect of MKE on spore germination of *C. brevisporum*

The effect of MKE concentration (0.5, 1.5 and 3 g/L) on spore germination (%) of *C. brevisporum* was determined after 5 and 20 h of incubation in PDA, and compared with that of a control (without MKE) and TBZ (2 g/L). MKE produced a significantly lower spore germination after 5 h which was of 11.5% at 0.5 g/L, 2.0% at 1.5 g/L and of 0% at 3 g /L, compared to that of the control (without MKE) which was of 19.3%. The commercial fungicide TBZ allowed a spore germination of 9.8%, which fell in between the values found for 0.5 and 1.5 g/L of MKE (Fig. 11). Spore germination increased significantly for all the treatments as incubation time increased, but the trend observed between the treatments after 5 h incubation was maintained. The control (without MKE) exhibited a spore germination of 98.0%, TBZ of 51.4%, 0.5 g/L MKE of 77.0%, 1.5 g/L of 7.1% and 3.0 g/L of 0% (Fig.11). A rate of spore germination between 5 and 20 h for all the treatments was obtained from the slope of Fig. 11, which was of 5.25%/h for the control, 2.77%/h for TBZ, 4.37%/h for 0.5 g/L MKE, 0.34%/h for 1.5 g/L MKE and 0%/h for 3 g/L MKE. These results indicate that when a higher spore inhibition took place a higher mycelial inhibition occurred, which is in accordance with that informed by Jasso de Rodríguez et al. (2011).

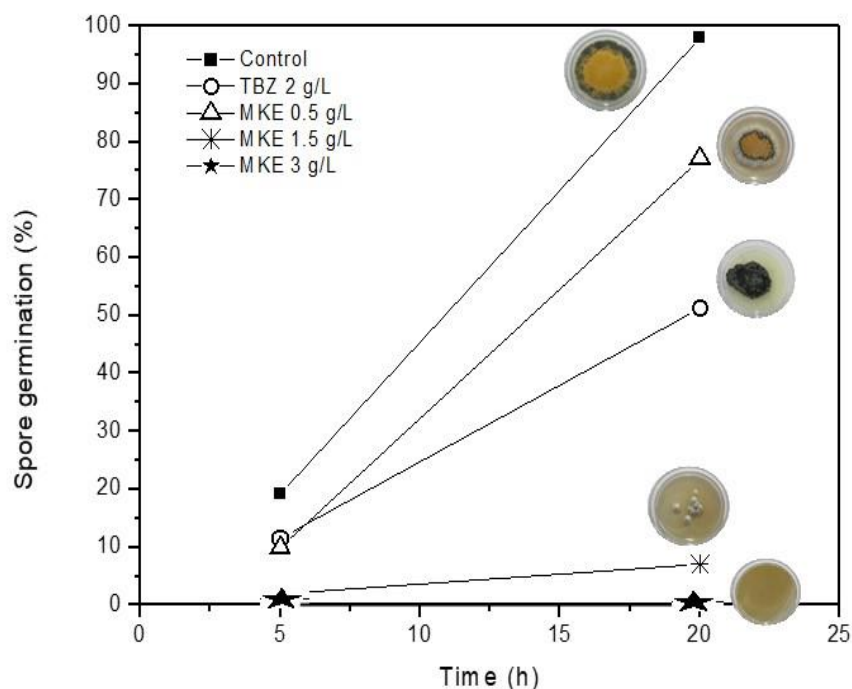


Fig. 11 - Spore germination (%) of *C. brevisporum* after 5 and 20 h of incubation at 28 °C. Control, MKE (0.5-3 g/L) and TBZ (2 g/L).

3.5.7 Effect of MKE on anthracnose disease on mango fruit

The disease severity of anthracnose by *C. brevisporum* in the control, TBZ (2 g/L) and MKE (1.5 and 3 g/L) fruit treatments stored at 28 °C are shown in Fig. 12. After 3 days of storage, none of the treatments presented blackening, but after 6 days all the treatments displayed blackening, excepting the 3 g/L MKE treatment. The blackened region displayed was from higher to lower as follows: control > 2 g/L TBZ > 1.5 g/L MKE. As storage time increased to 9 days, the extent of blackening increased in the control, 2 g/L TBZ and 1.5 g/L MKE treatments, while blackening was still suppressed in the 3 g/L MKE treatment, indicating the efficiency of this treatment for inhibiting the development of anthracnose.

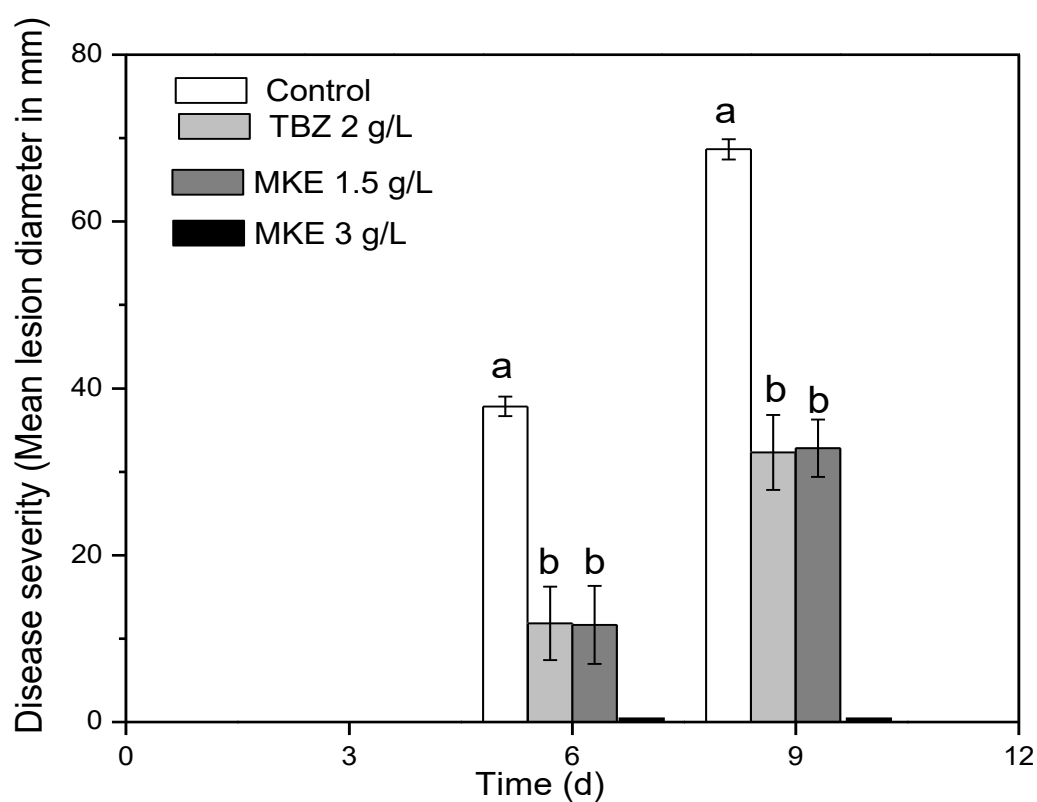
A**B**

Fig. 12 - Effect of control, MKE (1.5 and 3 g/L) and TBZ (2 g/L) on anthracnose development in mango fruit after 3, 6 and 9 days at 28 °C: (A) symptoms of anthracnose and (B) disease severity (lesion diameter of anthracnose). Different letters indicate significant difference between means ($p \leq 0.05$).

