



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Extracto polifenólico de hojas de mango (*Mangifera indica* L.): Caracterización y actividad antifúngica *in vitro*

Polyphenolic extract of mango leaves (*Mangifera indica* L.): Characterization and *in vitro* antifungal activity

Domínguez-Ruvalcaba, J.E., Calderón-Santoyo, M., González-Gutiérrez, K.N., Ragazzo-Sánchez, J.A.*

Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico 2595, Tepic, Nayarit, C.P. 63175, México.

jeemdominguezru@ittec.edu.mx; mcalderon@tecni.mx; kanagonzalezgu@ittec.edu.mx; jragazzo@tecni.mx*

Innovación tecnológica: Obtención de un extracto polifenólico a partir de hojas de mango.

Área de aplicación industrial: Obtención de fungicidas naturales.

Recibido: 24 octubre 2024

Aceptado: 20 mayo 2025

Abstract

The growing search for natural and environmentally friendly fungicides has led to research into the use of agro-industrial by-products. Mango leaves, obtained from orchard pruning, are an important source of high biological value compounds (HBVC) with possible antifungal activity. This study aimed to evaluate the feasibility of using a mango leaf extract obtained by ultrasound to inhibit phytopathogens that infect fruits of commercial interest. To obtain the extract, ultrasound was applied at different extraction times (10, 20, and 30 min) and the antioxidant capacity, total soluble phenols, and total flavonoids were evaluated. The phytochemical identification of the extract was performed with an HPLC-UV/VIS and the antifungal activity against *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* was assessed. The extraction for 30 min allowed obtaining a higher quantity of polyphenols (305.92 ± 3.52 mg. eq. trolox, 141.35 ± 3.18 mg GAE, 18.95 ± 0.66 mg. eq. rutin, for antioxidant capacity, total soluble phenols and total flavonoids, respectively). The compounds identified were mangiferin and chlorogenic, hydroxybenzoic, caffeic, and coumaric acids. A

complete inhibition of *P. digitatum* and *B. cinerea* was obtained at concentrations of 20.51 and 9.35 mg/mL of extract, respectively. Mango leaf extract is an important source of CAVB with good antifungal capacity against fungi of commercial interest. This suggests its potential use as a natural alternative to conventional fungicides, offering a safe option for fruit treatment in the postharvest stage.

Keywords: Agroindustrial byproduct, Antifungal capacity, Phytochemical composition, Ultrasound-assisted extraction.

Resumen

La creciente búsqueda de fungicidas naturales y amigables con el ambiente ha causado que las investigaciones se dirijan hacia el aprovechamiento de los subproductos agroindustriales. Las hojas de mango, obtenidas de la poda de los huertos, son una fuente importante de compuestos de alto valor biológico (CAVB) con posible actividad antifúngica. El objetivo del estudio fue evaluar la viabilidad del uso de un extracto de hojas de mango obtenido por ultrasonido en la inhibición de fitopatógenos que infectan frutos de interés comercial. Para obtener el extracto se aplicó ultrasonido a diferentes tiempos (10, 20 y 30 min) y se evaluó la capacidad antioxidante, fenoles solubles totales y flavonoides totales. La identificación fitoquímica del extracto se realizó mediante HPLC-UV/VIS y se evaluó la actividad antifúngica frente a *Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*. La extracción por 30 min permitió obtener mayor cantidad de polifenoles (305.92 ± 3.52 mg. eq. trolox, 141.35 ± 3.18 mg EAG y 18.95 ± 0.66 mg eq. rutina, para capacidad antioxidante, fenoles solubles totales y flavonoides totales, respectivamente). Los compuestos identificados fueron mangiferina y el ácido clorogénico, hidroxibenzoico, cafeico y cumárico. Se obtuvo una inhibición total de *P. digitatum* y *B. cinerea* a concentraciones de 20.51 y 9.35 mg/mL de extracto, respectivamente. El extracto de hojas de mango es una fuente importante de CAVB con buena capacidad antifúngica contra hongos de interés comercial. Esto sugiere su potencial uso como una alternativa natural a los fungicidas convencionales, ofreciendo una opción segura para el tratamiento de frutos en la etapa de poscosecha.

Palabras clave: Capacidad antifúngica, Composición fitoquímica, Extracción asistida por ultrasonido, Subproducto agroindustrial.

1. Introducción

México es un importante productor de mango a nivel mundial, donde el 90% de su superficie sembrada se encuentra en Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Nayarit (1). Por cultivar se obtienen cerca de 58 kg de hojas secas (2). A estas hojas se les han identificado compuestos de alto valor biológico (CAVB). Los CAVB pueden ser enzimas,

microorganismos y metabolitos secundarios con actividad biológica benéfica en los seres vivos (3). Algunos de los metabolitos que se encuentran en las hojas de mango son compuestos fenólicos como benzofenonas, flavonoides, terpenoides y xantonas (4). Existen técnicas mediante las cuales se pueden aislar estos compuestos, como los métodos de extracción modernos (5). Entre

las tecnologías de extracción destaca la extracción asistida por enzimas, microondas y por ultrasonido (EAU) (6). Estas tecnologías presentan ventajas, como la reducción en el uso de disolvente, un menor tiempo de extracción y mayor rendimiento en comparación con los métodos de extracción convencionales.

La EAU crea ondas que viajan a través del disolvente, las cuales producen ciclos de compresión y expansión que inducen el fenómeno de cavitación (7). La cavitación genera microburbujas que al exceder un diámetro crítico explotan y aumentan la temperatura del medio (8). Este fenómeno logra fragmentar y generar poros en la célula vegetal, provocando una mayor difusión de solutos al solvente de extracción (9,10). Al variar las condiciones de frecuencia, potencia, temperatura y polaridad del disolvente, varía la cantidad y calidad de los CAVB obtenidos (10).

Los compuestos fenólicos reportados en las hojas de mango son efectivos para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos (11). Recientemente, se ha utilizado un extracto acuoso y etanólico para inhibir el crecimiento micelial de *Penicillium oxalicum* (12). Los compuestos fenólicos pueden causar la despolimerización de la membrana plasmática, fuga del citoplasma y daño al material genético, ocasionando la muerte del hongo fitopatógeno (13). Sin embargo, no existen reportes sobre la efectividad de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de mango frente a hongos como *Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*. La exploración del potencial antifúngico del extracto de hojas de mango contra estos patógenos es importante debido a que *P. digitatum* y *B. cinerea* son los responsables de la enfermedad del moho verde (14) y moho gris (15) en frutos de naranja y arándano, respectivamente. Estas enfermedades generan grandes desperdicios,

pérdidas poscosecha y disminución de la calidad de la fruta, lo que se traduce en grandes pérdidas económicas. Para solucionar este creciente problema, es importante investigar métodos de control de fitopatógenos poscosecha novedosos, no tóxicos y ecológicos. Por lo tanto, la investigación tuvo como objetivo obtener un extracto de hojas de mango y evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento de *P. digitatum* y *B. cinerea*, en frutos de importancia económica a nivel mundial.

2. Materiales y métodos

2.1 Material vegetal

Las hojas de mango var. Ataulfo fueron recolectadas en huertos ubicados en estación Pani (Nayarit, México, latitud 21.736944, longitud -105.006111). Las hojas fueron limpiadas, lavadas y deshidratadas en un horno convectivo (Nova Tech, CA-550, Jalisco, México) a 40 °C por 24 h. Después, las hojas se pulverizaron con un molino eléctrico (Gustark, 2000, Ciudad de México, México). El polvo se tamizó en una malla 100 (0.150 mm) y se almacenó a temperatura ambiente.

2.2 Obtención del extracto de hojas de mango mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU)

El extracto de hojas de mango se obtuvo mediante EAU con un baño de ultrasonido Kendal (CD4820, Eaton Sacon, Reino Unido). La muestra en polvo se mezcló con etanol-agua (4:1) en una relación 1:10 (g de muestra:mL solvente). La muestra se trató por 10, 20 y 30 min a 25 ± 1 °C y 42 kHz. Para la separación del solvente y la muestra, el extracto obtenido se filtró con un papel Wattman # 100 y con una bomba de vacío. Por último, al filtrado se le removió el solvente con un rota-evaporador de vacío a 55 ± 1 °C (RV10 Basic, IKA, Staufen, Alemania). Para determinar el rendimiento de extracción, la muestra se secó en una

termobalanza (MA35, Sartorius, Gotinga, Alemania) y se calculó de acuerdo a la ecuación 1 (16). Para las siguientes determinaciones se utilizó el extracto húmedo.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Sólidos solubles}}{\text{Gramos de muestra}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

2.3 Determinación fitoquímica del extracto de hojas de mango

2.3.1 Determinación de la actividad de radicales libres ABTS⁺

El ensayo de ABTS⁺ se realizó de acuerdo al método descrito por (17). La solución madre de radical ABTS⁺ a 7mM de reactivo (2, ácido 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) con 2.45 mM de persulfato de potasio, se mantuvo en oscuridad por 16 horas. La solución madre se diluyó en agua desionizada y se ajustó a una absorbancia de 0.70 ± 0.020 a 734 nm. Después, 50 μ L de extracto se mezclaron con 950 μ L de la solución de trabajo ABTS⁺ y se almacenó en oscuridad por 8 min. Los valores de absorbancia se midieron a 734 nm usando un espectrofotómetro (Cary 50 Bio UV-VIS, Varían, Sídney, Australia). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de trolox. Por otra parte, se determinó el valor de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), la cual se definió como la concentración de extracto de hoja de mango (mg/mL) necesaria para alcanzar el 50% de actividad antioxidante. La CI₅₀ se determinó a partir de la ecuación de regresión lineal de la curva que representa la actividad antioxidante frente a la concentración de la muestra (18).

2.3.2 Determinación de fenoles solubles totales

Los compuestos fenólicos se determinaron mediante un método espectrofotométrico (19). Una alícuota de 50 μ L de cada tiempo de extracción se mezcló con 1 mL de agua desionizada y 0.5 mL de reactivo de Folin-

Ciocalteu. Posteriormente, se le añadieron 2.5 mL de solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20%. La mezcla se dejó en oscuridad durante 20 min. Se midió la absorbancia a 735 nm usando un espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (0.05-0.5 mg/mL) para cuantificar los compuestos fenólicos presentes en el extracto, los resultados se presentaron como mg equivalentes de ácido gálico/g muestra.

2.3.3 Determinación de flavonoides totales (FT)

Para realizar la curva de calibración de los FT, 1 mL de solución de tricloruro de aluminio (20 g en 1 L de etanol al 95%) se mezcló con 1 mL de solución de rutina (0.05 g de rutina en 100 mL de etanol) y 50 μ L de ácido acético. La mezcla se aforó a 25 mL con etanol. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 40 min y se leyó la absorbancia a 415 nm. Para determinar los FT se reemplazó la solución de rutina por el extracto (20). Los resultados se expresaron en mg eq. rutina.

2.4. Determinación de la composición fitoquímica del extracto de hojas de mango por HPLC-UV/VIS

Los compuestos se identificaron con un HPLC 1525 (Water, Massachusetts, USA) con una bomba binaria y detector UV. La separación se llevó a cabo en una columna C-18/ODSHXPERSIL (5 μ m y 250 \times 4.6 μ m). La elución del gradiente se programó como fase móvil A (3% de ácido acético en agua grado HPLC) y fase móvil B (acetonitrilo). Se inyectaron 10 μ L de muestra a una velocidad de 1 mL/min por 20 min. El gradiente cambió siguiendo estas condiciones inicio: 90% del gradiente A y 10% del gradiente B, después de 6 min: 20% de solvente A y 80% de B, seguido de 14 min con 90% A y 10% de B. Todas las muestras se detectaron a 254 nm (21). Para la identificación de los compuestos

se comparó el tiempo de retención de los picos con estándares auténticos: ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumárico y mangiferina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Para cada estándar se realizó una curva de calibración.