3.6 Conclusions

This work reports for the first time the antifungal properties and phenolic composition of an optimum (highest phenolic content and antioxidant activity) Mango cv. Manila kernel ethanolic extract obtained by ultrasound assisted extraction with ethanol. MKE at 3 g/L concentration was capable of totally suppressing the diameter of the disease lesion after 9 d in *in vivo* assays. Likewise, the mycelial growth was inhibited by 100% after 9 d and the spore germination was nil after 20 h. The use of MKE resulted in better postharvest mango anthracnose control than the commercial fungicide thiabendazole.

Acknowledgements

Authors extend their thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship of Deysi Gómez-Maldonado and for the partial support through project 245.

Conflicts of interest

No conflict of interest is declared.

3.7 References

- Abdalla, A.E.M., Darwish, S.M., Ayad, E.H.E., & El-Hamahmy, R.M., (2007). Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*. 103, 1141–1152, <http://doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.026>.
- Abdullah, A.H., Mohammed, A.S., & Abdullah, R., (2015). Identification and quantification of phenolic compound in *Mangifera indica* waterlily kernel and their free radical scavenging activity. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. 2, 1–7, [http://doi: 10.12720/joaat.2.1.1-7](http://doi:10.12720/joaat.2.1.1-7).
- Abdel-Aty, A.M., Salama, W.H., Hamed, M.B., Fahmy, A.S., & Mohamed, S.A., (2018). Phenolic-antioxidant capacity of mango seed kernels: therapeutic

- effect against viper venoms. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 28, 594–601, <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.06.008>.
- Altemimi, A., Watson, D.G., Choudhary, R., Dasari, M.R., & Lightfoot, D.A., (2016). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from peaches and pumpkins. *PLoS One* 11(2), e0148758, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0148758>.
- AOAC (2005). *Official Methods of Analysis* (18th edition) Association of Official Analytical, Chemists International, Maryland, USA.
- Arogba, S.S., & Omede, A., (2012). Comparative antioxidant activity of processed mango (*Mangifera indica*) and bush mango (*Irvingia gabonensis*) kernels. *Nigerian. Food Journal*. 30(2), 17-21, [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30029-1](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30029-1).
- Barreto, J.C., Trevisan, M.T.S, Hull, W.E., Erben, G. De Brito, E., Pfundstein, B., Wu Rtele, G., Spiegelhalder, B., & Owen, R.W., (2008). Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of. Agricultural. and Food Chemistry* 56, 5599–5610, <http://doi:10.1021/jf800738r>.
- Barros, H., D.F.Q., Baseggio, A.M., Angolin, J. C.F.F., Pastore, G.M., Cazarin, C.B.B., & Marostica, J.M.R., (2019). Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jabuticaba peel (*Plinia cauliflora*). *Food Research International*. 124, 16-26, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.010>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C., (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 8, 25-30, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J. C., (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10 (3), 178–182.
- Chen, S., Zeng, Z., Hu, N., Bai, B., Wang, H., & Suo, Y., (2018). Simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity of *Lycium ruthenicum* Murr. fruit using response surface methodology. *Food Chemistry*. 242(Supplement C), 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.105>.

- Chung, W.H., Ishii, H., Nishimura, K., Fukaya, M., Yano, K., & Kajitani, Y., (2006). Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Disease*. 90, 506–512, <http://doi/10.1094/PD-90-0506>.
- Da Silva Simão R., Oliveira de Moraes J., Gimenez de Souza P., Mattar Carciofi B.A., & Borges Laurindo J., (2019). Production of mango leathers by cast-tape drying: Product characteristics and sensory evaluation. *LWT- Food Science and Technology*. 99,45–452, <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.013>.
- Deng, J., Xu, Z., Xiang, Ch., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z., & Ding, Ch., (2017). Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrason. Sonochem*. 37, 328-334, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.023>.
- Dorta, E., Lobo, M.G., & González, M., (2012) Reutilization of mango by products: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*. 77, C80–C88, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02477.x>.
- Dorta E., González M., Lobo M.G., Sánchez-Moreno C., & de Ancos B., (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*. 57, 51–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.012>.
- Espinosa-Muñoz, V., Roldán-Cruz, C.A., Hernández-Fuentes, A.D., Quintero-Lira, A., Almaraz-Buendía, I., & Campos-Montiel, R.G., (2016). Ultrasonic-assisted extraction of phenols, flavonoids, and biocompounds with inhibitory effect against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* from cactus pear. *Journal of Food Process Engineering*. 40(2), e12358, <https://doi:10.1111/jfpe.12358>.
- Jasso De Rodríguez, D., Rodríguez-García, R., Hernández-Castillo, F.D., Aguilar-González, C.N., Sáenz-Galindo, A., Villarreal-Quintanilla, J.A., & Moreno-Zuccolotto, L.E., (2011). In vitro antifungal activity of extracts of Mexican chihuahuan desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*. 34, 960–966, <https://doi:10.1016/j.indcrop.2011.03.001>

- Jasso de Rodríguez D; Salas-Méndez., E. de J., Rodríguez-García R., Hernández-Castillo F.D., Díaz-Jiménez M.L.V., Sáenz-Galindo A., González-Morales S., Flores-López M.L., Villarreal-Quintanilla J.A., Peña-Ramos F.M., & Carrillo-Lomelí D.A. (2017). Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Industrial. Crops and Products*. 107,499–508, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.054>
- Jyotshna, Srivastava P., Killadi B., & Shanker K., (2015). Uni-dimensional double development HPTLC-densitometry method for simultaneous analysis of mangiferin and lupeol content in mango (*Mangifera indica*) pulp and peel during storage. *Food Chemistry*. 176, 91-98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.034>.
- Kaur, J., Rathinam, X., Kasi, M., Leng, K.M., Ayyalu, R., Kathiresan, S., & Subramaniam, S., (2010). Preliminary investigation on the antibacterial activity of mango (*Mangifera indica* L: Anacardiaceae) seed kernel. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 707-710, [https://doi:10.1016/S1995-7645\(10\)60170-8](https://doi:10.1016/S1995-7645(10)60170-8).
- Lima, N.B., Lima, W.G., Tovar-Pedraza, J.M., Michereff, S.J., & Cámara, M.P.S., (2015). Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *Eur. J. Plant Pathology* 141, 679-688.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang, X., Zhang, S., & Gong, G., (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific Reports*. 6, 32761, <http://dx.doi.10.1038/srep32761>.
- López-Cobo, A., Verardo, V., Diaz-de-Cerio, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez A., & Gómez-Caravaca, A.M. (2017). Use of HPLC- and GC-QTOF to determine hydrophilic and lipophilic phenols in mango fruit (*Mangifera indica* L.) and its by-products. *Food Research International*. 100, 423-434, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.008>.
- Maisuthisakul, P., & Gordon, M.H., (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food Chemistry*. 117, 332–341, <https://doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.010>.