2.5 Evaluación de la actividad antifúngica y concentración mínima inhibitoria del extracto de hojas de mango

2.5.1 Preparación de los hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos evaluados en este estudio fueron aislados y caracterizados previamente: *P. digitatum* (Número de acceso: CECT21108) de naranja (*Citrus sinensis*) y *B. cinerea* (Número de acceso: PP377694) de fruto de arándano (*Vaccinium corymbosum*) fueron criopreservados en glicerol al 80% (v/v) a -80 °C hasta su uso. Cada hongo fue cultivado individualmente en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (APD) (BD Bioxon, Estado de México, México) e incubado durante 7 días a 28 °C. La suspensión de esporas de cada hongo se preparó a partir de cultivos de 8 días de antigüedad, a los cuales se le añadieron 10 mL de solución estéril de NaCl al 0.85% y se rasparon con un asa estéril. El líquido se filtró con una gasa estéril y se recuperó en un tubo cónico. La concentración de esporas se ajustó a 1×10^5 esporas/mL con un hemocitómetro (22).

2.5.2 Evaluación antifúngica *in vitro*

Se evaluó la actividad antifúngica del extracto contra *B. cinerea* y *P. digitatum*. Al APD se le agregaron diferentes concentraciones de extracto (2.5, 5, 7.5 y 10 mg/mL) y se dejó solidificar. Se realizó un orificio de 7 mm en el centro de las placas y se inoculó un plug de micelio o 50 µL de suspensión de esporas de cada hongo fitopatógeno. Las placas se incubaron durante 7 días a 28 °C. El diámetro de crecimiento se

registró por 7 días y como control se consideró el diámetro de los hongos cultivados sin extracto (16). El porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo con la ecuación 2:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[\frac{dc-dt}{dc} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde: (dc) es el diámetro de la colonia fúngica en ausencia de extracto y (dt) es el diámetro de la colonia fúngica en presencia de las diferentes concentraciones de extracto.

2.5.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para calcular la CMI, los valores de la ecuación lineal se obtuvieron graficando el diámetro de crecimiento micelial frente a la concentración del extracto. En una relación lineal el diámetro de crecimiento del fitopatógeno disminuye proporcionalmente con la concentración de extracto (23).

2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Cada experimento se repitió tres veces con tres réplicas por tratamiento. Las variables respuesta se evaluaron con un análisis de varianza (ANOVA). Únicamente para la prueba de inhibición *in vitro*, el análisis de los datos se realizó con un ANOVA factorial. Se consideraron 2 factores (el tiempo de extracción y la concentración de extracto), con 3 niveles para tiempo de extracción (10, 20 y 30 min) y 4 niveles para la concentración (2.5, 5, 7.5 y 10 mg/mL de extracto). Para determinar las diferencias significativas entre tratamientos se aplicó una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$). Los datos se procesaron con el programa MINITAB.

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación del rendimiento

Los rendimientos de extracción más altos se obtuvieron con los tratamientos de 20 y 30 min con un 21.83 y 23.17 % de sólidos solubles, respectivamente (Tabla 1) ($P > 0.05$). Se observó un aumento en los compuestos de interés conforme aumentó el tiempo de extracción. Estos resultados son similares a los reportados por (24), quienes obtuvieron un rendimiento del 23% de

sólidos solubles utilizando un tiempo de extracción de 30 min en hojas de kratom. Este comportamiento es provocado por la fragmentación y formación de poros en el tejido vegetal producido por el aumento del tiempo de sonicación, lo cual resulta en una mayor transferencia de solutos al solvente de extracción (10). De igual manera, el ultrasonido acelera el equilibrio entre los compuestos de interés en el disolvente con la pared celular (25).

Tabla 1. Rendimiento y compuestos de interés del extracto de hojas de mango obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU).

| Tiempo de extracción (min) | Rendimiento (%) | Capacidad antioxidante (mg eq. trolox/g muestra) | CI ₅₀ capacidad antioxidante (mg eq. trolox/g muestra) | Fenoles solubles totales (mg EAG/g muestra) | Flavonoides totales (mg eq. rutina/g muestra) |
|----------------------------|----------------------------|--|---|---|---|
| Control sin EAU | 14.2 ± 0.73 ^c | 201.60 ± 4.02 ^c | 147.12 ± 0.53 ^c | 20.1 ± 1.21 ^d | 15.99 ± 0.48 ^c |
| 10 | 19.17 ± 2.93 ^b | 290.39 ± 6.16 ^b | 155.41 ± 0.43 ^b | 26.99 ± 1.97 ^c | 20.93 ± 0.56 ^a |
| 20 | 21.83 ± 1.47 ^{ab} | 292.07 ± 0.13 ^b | 155.55 ± 0.08 ^b | 84.85 ± 3.33 ^b | 20.61 ± 0.69 ^{ab} |
| 30 | 23.17 ± 3.06 ^a | 305.92 ± 3.52 ^a | 156.50 ± 0.25 ^a | 141.35 ± 3.18 ^a | 18.95 ± 0.66 ^b |

Los resultados expresan la media ± desviación estándar. En cada columna las letras diferentes significan diferencia significativa ($P < 0.05$).

3.2 Capacidad antioxidante y contenido de fenoles solubles totales

La determinación fitoquímica del extracto de hojas de mango se presenta en la tabla 1. Se observó que el incremento del tiempo de extracción aumentó la capacidad antioxidante (305.92 mg eq. trolox/g de muestra), la CI₅₀ (156.50 mg eq. trolox/g de muestra) y el contenido de fenoles solubles totales (141.35 mg EAG/g muestra), respecto al control sin EAU ($P < 0.05$) (Tabla 1). Entre las técnicas existentes para evaluar la capacidad antioxidante, la técnica de ABTS se utiliza por su capacidad para reaccionar tanto con los compuestos lipofílicos como hidrofílicos. En este contexto, el aumento de la CI₅₀ (Tabla 1) podría estar relacionado con un mayor contenido de compuestos fenólicos, tal como lo sugieren algunos estudios, así como con la

presencia de sustituyentes hidroxilo, lo que conlleva a un aumento en la actividad antioxidante, ya que estos compuestos pueden donar electrones y estabilizar los radicales libres (18).

No obstante, los resultados más altos se obtuvieron con el tiempo de extracción de 30 min (141.35 mg EAG/g muestra). Estos resultados son superiores a los obtenidos por (26), quienes reportaron 32 mg EAG, para el extracto de hojas de mango, obtenido en condiciones similares a las presentadas en este estudio. La diferencia en la cantidad de fenoles solubles totales puede estar relacionada con la variedad del árbol, el clima, el tipo de suelo, los nutrientes, el estado de floración y el momento de corte de las hojas ya sea en precosecha o postcosecha (27).

Por otra parte, el incremento de la capacidad antioxidante y del contenido de fenoles solubles totales se puede atribuir al uso de mezclas hidroalcohólicas. Estas mezclas facilitan la extracción de los compuestos fenólicos debido a que el agua hincha la matriz vegetal y el etanol induce la ruptura de los enlaces del soluto (28,29). Algunas interacciones que se pueden romper son los enlaces dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y los enlaces de hidrogeno (30). La alta capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se relaciona con los grupos hidroxilos en la estructura del anillo aromático que pueden donar electrones con facilidad (31,32). Asimismo, autores como (33) mencionan que cuanto mayor sean los grupos hidroxilo en la estructura, dependiendo del tipo de compuesto fenólico, aumentará su capacidad antioxidante.

En este sentido, los resultados demuestran que los extractos evaluados presentan un alto potencial antioxidante. Este efecto puede desempeñar un rol dual en la inhibición de hongos fitopatógenos. Por un lado, los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en los extractos pueden actuar como antioxidantes en sistemas vegetales, protegiendo a las plantas contra el estrés oxidativo inducido por infecciones (27). Por otro lado, ciertos antioxidantes pueden ejercer actividad antimicrobiana mediante mecanismos alternativos, como daño al material genético, fuga de componentes intracelulares, alteración de la membrana celular o la quelación de iones metálicos esenciales para la homeostasis redox del hongo, generando un desequilibrio que favorece la acumulación de especies reactivas de oxígeno dentro del patógeno (32). Así, el potencial inhibitorio podría explicarse por la capacidad del extracto para desestabilizar el sistema antioxidante interno de los hongos, promoviendo un ambiente oxidativo que resulta letal para su crecimiento (16). De este modo, los extractos naturales se perfilan

como alternativas prometedoras para el control de hongos fitopatógenos, ya que su actividad antioxidante no solo protege al hospedero, sino que también contribuye a la actividad antifúngica a través de mecanismos específicos.

3.3 Determinación de flavonoides totales

En la determinación de flavonoides totales no existe diferencia significativa entre los tiempos de extracción de 10 y 20 min (20.93 y 20.61 mg. eq. rutina, respectivamente) (Tabla 1). Este comportamiento difiere con el presentado para fenoles solubles totales y se puede deber a que los flavonoides se encuentran mayormente en el citoplasma de la célula vegetal. De esta manera, la EAU facilita su obtención a causa de un aumento en la permeabilidad de la pared celular (34). Los flavonoides llegan a un equilibrio entre la solución y el soluto, por lo tanto, al usar un mayor tiempo de extracción se puede provocar la formación de especies reactivas de oxígeno, haciendo que estos pierdan su funcionalidad (35,36). En comparación con lo reportado por (26), observaron variación de 22 a 40 mg de equivalentes de rutina de un extracto de hojas de mango obtenido por ultrasonido. Esta diferencia se podría relacionar a los diferentes cultivares, la temporada, el suelo y el clima de donde se obtuvo la muestra (27). Por otra parte, se ha informado que, en un extracto de hojas de mango, el pretratamiento con ultra alta presión incrementó significativamente el contenido de flavonoides totales, de 13 a 24 mg eq. rutina/g de extracto (37). Estos resultados resaltan la influencia de las condiciones de extracción y de las características agronómicas en la concentración final de flavonoides. Por lo tanto, optimizar el proceso de extracción cobra relevancia no solo desde una perspectiva nutracéutica, sino también para aplicaciones en el manejo de enfermedades en cultivos agrícolas.

3.4 Identificación fitoquímica del extracto por HPLC-UV/VIS

Debido a que los tratamientos con 10 y 20 min de EAU presentaron valores de capacidad antioxidante y fenoles solubles totales significativamente menores al tratamiento con 30 min, únicamente se realizó el análisis por HPLC-UV/Vis del tratamiento más efectivo (EAU de 30 min).

En el extracto hidroalcohólico de hoja de mango se lograron identificar cinco compuestos (Tabla 2). Estos compuestos fueron mangiferina, ácido clorogénico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico y ácido cumárico (Figura 1). Los principales

compuestos en el extracto fueron el ácido clorogénico y el ácido hidroxibenzoico en una concentración de 5.47 y 4.31 mg/mL, respectivamente. La identificación de los compuestos presentes en un extracto fenólico es un punto importante para conocer y definir sus posibles propiedades antioxidantes y antifúngicas. Diversos autores han identificado en extractos de hoja de mango a la mangiferina (37), al ácido clorogénico (38), ácido hidroxibenzoico (26), ácido cafeico y ácido cumárico (39). Por lo tanto, el conocimiento detallado del perfil fenólico del extracto de mango proporcionó una base científica para su potencial aplicación en el control de hongos fitopatógenos.

Tabla 2. Identificación y concentración de los compuestos del extracto de hojas de mango.

| Compuesto | RT (min) | Concentración (mg/mL) |
|-----------------------|----------|-----------------------|
| Mangiferina | 0.60 | 0.06 ± 0.02 |
| Ácido clorogénico | 1.42 | 5.47 ± 0.02 |
| Ácido hidroxibenzoico | 1.71 | 4.31 ± 0.04 |
| Ácido cafeico | 1.90 | 3.33 ± 0.03 |
| Ácido cumárico | 2.41 | 3.00 ± 0.03 |

RT: Tiempo de retención.