- Martínez, G., Regente, M., Jacobi, S., Del Rio, M., Pinedo, M., & de la Canal, L., (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 140, 30–35, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.012>.
- Matkowski, A., Kuś, P., Góralska, E., & Woźniak, D., (2013). Mangiferin a bioactive xanthonoid not only from mango and not just antioxidant. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 13(3), 439-55, <http://dx.doi.10.2174/1389557511313030011>.
- Mirghani, M.E.S., Yosuf, F., Kabbashi, N.A., Vejayan, J., & Yosuf, Z.M.B., (2009). Antibacterial activity of mango kernel extracts. *Journal of Applied Sciences*., 9(17), 3013-3019, <http://dx.doi.10.3923/jas.2009.3013.3019>.
- Muller-Riebau, F., Berger, B., & Yegen, O., (1995). Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. . *Agricultural. Food Chemistry*. 43, 2262–2266, <https://doi.org/10.1021/jf00056a055>
- Mutua, J.K., Imathiu, S. & Owino, W., (2017). Evaluation of the proximate composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of mango seed kernel Extracts. *Food Science. Nutrition*. 5(2), 349–357, <http://dx.doi.10.1002/fsn3.399>.
- Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., Mckenzie, H.C. E., Chukeatirote, E., Jones, E.B.G., Bahkali, A.H., & Hyde, K.D., (2012). Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Cryptogamie. Mycology*. 33(3), 347-362, <https://doi.org/10.7872/crym.v33.iss3.2012.347>.
- Onyeani, C., & Osunlaja, S., (2012). Comparative effect of Nigerian indigenous plants in the control of anthracnose disease of mango fruits. *International. Journal. Scientific. Technology Research*. 1(5), 2277-8616.
- Osorio, E., Flores, M., Hernández, D., Ventura, J., Rodríguez R., & Aguilar C. N., (2010). Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush Leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial. Crops and Products*. 31,153–157, <https://doi:10.1016/j.indcrop.2009.09.017>.

- Patzke H., & Schieber A., (2018). Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate - ferulic acid as a natural pesticide against *Botrytis cinerea*. Food Research International. 113, 18–23, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.062>.
- Puravankara, D., Boghra, V., & Sharma, R.S., (2000). Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). Journal of the Science of Food and Agriculture. 80, 522-526.
- Ramić, M., Vidovic, S., Zekovic, Z., Vladic, J., Cvejin, A., & Pavlic, B., (2015). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. Ultrasonics Sonochemistry 23, 360–368, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.002>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical. Biology. & Medicine. 26(9/10), 1231– 1237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribeiro, S.M.R., Barbosa, L.C.A., Queiroz, J.H., Knodler, M., & Schieber, A., (2008). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. Food Chemistry. 110, 620–626, <http://doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.067>.
- Ribeiro, S., & Schieber, A., (2010). Bioactive compounds in mango (*Mangifera indica* L.). Bioactive. Foods Promoting. Health 34, 507–523, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00034-7>.
- Robinsón, W. B., & Stotz, E., (1945). The indophenol-xylene extraction method for ascorbic acid and modifications for interfering substances. Journal Paper 624, New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University.
- Rodríguez. Pedroso, A.T., Ramírez Arrebato M.A., Bautista Baños S., Cruz Triana A., & Rivero 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.
- Saad, H., Charrier-El-Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., & Ayet, N., (2012). Characterization of pomegranate peels tannin extractives.

- Industrial Crops and Products. 40,239-246, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.038>.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Kraithong, S., & Rawdkuen, S., (2015). Optimization of antioxidants and tyrosinase inhibitory activity in mango peels using response Surface methodology. *LWT - Food Science, Technology*. 64,742-749, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.003>.
- Sefu, G., Satheesh, N., & Berecha, G., (2015). Effect of essential oils treatment on anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease development, quality and shelf life of mango fruits (*Mangifera indica* L). *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 15, 2160-2169, [https://doi: 10.5829/idosi.aejaes.2015.15.11.96140](https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2015.15.11.96140)
- Shi, X., Li, B., Qin, G., & Tian, S., (2012). Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores. *Postharvest Biology. Technology*. 67, 138–143, [https://doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.01.003](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.01.003).
- Shivas RG, & Tan YP., (2009). A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity*. 39, 111–122.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.J.A., (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Sogi, S.D., Siddiq, M., Greiby, I., & Dolan, K.D., (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of ‘Tommy Atkins’ mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chemistry*. 141, 2649–655, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.053>.
- Shahbandeh, M., (2018). Mango* production worldwide from 2000 to 2017 (in million metric tons). <https://www.statista.com/statistics/577951/world-mango-production/> last accessed Sep 13, 2019.
- Tharanathan, R.N., Yashoda, H.M., & Prabha, T.N., (2006). Mango (*Mangifera indica* L.) the king of fruits: An overview. *Food Reviews. International*. 22, 95–123, [http://dx.doi.org/ 10.1080/87559120600574493](http://dx.doi.org/10.1080/87559120600574493).
- Torres-León, C., Rojas, R., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R., & Aguilar, C.N., (2017). Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization

assisted by microwave. *Food and Bioprocess Technology*. 105, 188–196, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.005>.

Vázquez-Celestino, D., Ramos-Sotelo, H., Rivera-Pastrana, D.M., Vázquez-Barrios, M.E., & Mercado-Silva, E.M., (2016). Effects of waxing, microperforated polyethylene bag, 1-methylcyclopropene and nitric oxide on firmness and shrivel and weight loss of 'Manila' mango fruit during ripening. *Postharvest Biology. Technology*. 111, 398–405, <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.030>.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D., (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9(2), 161–169, [https://doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014)

Womeni, H.M., Tonfack Djikeng, F., Iruku, N.S., Karuna, M.S., Prasad, R.B., & Linder, M., (2016). Valorization of soursop flowers (*Annona muricata* L.) as potent source of natural antioxidants for stabilization of palm olein during accelerated storage. *Food Science. Nutrition*. 4(6), 802–810, <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.349>.

Xu, D., Deng, Y., Han, T., Jiang, L., Xib, P., Wang, Q., Jiang, Z., & Gao, L., (2018). In vitro and in vivo effectiveness of phenolic compounds for the control of postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology. Technology*. 139, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.08.019>.

Yenjit, P., Issarakraisila, M., Intana, W., & Chantrapromma, K., (2010). Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu* against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in mango fruit. *Postharvest Biology. Technology*. 55, 129–132, [https://doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.09.003](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.09.003).

Yingngam, B., Monschein, M., & Brantner, A., (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* leaves using central composite design and evaluation of its protective ability against H₂O₂-induced cell death. *Asian Pac. J. Trop. Med*. 7(Supplement 1), S497–S505, [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60281-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60281-9).

4 PRIMER INFORME DE *COLLETOTRICHUM BREVISPORUM* ASOCIADO A ANTRACNOSIS AISLADO DE FRUTOS DE MANGO (*MANGIFERA INDICA* L.) EN MÉXICO

4.1 Resumen

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cultivos frutales más rentables del mundo y cualquier enfermedad que afecte su calidad debe ser reportada de inmediato ya que puede afectar su comercialización. Recientemente, en un huerto de mango Ataulfo ubicado en Tapachula, en el Estado de Chiapas, México, se observó una enfermedad similar a la antracnosis no descrita anteriormente. La enfermedad se caracterizó por lesiones hundidas de color marrón oscuro a negro, principalmente en frutos maduros. El patógeno aislado del tejido de mangos infectados se aisló en medio PDA. Todas las cepas produjeron micelios aéreos blancos que cambiaron de blanco grisáceo a gris. que estaban cubiertos de conidios de color salmón, que eran gutulados, hialinos, unicelulares, cilíndricos con ambos extremos redondeados y de paredes lisas. Con base en las características morfológicas, culturales y moleculares, el patógeno se identificó como *Colletotrichum brevisporum* y se confirmó mediante análisis filogenético. Los postulados de Koch fueron realizados en frutos de mango cv. Ataulfo, que se inocularon con una suspensión de los conidios del patógeno y se incubaron a 28 ° C, 96% HR durante 9 días. El desarrollo de la enfermedad se evaluó midiendo el diámetro de la lesión en las frutas y la identidad del patógeno se confirmó mediante un nuevo aislamiento e identificación. Este es el primer informe de *C. brevisporum* que causa antracnosis en frutos de mango en México.