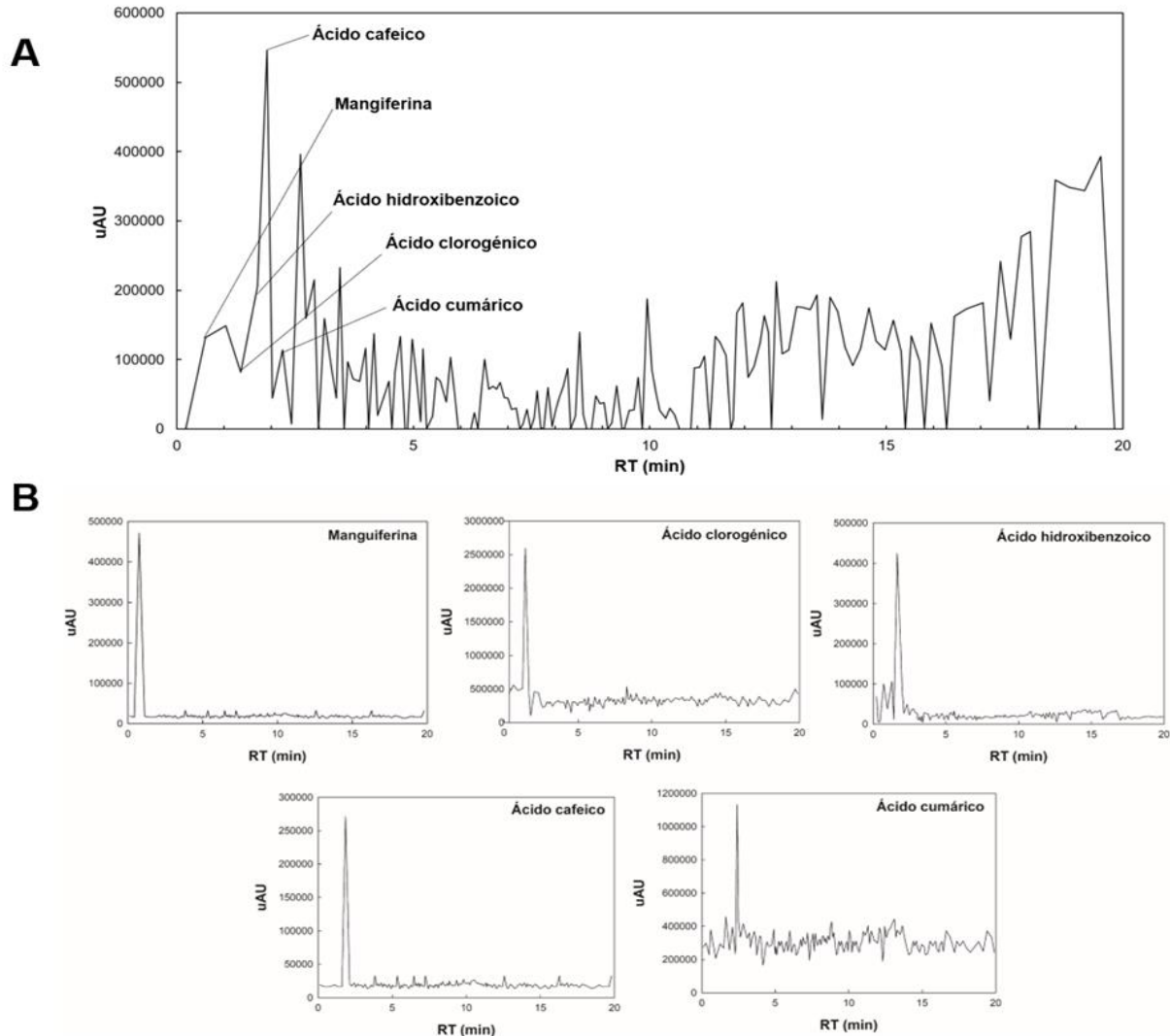


Figura 1. Cromatograma del extracto de hoja de mango obtenido mediante EAU durante 30 min (A) y cromatograma de estándares auténticos mangiferina, ácido clorogénico, ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico y ácido cumárico (B). uAU: altura y RT: tiempo de retención.

3.5 Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria

3.5.1 Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de hojas de mango

Los extractos de hoja de mango presentaron actividad antifúngica *in vitro* (Figura 2). El tiempo óptimo de extracción (30 min) mostró un aumento en el porcentaje de inhibición en comparación a los resultados obtenidos en el tiempo de 10 min ($P < 0.05$). *B. cinerea* aumentó 18% y *P. digitatum* 24%, utilizando una concentración de 10 mg/mL que podría estar relacionado con una mayor cantidad de CAVB en el extracto. Resultados similares se

han reportado por (40), quienes utilizaron una concentración de 5 g/L para inhibir el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Alternaria solani* al aplicar EAU por 30 min en propóleo. Una alta concentración de CAVB puede causar la despolimerización de la membrana citoplasmática y dañar la expresión de algunos genes (41,42). Específicamente, el ácido cafeico, ácido hidroxibenzoico y ácido cumárico pueden causar daño a la membrana plasmática ocasionando fuga de los componentes intracelulares (43). La mangiferina podría causar una

despolimerización de la membrana, fuga del citoplasma y daño al material genético (44), mientras que el ácido clorogénico aumenta la permeabilidad de la pared fúngica al impedir la síntesis de 1, 6- β -glucano (45,46). Por último, se ha reportado que los flavonoides tienen la capacidad de penetrar la estructura de la membrana y la pared celular, lo que ocasiona la formación de agujeros y fuga de ADN, ARN y otros contenidos celulares. Además, pueden alterar el proceso del metabolismo respiratorio mitocondrial, la biosíntesis de proteínas y el metabolismo de aminoácidos, lo que provoca la muerte celular (47).

Por otra parte, dado que los compuestos fenólicos son conocidos por interactuar con carbohidratos y proteínas a través de formación de ésteres, oxidación y complejación proteica, es importante considerar su posible efecto sobre los elementos que componen el medio (APD). No obstante, la inhibición fúngica observada en este estudio mostró una relación dosis-dependiente, lo que sugiere que el efecto es atribuible a la acción directa de los extractos sobre los hongos, y no sobre el medio APD afectando la disponibilidad de nutrientes para el hongo. Esta interpretación es consistente con estudios previos donde los compuestos fenólicos ejercen actividad antifúngica mediante mecanismos específicos que causan la muerte celular del fitopatógeno (44,47).

Los mecanismos de acción anteriormente mencionados refuerzan el valor del extracto de hoja de mango como una alternativa viable en el control biológico de hongos fitopatógenos. Además, la eficacia inhibitoria demostrada posiciona a este extracto como un método de control funcional dentro de las estrategias de manejo biológico, con potencial de aplicación en sistemas de producción orgánica y sustentable.

3.5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los hongos fitopatógenos

Las concentraciones (2.5, 5, 7.5 y 10 mg/mL) fueron adecuadas para evaluar la relación dosis-respuesta y fueron determinadas con base en estudios previos que reportan actividad antifúngica en rangos similares (16,22,23), así como en pruebas preliminares que verificaron la solubilidad y estabilidad del extracto en estos niveles.

La CMI de *B. cinerea* fue de 9.35 mg/mL y de *P. digitatum* 20 mg/mL (Tabla 3), con estos resultados es posible ver la afinidad que tienen los CAVB sobre las proteínas en la membrana de los hongos fitopatógenos. Los resultados presentados para las CMI son similares a los reportados por (48) quienes utilizaron el extracto de hojas y semillas de moringa oleífera para inhibir a *B. cinerea* empleando concentraciones de 10 y 15 mg/mL, respectivamente con inhibición del 100% del hongo fitopatógeno. Por último, (49), reportaron el uso de un extracto de cáscara de granada obtenido por maceración (6 h). Con el extracto se logró inhibir el 100% de *P. digitatum* con una CMI de 20 mg/mL al emplear metanol y 22.5 mg/mL al emplear agua como disolvente. En los extractos reportados anteriormente se han identificado diversos compuestos pertenecientes al flavonol, ácidos hidroxicinámicos y terpenos. Existen reportes que afirman que el conjunto de estos compuestos puede causar la disrupción de la membrana celular, desorganizar los organelos y lisis celular (50,51).

Por otro lado, *P. digitatum* y *B. cinerea* son hongos fitopatógenos de gran importancia económica en la agricultura, ya que afectan a cultivos de alto valor comercial, como la naranja y el arándano, respectivamente (14,15). La capacidad de estos hongos para dañar a los cultivos puede resultar en pérdidas

significativas en la producción y comercialización, reducción de la calidad de los frutos y en un aumento de los costos de manejo y control. Por lo tanto, los resultados de este estudio son importantes para el desarrollo de estrategias de control efectivas y sostenibles que ayuden a mitigar el impacto

económico, ecológico y social de estas enfermedades en la agricultura (52). En un futuro, este enfoque puede contribuir a la seguridad alimentaria y al fortalecimiento de la economía agrícola, especialmente en regiones con una alta incidencia de enfermedades fúngicas.

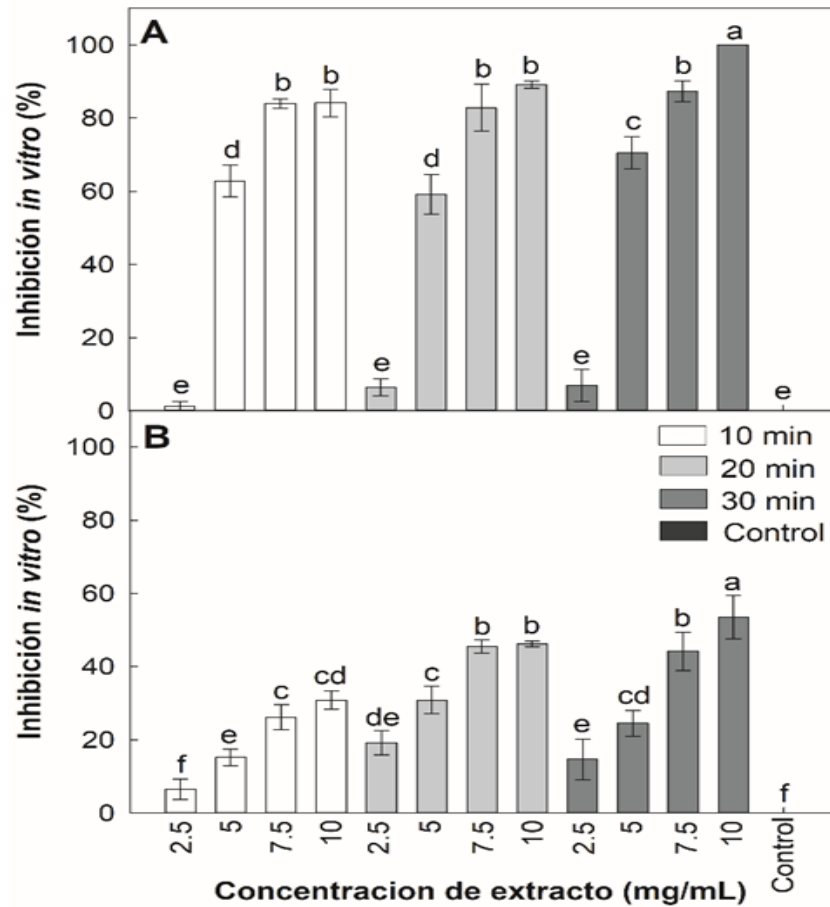


Figura 2. Actividad antifúngica de los extractos de hoja de mango obtenidos a los 10, 20 y 30 min de extracción contra los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* (A) y *Penicillium digitatum* (B). Control negativo: placas de Petri con APD inoculadas con *B. cinerea* y *P. digitatum* en ausencia de extracto. Las barras son la media y las líneas verticales representan la desviación estándar. En cada gráfico las letras diferentes significan diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$).

Tabla 3. Ecuaciones y concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

| Hongo | Ecuación de la curva | R ² | CMI mg/mL |
|------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| <i>Botrytis cinerea</i> | $Y = -0.4567x + 4.2778$ | 0.9018 | 9.35 |
| <i>Penicillium digitatum</i> | $Y = -0.1437x + 2.9871$ | 0.9533 | 20.51 |

CMI: concentración mínima inhibitoria.