Palabras clave: mango, *Colletotrichum brevisporum*; identificación molecular, informe de nueva enfermedad, gen de actina

⁵ Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Deysi Gómez Maldonado

Director de Tesis: Consuelo S.O. Lobato Calleros

4.2 Abstract

First report of *Colletotrichum brevisporum* associated with fruit anthracnose isolated from mango (*Mangifera indica* L.) in Mexico

Mango (*Mangifera indica* L.) is one the most profitable fruit crop worldwide and any disease affecting its quality must be immediately reported as it may affect its commercialization. Recently, in an Ataulfo mango orchard located in Tapachula, State of Chiapas, Mexico, an anthracnose-like disease not previously described was observed. The disease was characterized by sunken dark brown to black lesions, mainly on ripe fruits. The pathogen taken from infected mangoes tissue was isolated in PDA medium. All strains produced white, aerial mycelia that changed from grayish white to gray. They were covered with salmon-colored conidia, which were guttulate, hyaline, one celled, cylindrical with both ends rounded and smooth-walled. Based on the cultural, morphological, and molecular characteristics the pathogen was identified as *Colletotrichum brevisporum* and was confirmed with the phylogenetic analysis. Koch's postulates were performed on mango cv. Ataulfo fruits, which were inoculated with a suspension of the pathogen conidia and incubated at 28 °C, 96% RH for 9 d. The development of the disease was assessed by measuring the diameter of the lesion in the fruits and the pathogen identity was confirmed by re-isolation and identification. This is the first report of *C. brevisporum* causing anthracnose on mango fruits in Mexico.

Keywords: mango; *Colletotrichum brevisporum*; molecular identification, new disease report, actin gen

⁶Thesis: Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Deysi Gómez Maldonado

Advisor: PhD. Consuelo S.O. Lobato Calleros

4.3 Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) is cultivated in over 100 tropical countries and commercialized worldwide (Liu et al., 2019). It is the third most commercialized fruit with an estimated production of 50.65 million ton in 2017 (Shahbandeh, 2018). Recently, an anthracnose-like disease was observed on mango fruits cultivated in commercial orchards located in Tapachula, State of Chiapas, Mexico (14° 54" N and 92° 16" W). The disease was characterized by sunken dark brown to black lesions, mainly observed in the mature fruits. The disease was widely distributed in the mango trees population, and damage caused to fruits was severe. In this work, the incidence of the disease and the identification of the associated pathogen are informed.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Disease incidence and sampling place

In 2018, a study it was carried out in major mango producing regions in the State of Chiapas, Mexico. An anthracnose-like disease was observed in mango cv. Ataufo fruits grown in commercial orchards in the municipality of Tapachula (14° 54 "N and 92° 16" W). Symptoms were sunken dark brown to black lesions, observed mainly on ripe fruits. The incidence of the lesions was widely distributed in the orchard and caused serious damage to the fruit. Mango fruits were collected exhibiting typical anthracnose symptoms (Fig. 13) for further study.

4.4.2 Isolation and indetification of the pathogen

Colletotrichum sp. fungus was isolated from naturally infected mango fruits presenting the characteristic symptoms caused by anthracnose described above. Small cuts (5 x 5 mm) were performed in the infected areas of the fruits. The

portions were disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution (v/v) for 3 min, rinsed three times with sterilized water, and dried with sterile paper. Then were placed on Petri plates with Potato Dextrose Agar (PDA, Dicfo®, Becton Dickinson, France) culture medium and were incubated at 28 °C, for 72 h. Mycelial disks (5 mm diameter) were transferred from the edge of the aseptically active fungal growths to new Petri dishes with PDA culture medium and incubated at 28 °C, for 9 days. To obtain mono-sporic cultures, from pure cultures individual spores were taken and grown on PDA medium (Ong and Ali, 2015). The isolates were identified based on their morphological and cultural characters (Barnett and Hunter, 1998) and were conserved as suspension of spores and mycelial disks in 15% v/v glycerol at -80 ° C for further use. To study the conidial morphology, microscopic preparations of spores were made with 50% v/v glycerin from the 10-d-old colony on PDA and were observed in a compound microscope (Nikon Eclipse E400®, East Lyme, CT, USA). To determine the shape and size (length x width) of 50 conidia of each isolate, the Motic Image Plus v. 3.0 image analysis system was used (Motic Group Co®, Jiangsu, China). The mean and the standard deviation were calculated from the measure of the conidia. To study the morphology of the appressoria, microscopic preparations of spores were made with water from the 5-d-old colony on PDA and were observed in a compound microscope. The results of the measurements of the appressoria were expressed in micrometers and the mean and the standard deviation were calculated.

4.4.3 Molecular identification

The genomic DNA was extracted and purified directly from the colonies of 7-d-old cultures on PDA using the protocol of Lacap et al. (2003) with slight modifications. For the PCR amplifications the primers used were complete region (ITS) (White et al., 1990) and actin (ACT): ACT512F / ACT783R (Carbone and Kohn, 1999). The conditions used for cycle were initiated at 94°C for 5 min, then were used 35

cycles of denaturation (at 94 °C for 30 s), after an annealing (30 s at 52 °C for ITS and 56 °C for ACT), a elongation (72 °C for 90 s) and finally a extension (72 °C for 10 min). To purify the resulting PCR were used Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, WI, USA) or Purelink® Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher, Waltham. MA, USA). Purified DNA samples were sent to Macrogen Inc. (Seoul, Korea) for sequencing. To obtain a consensus sequence, the Sequences from forward and reverse primers were aligned. Sequences were used from National Center for Biotechnology Information Database (Bethesda, MD, USA) (Table 1) as reference. The sequences of isolates from ITS and ACT were searched in NCBI database to find phylogenetic relatives and Alignment and edition were carried out with the Biological Sequence Alignment Editor v. 7.05 (BioEdit©, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) (Hall, 1999). To confirm the specie a phylogenetic analysis was conducted using the combination of DNA sequences of several *Colletotrichum* spp. from GenBank database and the isolates obtained in this study. The aligning of sequences was performed using CLUSTALW program (University College, Dublin, Ireland) and phylogenetic tree was constructed by using Neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) method as implemented in MEGA 6.0 with Kimura model with 1000 bootstrap replications (Tamura et al., 2013).