4. Conclusiones

La EAU es una tecnología eficiente para la obtención de extractos de hojas de mango con alto contenido de CAVB en tiempos relativamente cortos. La EAU contribuye a evitar los efectos adversos que generan otras técnicas de extracción novedosas o ya establecidas. La actividad antifúngica *in vitro* del extracto sugiere su potencial uso como una alternativa efectiva y natural para la inhibición de hongos fitopatógenos que infectan a frutos de interés y para reemplazar a los fungicidas sintéticos. Por otra parte, el uso de hojas de mango provee valor agregado a los desperdicios agroindustriales de los cultivos de este fruto.

Agradecimientos

El primer autor agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada para los estudios de posgrado dentro del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos.

5. Referencias

1. Rebolledo-Martínez, A., Peralta-Antonio, N., Rebolledo-Martínez, L., Becerril-Román, E. A. & Rebolledo-García, R. L. (2019). Effect of rootstock in tree growth, dry matter, flowering, yield and quality of 'Manila' mango. *Scientia Horticulturae*, 251, 155–61. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.0122>
2. Avilán, L., Horci- Escalante, L., Marín R, C., Soto, E., Pérez, M., Rodríguez, M., et al. (2007). Contenido estimado de npk en el follaje removido por la poda en mango sembrado en alta densidad. *Agronomía Tropical*, 57(2), 113–21.
3. Ramos-Hernández, J., Ragazzo-Sánchez, J., Calderón-Santoyo, M., Ortiz-Basurto, R., Prieto, C. & Lagaron, J. (2018). Use of electrospayed agave fructans as nanoencapsulating hydrocolloids for bioactives. *Nanomaterials*, 8(11), 868. <https://doi.org/10.3390/nano8110868>
4. Guamán-Balcázar, M. C., Montes, A., Pereyra, C. & de la Ossa E, M. (2017). Precipitation of mango leaves antioxidants by supercritical antisolvent process. *Journal of Supercritical Fluids*, 128, 218–26. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.031>
5. Rodríguez-García, S. L. & Raghavan, V. (2022). Green extraction techniques from fruit and vegetable waste to obtain bioactive compounds—A review”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62(23), 6446. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1901651>
6. García-Santoyo, K., Ozuna-López, C. & Mares-Mares, E. (2020). Extracción de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) asistida por ultrasonidos de potencia. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 227–232.
7. Aziz, N. A., Hasham, R., Sarmidi, M. R., Suhaimi, S. H. & Idris, M. K. H. (2021). A review on extraction techniques and therapeutic value of polar bioactives from Asian medicinal herbs: Case study on *Orthosiphon aristatus*, *Eurycoma longifolia* and *Andrographis paniculate*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(2), 143–65. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.12.016>
8. Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., et al. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and

- antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
9. Lavilla, I. & Bendicho, C. (2017). Fundamentals of ultrasound-assisted extraction. in: water extraction of bioactive compounds". *Elsevier*; p. 291–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>
 10. Kumar, K., Srivastav, S. & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
 11. Castañeda-Valbuena, D., Ayora-Talavera, T., Luján-Hidalgo, C., Álvarez-Gutiérrez, P., Martínez-Galero, N. & Meza-Gordillo, R. (2021). Ultrasound extraction conditions effect on antioxidant capacity of mango by-product extracts. *Food and Bioprocess Processing*, 127, 212–24. 212–224.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.03.002>
 12. Oseghale, F. O., Fasina, K. A., Ohifueme, A. & Omoruyi, J. (2020). Biocontrol of food spoilage microorganisms using leaf extracts from *Magnifera indica* (Mango) and *Psidium guajava* (Guava). *Journal of Chemical Society of Nigeria*, 45(4), 712–23.
<https://doi.org/10.46602/jcsn.v45i4.496>
 13. Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623–631.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>
 14. Bhatta, U. K. (2022). Alternative management approaches of citrus diseases caused by *Penicillium digitatum* (Green mold) and *Penicillium italicum* (Blue mold). *Frontiers in Plant Science*, 12, 833328.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.833328>
 15. Chacón, F. I., Sineli, P. E., Mansilla, F. I., Pereyra, M. M., Diaz, M. A., Volentini, S. I., et al. (2022). Native cultivable bacteria from the blueberry microbiome as novel potential biocontrol agents. *Microorganisms*, 10(5), 969.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10050969>
 16. Vázquez-González, Y., Ragazzo-Sánchez, J. A. & Calderón-Santoyo, M. (2020). Characterization and antifungal activity of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) leaf extract obtained using conventional and emerging technologies. *Food Chemistry*, 330, 127211.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127211>
 17. Ruiz-Montañez, G., Burgos-Hernández, A., Calderón-Santoyo, M., López-Saiz, C. M., Velázquez-Contreras, C. A., Navarro-Ocaña, A., et al. (2015). Screening antimutagenic and antiproliferative properties of extracts isolated from Jackfruit pulp (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Food Chemistry*, 175, 409–16.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.122>
 18. Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E. & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2021). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) leaf as a