4.4.4 Pathogenicity test

To determine pathogenicity of the fungal isolate Koch's postulates were performed. The surface of the mango fruits was washed with tap water, sterilized by immersion in a 1.0% sodium hypochlorite solution for 2 min, and rinsed three times with sterilized water. Then, the mangoes were inoculated making a wound with a sterile needle in the center of each fruit and was placed a spore suspension of the pathogen (10^5 spores/mL) (Ong and Ali, 2015). Mangoes inoculated only

with sterile distilled water served as control. The inoculated fruits were incubated in a moist plastic box with sterile moistened paper, hermetically sealed (28 °C and 96% RH) for 9 d. Disease developments of anthracnose disease were assessed by measuring the diameter of the lesion on mango fruits and was evaluated at regular periods until the development of characteristics symptoms, the pathogen was isolated again to confirm its identity based on cultural and morphological characteristics. The statistical differences were determined by the Significant Minimum Difference (LSD) test with $p \leq 0.05$ using the Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

4.5 Results

Anthracnose disease was characterized by sunken dark brown to black lesions, occurring mainly on ripe fruits. Fruits affected by anthracnose showed initially necrotic spots which later enlarged to form larger spots (Fig. 13). In the fruits the lesions measured 2 to 6 cm of diameter. In severely affected fruits total damage was observed. Macroscopic colony and micromorphology characteristics of the isolates were observed after growth on PDA at 28°C for 9 days. All strains produced aerial mycelia, white, that changed from grayish white to gray with salmon-colored conidia (Fig.14). The conidia were one celled, guttulate, cylindrical, hyaline with smooth-walled and both ends rounded (Fig.15). The sizes of conidia were 14.10 ± 0.94 (12.6 to 15.73) $\times$ 5.10 ± 0.49 (4.3 to 5.93) μm (length/width ratio = 2.76, n = 50). The appressoria size in slide culture was 8.1 (6.1 to 9.5 μm) $\times$ 5.73 (5-7.9 μm), typical of *Colletotrichum* spp. Based on the morphological characteristics, the pathogen was identified as *Colletotrichum brevisporum* (Barnett and Hunter, 1998; Sutton, 1992). This result agrees with those reported in the literature for *C. brevisporum* (Duan et al., 2018; Liu et al., 2016; Noireung et al., 2012). The DNA sequences of the internal transcribed

spacer (ITS-rRNA) and actin (ACT) gene were sequencing for accurately identify the specie of the pathogen. Successful amplification of expected amplicon size of 575 bp (ITS), and 276 bp (ACT) were detected. A BLAST search was conducted in the NCBI database, wich showed that the isolate sequences of the mango (GenBank accession nos. H88380 [ITS] and MK905412 [ACT], displayed 100% nucleotide identity to the respective gene sequences of *C. brevisporum* (ACT-CBS 129958: MG600967.1; CBS 129957: MG600966.1) and (ITS-KY651183.1). A phylogenetic analysis was carried using ACT and ITS sequences for *C. brevisporum* and other *Colletotrichum* species previosly published (Table 15) and Bayesian inference. The phylogenetic analysis of sequences of ITS and actin (ACT) showed that the fungal isolates from this work share a common clade of *C. brevisporum* that have reference sequences in the NCBI (Fig. 16). Therefore, the identity of the isolated pathogen was confrimed based on morphological and molecular analysis as *C. brevisporum*. Pathogenicity tests carried on mango fruits showed characteristic symptoms of the anthracnose after 6 days after inoculation. The inoculated fruits developed lesions sunken dark brown to black lesions, which later enlarged and coalesced to form larger areas. No symptom was observed on fruit treated with water (Fig. 17). Associated fungal pathogen, *C. brevisporum* was isolated again from mangoes with smiliar symtoms and morphological characteristics to those observed in the orchards, thus fulfilling Koch's postulates and based on morphological characteristics and molecular techniques its identity was confirmed. The experiment was repeated twice showing similar results. The sequences of the isolate obtained in this study was deposited in GenBank (ACT Accession Nos. MH88380 [ITS] and MK905412 [ACT]). *C. brevisporum* has been reported to infect papayas in Taiwan, Australia and Brazil (Duan et al., 2018; Shivas et al., 2016; Vieira et al., 2013) and peppers in China (Liu et al., 2016). To our knowledge, this is the first report of *C. brevisporum* causing mango fruit anthracnose in Mexico.

Table 15

GenBank sequences of *Colletotrichum* species along with their accession number used in phylogenetic analysis.

Species	Isolate	Host	GenBank Accsesion Numbers ^a	
			ITS	ACT
<i>Colletotrichum fruticola</i>	ICMP:18581	<i>Coffea arabica</i>	JX010165.1	JX009501.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MH757114	<i>Dracaena sanderiana</i>	-	MH757114.1
<i>Colletotrichum siamense</i>	LKGWF1601	<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	MK568561.1	MK568557.1
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	CBS 129958	<i>Anthurium</i> sp	MG600763.1	MG600967.1
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	TCHDACT	<i>Mangifera indica</i> L.	MH883805	MK905412

^a Sequences in Bold are from the present study.



Fig. 13. Typical anthracnose symptoms on fruits, leaf and branches on *Mangifera indica* L. var. Ataulfo; A – Healthy mango fruit; B – Diseased mango fruit; C – Diseased immature mango fruit; D –Anthracnose on leaves; E - Anthracnose on branches.

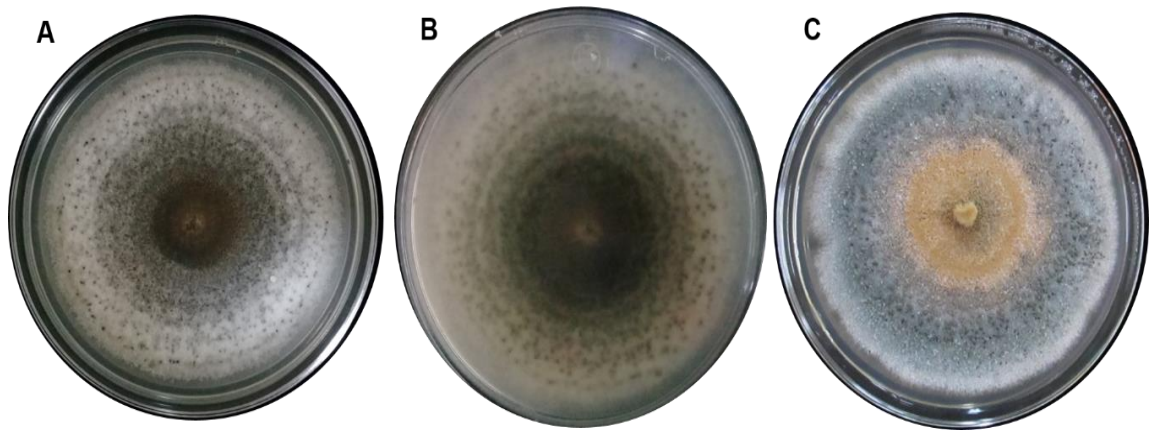


Fig. 14. Colony characteristics of *Colletotrichum brevisporum* on PDA medium after 7 y 10 days of after inoculation at 28°C (A and B, Top and inverse view to 7 d; C, Top view to 10 d).

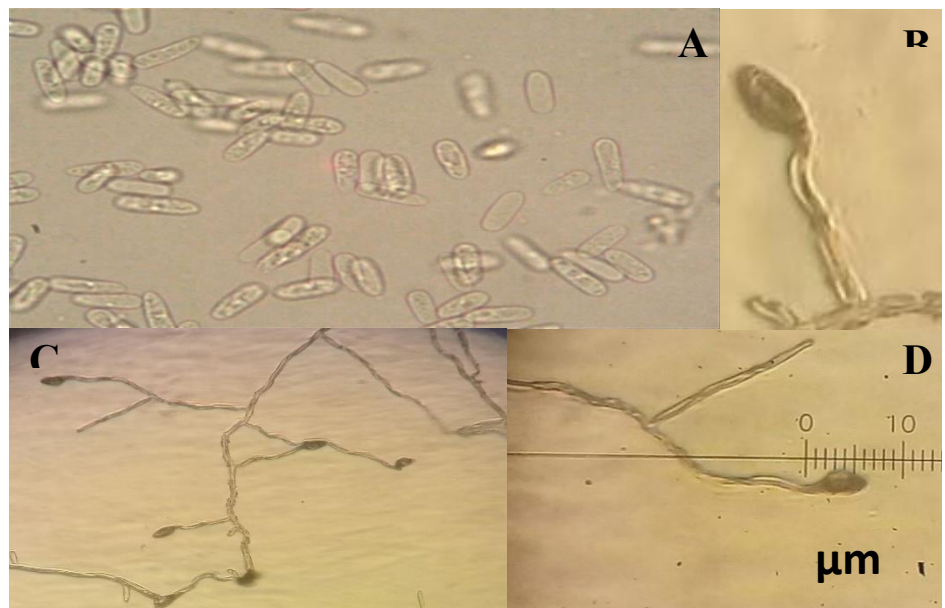


Fig. 15. Morphology of *Colletotrichum brevisporum*. A- Conidia. B-C-D Apresorios (Scale bar: 10 µm).

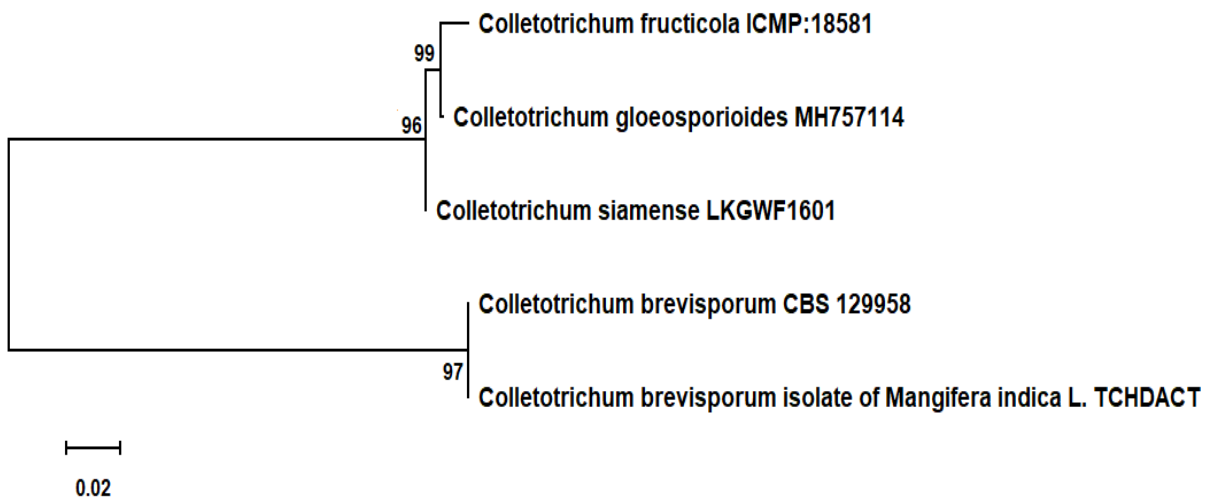


Fig. 16. Phylogenetic tree constructed by neighbour joining method inferred from combined ITS-rDNA & actin (ACT) gene, data sequences showing relationships among isolates of *Colletotrichum brevisporum* and related *Colletotrichum* species (Tamura-Nei Substitution model and nearest neighbour-interchange search options with 1000 bootstrap replicates were used).



Fig. 17. Pathogenicity test, anthracnose development in mango fruit after 6 and 9 day inoculation at 28 °C (A and B); C: fruit treated with water (control).

4.6 Discussion

In Mexico, the main mango producing states are Guerrero, Sinaloa, Nayarit, Chiapas, Michoacan and Oaxaca. Mexico is the fourth producer of mangoes worldwide and is the leading exporter (FAOSTAT, 2017). The potential export market for mango demands that the different fruit varieties such as ‘Tommy Atkins’, ‘Ataulfo’, ‘Keitt’, ‘Haden’, ‘Kent’, among others, have good visual quality (free of defects), regular size and good firmness. Anthracnose disease caused by the genus *Colletotrichum* impairs the quality of the fruits, affecting their commercialization and generating significant economic losses for the producers (Sefu *et al.*, 2015). This genus is important because have a wide range of hosts in the tropicals regions of the world (He *et al.*, 2016; De Silva *et al.*, 2017; Saini *et*

al., 2017). It has been reported that posharvest anthracnose disease is caused not only by *Colletotrichum gloeosporioides* but also by other *Colletotrichum* species as *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. brevisporum*, *C. truncatum* and *C. scovillei* (Jayawardena et al., 2016; Liu et al., 2016; Shivas et al., 2016; Noireung et al., 2012). There are many problems for the Identification of genus *Colletotrichum* based only in the morphological characteristics due to the few traits that can be used to separate one specie of another (Phoulivong et al., 2010; Cai et al., 2011; Weir et al., 2012). Thus, it is not possible to differentiate among *Colletotrichum* species considering solely the symptoms developed in the field and morphological traits of the *vitro* cultures (Sutton, 1992). For this reason, to identification of *Colletotrichum* species have become very important the use of molecular characteristics (Cai et al., 2009; Hyde et al., 2010; Phoulivong et al., 2010). The most sequenced region is the internal transcribed spacer (ITS), but in the case of the genus *Colletotrichum*, ITS sequences alone cannot be used for their identification and particularly for the separation the *C. gloeosporioides* species (Cai et al., 2009). In the present study, besides ITS-rDNA, also actin (ACT) gen was used for identifying *C. brevisporum* to support the morphologic a cultural identification of the pathogen. The association of this new fungal pathogen was identified and the disease was diagnosed on mango fruits.

Anthracnose is causing severe damage to pre- and postharvest mango fruits, so that more studys must be carried out for understanding the degree of genetic diversity of *C. brevisporum*, with the aim provide insights into the ability of this species to evolve in response to environmental conditions, facilitating the design of effective fungal disease control strategies for mango fruits. To our knowledge, this is the first report of *C. brevisporum* causing anthracnose disease on mango fruits in Mexico.

Acknowledgements

Authors extend their thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship of Deysi Gómez-Maldonado.

Conflicts of interest

No conflict of interest is declared.

References

- Barnett, H.L., Hunter, B., 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi , fourth ed. American Phytopathological Society Press,. St. Paul, MN.
- Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P., Weir, B. S., Waller, J. M., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., McKenzie, E. H. C., Johnston, P. R., 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Divers. 39, 183–204.
- Cai, Lei, Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Maharachchikumbura, S. S. N., McKenzie, E. H. C., Guo, L. D., Liu, X. Z., Bahka, A., Hyde, K. D., 2011. The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. Trop. Plant Pathol. 36(4), 205–213. DOI: 10.1590/S1982-56762011000400001
- Carbone I., Kohn, L. M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91, 553–556. DOI: 10.2307/3761358
- De Silva, D. D., Ades, P. K., Crous, P. W., Taylor, P. W. J., 2017. *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Australia. Plant Pathol. 66(2), 254–267. DOI: 10.1111/ppa.12572
- Duan C. H, Pan H. R, Wang, C. C., 2018. First report of *Colletotrichum brevisporum* causing anthracnose on papaya in Taiwan. Plant Dis. 11. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0377-PDN
- FAOSTAT, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (accessed 02.11.19)

- Hall, T. A., 1999. Bioedit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- He, Y., Chen, Q., Shu, C., Yang, M., Zhou, E., 2016. *Colletotrichum truncatum*, a new cause of anthracnose on Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) in China. *Trop. Plant Pathol.* 41, 183–192. DOI: 10.1007/s40858-016-0086-4
- Hyde, K. D., Chomnunti, P., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Damm, U., Ko Ko, T. W., Shivas, R. G., Summerell, B. A., Tan, Y. P., 2010. A case for re-inventory of Australia’s plant pathogens. *Persoonia* 25, 50–60. DOI: 10.3767/003158510X548668
- Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Damm, U., Cai, L., Liu, M., Li, X. H., Zhang, W., Zhao, W.S., Yan, J. Y., 2016. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7(8), 1192–1260. DOI: 10.5943/mycosphere/si/2c/9
- Lacap, D. C., Hyde, K. D., Liew, E. C. Y., 2003). An evaluation of the fungal “morphotype” concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Divers.* 12, 53–66.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang, X., Zhang, S., Gong, G., 2016. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Sci. Rep.* 6(April), 1–17. DOI: 10.1038/srep32761
- Liu, Y., Chen, S., Pu, Y., Muhammad, A. I., Hang, M., Liu, D., Ye, T. , 2019. Ultrasound-assisted thawing of mango pulp: Effect on thawing rate, sensory, and nutritional properties. *Food Chem.* 286, 576–583. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.02.059
- Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Jones, E. B. G., Bahkali, A. H., Hyde, K. D., 2012. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Cryptogamie, Mycol.* 33, 347–362. DOI: 10.7872/crym.v33.iss3.2012.347
- Ong, M. K., Ali, A., 2015. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Tec.* 100, 113–119. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2014.09.023
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., Hyde, K. D., 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Divers.* 44, 33–43. DOI: 10.1007/s13225-010-0046-0
- Saini, T. J., Gupta, S. G., Anandalakshmi, R., 2017. Detection of tomato anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in India. *Australa. Plant Dis. Notes* 12(1), 10–12. DOI: 10.1007/s13314-017-0271-4

- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4), 406-425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sefu, G., Satheesh, N., Berecha, G., 2015. Effect of essential oils treatment on anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease development, quality and shelf life of mango fruits (*Mangifera indica* L.). *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 15, 2160–2169. DOI: 10.5829/idosi.ajeaes.2015.15.11.96140
- Shahbandeh, M., 2018. Mango production worldwide from 2000 to 2017 (in million metric tons). Retrieved from <https://www.statista.com/statistics/577951/world-mango-production/> last accessed Sep 13, 2019. %0A%0A
- Shivas, R. G., Tan, Y. P., Edwards, J., Dinh, Q., Maxwell, A., Andjic, V., Liberato, J. R., Anderson, C., Beasley, D. R., Bransgrove, K., Coates, L. M., Cowan, K., Daniel, R., Dean, J. R., Lomavatu, M. F., Mercado-Escueta, D., Mitchell, R. W., Thangavel, R., Tran-Nguyen, L. T. T., Weir, B. S., 2016. *Colletotrichum* species in Australia. *Australas. Plant Pathol.* 45, 447–464. DOI: 10.1007/s13313-016-0443-2
- Sutton, B. C., 1992. The genus *Glomerella* and anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A., Jear, M.J. (Eds.), *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. CABI, Wallingford, pp. 1 – 26.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
- Vieira, W. A. S., Nascimento, R. J., Michereff, S. J., K. D., Câmara, M. P. S., 2013. First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. *Plant Dis.* 97(12), 1659. DOI: 10.1094/PDIS-05-13-0520-PDN
- Weir, B. S., Johnston, P. R., Damm, U., 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73, 115–180. DOI: 10.3114/sim0011
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.

5 CONCLUSIONES GENERALES

El hongo asociado a la antracnosis de frutos de mango Ataulfo en Tapachula, Chiapas, se identificó mediante caracterización morfológica, cultural y el uso de técnicas moleculares. Lo anterior permitió la formación de un grupo totalmente diferente a los demás (formado por una especie distinta) y con la secuenciación de la región ITS y el gen actina (ACT), se identificó al patógeno como *Colletotrichum brevisporum*. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de *C. brevisporum* que causa la enfermedad de antracnosis en las frutas de mango en México.

El género *Colletotrichum* asociado a la enfermedad de antracnosis es un hongo fitopatógeno importante conocido por su amplia gama de huéspedes en las zonas más cálidas y húmedas del mundo y su identificación basada en la morfología es problemática debido a los pocos rasgos morfológicos que pueden usarse para separar especies. Además, es difícil diferenciar entre las especies de *Colletotrichum* basándose únicamente en los síntomas observados en el campo y en las características morfológicas de los cultivos *in vitro*. Por esta razón, las características moleculares se han vuelto cada vez más importantes en la identificación de especies de *Colletotrichum* siendo insuficiente la utilización del espaciador transcrito interno (ITS- rDNA), que es la región más ampliamente secuenciada, por lo que para apoyar la identidad del patógeno es necesario la amplificación de otros genes como actina parcial o β -Tubulina, etc.

La antracnosis está causando daños severos a las frutas de mango antes y después de la cosecha, por lo que se deben realizar más investigaciones para comprender el grado de diversidad genética dentro del género *Colletotrichum*, y en particular con *C. brevisporum*, que proporcionará información sobre la

capacidad de esta especie para evolucionar en respuesta a las condiciones ambientales. De esta manera, se puede postular e implementar el diseño de estrategias efectivas de control de enfermedades fúngicas para las frutas de mango.

Este trabajo informa por primera vez las propiedades antifúngicas y la composición fenólica de un extracto etanólico de almendra de mango Manila optimizado (contenido fenólico más alto y actividad antioxidante), MKE, el cual a una concentración de 3 g / L fue capaz de suprimir totalmente el diámetro de la lesión de la enfermedad de antracnosis después de 9 días en ensayos *in vivo*. Asimismo, el crecimiento micelial se inhibió en un 100% después de 9 días y la germinación de esporas fue nula después de 20 h. El uso de MKE dio como resultado un mejor control de antracnosis del mango en poscosecha que el fungicida comercial Tiabendazol a la dosis recomendada (2 g / L).

La actividad antifúngica demostrada por el MKE podría atribuirse a la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, que exhiben una amplia gama de actividades biológicas. Los principales compuestos fenólicos en MKE fueron mangiferina, ácido clorogénico, miricetina, ácido ferúlico, quercetina, rutina y ácido cafeico. Los mecanismos de acción de estos compuestos contra los microorganismos son variables, ya que la actividad anfúngica de algunos fenoles se ha asociado a la inhibición enzimática producida a través de su oxidación, mientras que los taninos inhiben la síntesis de proteínas en la célula, por lo que una mayor concentración de compuestos fenólicos en MKE promueve una mayor actividad antioxidante, que a su vez promueve una mayor actividad antifúngica.

6 APÉNDICES

6.1 Comprobante de registro de secuencia de AND de *Colletotrichum brevisporum*, aislado en este estudio. ITS (espaciador transcrito interno).

Colletotrichum brevisporum strain TCHD 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MH883805.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MH883805 575 bp DNA linear PLN 31-MAR-2019
DEFINITION Colletotrichum brevisporum strain TCHD 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MH883805
VERSION MH883805.1
KEYWORDS .
SOURCE Colletotrichum brevisporum
ORGANISM [Colletotrichum brevisporum](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellales; Glomerellaceae; Colletotrichum.
REFERENCE 1 (bases 1 to 575)
AUTHORS Gomez-Maldonado,D., Lobato-Calleros,C., Leyva-Mir,S.G., Vernon-Carter,E.J., Aguirre-Mandujano,E. and Robles-Yerena,L.
TITLE Antifungal activity of mango seed extract (Mangifera Indica) cv. Manila against Colletotrichum sp. in vitro and in mango fruits
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 575)
AUTHORS Gomez-Maldonado,D., Lobato-Calleros,C., Leyva-Mir,S.G., Vernon-Carter,E.J., Aguirre-Mandujano,E. and Robles-Yerena,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-SEP-2018) Posgrado En Ciencia y Tecnologia Agroalimentaria, Universidad Autonoma Chapingo, Carretera Mexico-Texcoco Km 38.5, Texcoco, Estado de Mexico 56230, Texcoco
REFERENCE 2 (bases 1 to 575)
AUTHORS Gomez-Maldonado,D., Lobato-Calleros,C., Leyva-Mir,S.G., Vernon-Carter,E.J., Aguirre-Mandujano,E. and Robles-Yerena,L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-SEP-2018) Posgrado En Ciencia y Tecnologia Agroalimentaria, Universidad Autonoma Chapingo, Carretera Mexico-Texcoco Km 38.5, Texcoco, Estado de Mexico 56230, Texcoco
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..575
/organism="Colletotrichum brevisporum"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="TCHD"
/host="Mangifera indica"
/db_xref="taxon:1125787"
[misc_RNA](#) <1..>575
/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gtaacaaggt ctccgttggt gaaccagcgg agggatcatt atcgagttac cgctccttat
61 aaccttttgt gaacatacct caaacgttgc ctccggcgggc agccggagcc cagctccggc
121 gcccgagacc gccttctcgg cgcgcccac ccgccggcgg accactaaac tctattgcaa
181 cgactctctc tctgagtggt acaagcaaat aatcaaaact tttaaacacg gatctcttgg
241 ttctggcatc gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag
301 tgaatcatcg aatctttgaa cgcacattgc gcccgccagc attctggcgg gcatgcctgt
361 tcgagcgta tttcaaccct caagcaccgc ttggcgttgg ggccctacgg cttccgtagg
421 cccgaaata cagtggcgga ccctcccgga gcctcctttg cgtagtaaca taccacctcg
481 cactggggtc cggaggggact cctgccgtaa aaccccccaa tttatcaagg ttgacctcgg
541 atcaggtagg aatacccgct gaacttaagc atatg
//

6.2 Comprobante de registro de secuencia de *Colletotrichum brevisporum*, aislado en este estudio. Amplificación del gen de ACTINA PARCIAL (ACT).

Colletotrichum brevisporum isolate TCHDACT actin (ACT) gene, partial cds

GenBank: MK905412.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

LOCUS MK905412 276 bp DNA linear PLN 11-SEP-2019

DEFINITION Colletotrichum brevisporum isolate TCHDACT actin (ACT) gene, partial cds.

ACCESSION MK905412

VERSION MK905412.1

KEYWORDS

SOURCE Colletotrichum brevisporum

ORGANISM [Colletotrichum brevisporum](#)

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellales; Glomerellaceae; Colletotrichum.

REFERENCE 1 (bases 1 to 276)

AUTHORS Gomez-Maldonado,D., Lobato-Calleros,C., Vernon-Carter,E., Aguirre-Mandujano,E. and Leyva-Mir,S.

TITLE Antifungal activity of mango seed extract (Mangifera Indica) cv. Manila against Colletotrichum sp. in vitro and in mango fruits

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 276)

AUTHORS Gomez-Maldonado,D., Lobato-Calleros,C., Vernon-Carter,E., Aguirre-Mandujano,E. and Leyva-Mir,S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-MAY-2019) Departamento de Agroindustrias, Universidad Autonoma Chapingo, Km 38 5 Carr Mexico-Texcoco, Texcoco 56230, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers

```

source          1..276
                 /organism="Colletotrichum brevisporum"
                 /mol_type="genomic DNA"
                 /isolate="TCHDACT"
                 /db_xref="taxon:1125787"
gene            <1..>276
                 /gene="ACT"
mRNA            join(<1..50,152..182,244..>276)
                 /gene="ACT"
                 /product="actin"
CDS             join(<1..50,152..182,244..>276)
                 /gene="ACT"
                 /codon_start=2
                 /product="actin"
                 /protein_id="OEM34245.1"
                 /translation="MCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHHGIMIGMQKDS"

```

ORIGIN

```

1 tatgtgcaag gccggtttcg ccggtgacga tgcgccaga gctgtcttc gtaagtctt
61 ccgcctgcag accgcaatct cgccttcgca gggggcatcg agatttgagg ccggttccg
121 ctgcacact tggatgctga cagcttcgca gcctccatt ttggtcgccc tcgccaccat
181 ggggtatgtt cctctgcgcg cggcaatttc tcgcgtttcc gtcgcctcct aacaaatggg
241 cagtatcatg attggtatgg gccagaagga ctgcta

```

//

6.3 Artículo publicado

LWT - Food Science and Technology 126 (2020) 109337



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt



Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose



Deysi Gómez-Maldonado^a, Consuelo Lobato-Calleros^{b,*}, Eleazar Aguirre-Mandujano^b,
S. Gerardo Leyva-Mir^c, Leticia Robles-Yerena^c, E. Jaime Vernon-Carter^d

^a Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera Mexico-Tezcoco, 56230, Tezcoco, Mexico

^b Departamento de Preparación Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera Mexico-Tezcoco, 56230, Tezcoco, Mexico

^c Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera Mexico-Tezcoco, 56230, Tezcoco, Mexico

^d Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, DF, 09340, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Mango kernel extract
Antioxidant activity
Colletotrichum brevisporum
In vitro antifungal activity
Mango fruits
In vivo antifungal activity

ABSTRACT

Mango cv. Manila kernel ethanolic extract (MKE) was assessed *in vitro* and in mango cv. Ataulfo fruits for antifungal activity against *Colletotrichum brevisporum*. An optimum MKE with a total phenolic content of 461.7 mg gallic acid equivalents/g and DPPH[•] antioxidant activity of 2919.0 μ mol Trolox equivalents/g was obtained by applying high intensity ultrasound, using a solid/liquid of 1/20 g/mL and a sonication time of 30 min. The major phenolic compounds in MKE were mangiferin, chlorogenic acid, myricetin, ferulic acid, quercetin, rutin and caffeic acid. *In vitro* studies revealed that MKE at 3 g/L produced a mycelial growth inhibition of 100% after 9 d and a spore germination of 0% after 20 h. In contrast, the recommended dosage (2 g/L) of the commercial fungicide thiabendazole achieved a mycelial growth inhibition of 67.6% and a spore germination of 51.4% for the same times. Mango fruits immersed in MKE (3 g/L) aqueous solution for 20 min and inoculated with *C. brevisporum* (10^5 spores/mL) presented disease lesions of 0 mm, while when immersed in thiabendazole (2 g/L) the disease lesions were of 4.5 mm, both after 9 d. Thus, MKE may be considered as effective antifungal agent.