- new source to obtain protein hydrolysates: Physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids*, *1*(112), 106319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106319>
19. Liu, S., Lin, J., Wang, C., Chen, H. & Yang, D. (2009). Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. *Food Chemistry*, *114*(2), 577–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.088>
 20. Dobravalskytė, D., Rimantas-Venskutonis, P., Talou, T., Zebib, B., Merah, O. & Ragažinskienė, O. (2013). Antioxidant properties and composition of deodorized extracts of *Tussilago farfara* L. *Records of Natural Products*, *7*(3), 201-209.
 21. Lerma-Torres, J. M., Navarro-Ocaña, A., Calderón-Santoyo, M., Hernández-Vázquez, L., Ruiz-Montañez, G. & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2019). Preparative scale extraction of mangiferin and lupeol from mango (*Mangifera indica* L.) leaves and bark by different extraction methods. *Food Science and Technology*, *56*(10), 4625–31. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03909-0>
 22. Covarrubias-Rivera, L., López-Cruz, R., Ragazzo-Sánchez, J. A., Iñiguez-Moreno, M. & Calderón-Santoyo, M. (2022). Determination by isothermal microcalorimetry of the sensitivity of phytopathogenic fungi of tropical fruits against an ethanolic extract of jackfruit leaf (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Journal of Microbiological Methods*, *195*, 106457. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106457>
 23. Calderón-Santoyo, M., González-Gutiérrez, K. N., Vilchis-Gómez, D. S., Dominguez-Ruvalcaba, J. E. & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2024). *Dalea carthagenensis* una nueva fuente de compuestos antioxidantes: Identificación de polifenoles y actividad antifúngica contra *Rhizopus stolonifer* en yaca. *Revista Bio Ciencias*. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1686>
 24. Zakaria, F., Tan, J. K., Mohd-Faudzi, S. M., Abdul-Rahman, M. B. & Ashari, S. E. (2021). Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil leaves. *Ultrasonic Sonochemistry*, *81*, 105851. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105851>
 25. Zou, T. B., Xia, E. Q., He, T. P., Huang, M. Y., Jia, Q. & Li, H. W. (2014). Ultrasound-assisted extraction of mangiferin from mango (*Mangifera indica* L.) leaves using response surface methodology. *Molecules*, *19*(2), 1411–21. <https://doi.org/10.3390/molecules19021411>
 26. Wu, L., Wu, W., Cai, Y., Li, C. & Wang, L. (2020). HPLC fingerprinting-based multivariate analysis of phenolic compounds in mango leaves varieties: Correlation to their antioxidant activity and in silico α -glucosidase inhibitory ability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *191*, 113616. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113616>
 27. Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F. & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to

- environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
<https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
28. Drevelegka, I. & Goula, A. M. (2020). Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 149, 107845.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107845>
29. Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A. & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47.
<https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
30. Lang, Q. & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review. *Talanta*, 53(4), 771–782.
[https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00557-9](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00557-9)
31. Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, ME., Abdelly, C. & Magné, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. *Aizoaceae* Shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243–9.
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v11i2.10>
32. Pak-Dek, M., Osman, A., Gooda-Sahib, N., Saari, N., Markom, M., Hamid, A. A., et al. (2011). Effects of extraction techniques on phenolic components and antioxidant activity of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 5050–5057.
33. Cao, Y., Fang, S., Fu, X., Shang, X. & Yang, W. (2019). Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. *Forests*, 10(8), 624.
<https://doi.org/10.3390/f10080624>
34. Zhang, L., Shan, Y., Tang, K. & Putheti, R. (2009). Ultrasound-assisted extraction flavonoids from Lotus (*Nelumbo nuficera Gaertn*) leaf and evaluation of its anti-fatigue activity. *International Journal of Physical Sciences*, 4(8), 418-422
35. Yang, L., Cao, Y. L., Jiang, J. G., Lin, Q. S., Chen, J. & Zhu, L. (2010). Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L'. var. *amara* Engl. *Journal of Separation Science*, 33(9), 1349–55.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200900776>
36. Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505–2812.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.059>
37. Zhang, J., Wang, Y. D., Xue, Q. W., Zhao, T. R., Khan, A., Wang, Y. F., et al. (2022). The effect of ultra-high pretreatment on free, esterified and insoluble-bound phenolics from mango leaves and their antioxidant and cytoprotective activities. *Food Chemistry*, 368, 130864.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130864>
38. Alshammaa, D. (2016). Preliminary screening and phytochemical profile of *Mangifera indica* leave's extracts, cultivated in Iraq. *International Journal of*

- Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(9), 163–73. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.509.018>
39. Zhang, J., Wang, Y. D., Xue, Q. W., Zhao, T. R., Khan, A., Wang, Y. F., et al. (2022). The effect of ultra-high pretreatment on free, esterified and insoluble-bound phenolics from mango leaves and their antioxidant and cytoprotective activities. *Food Chemistry*, 368, 130864. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130864>
40. Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D. & Gniewosz, M. (2019). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5386–95. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>.
41. Bashi, D. S., Dowom, S. A., Bazzaz, B. S. F., Khanzadeh, F., Soheili, V. & Mohammadpour, A. (2016). Evaluation, prediction and optimization the ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology: Antioxidant and biological properties of *Stachys parviflora* L. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(5), 529–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403260>
42. Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K. & Sadozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
43. Kyselka, J., Rabiej, D., Dragoun, M., Kreps, F., Burčová, Z., Němečková, I., et al. (2017). Antioxidant and antimicrobial activity of linseed lignans and phenolic acids. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1633–44. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2871-9>
44. Kumar, M., Saurabh, V., Tomar, M., Hasan, M., Changan, S., Sasi, M., et al. (2021). Mango (*Mangifera indica* L.) leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities. *Antioxidants*, 10(2), 299. <https://doi.org/10.3390/antiox10020299>
45. Tayel, A. A., Moussa, S. H., Salem, M. F., Mazrou, K. E. & El-Tras, W. F. (2016). Control of citrus molds using bioactive coatings incorporated with fungal chitosan/plant extracts composite. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1306–1312. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7223>
46. Ma, C. M., Kully, M., Khan, J. K., Hattori, M. & Daneshtalab, M. (2007). Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(21), 6830–33. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.038>
47. Luo, J., Xu, F., Zhang, X., Shao, X., Wei, Y. & Wang, H. (2020). Transcriptome analysis of *Penicillium italicum* in response to the flavonoids from *Sedum aizoon* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 62. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02836-z>
48. Ahmadu, T., Ahmad, K., Ismail, S. I., Rashed, O., Asib, N. & Omar, D. (2021). Antifungal efficacy of *Moringa oleifera*

- leaf and seed extracts against *Botrytis cinerea* causing gray mold disease of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 1007–22. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.233173>
49. Tayel, A. A., El-Baz, A. F., Salem, M. F. & El-Hadary, M. H. (2009). Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mould. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(6), 252-256. <https://doi.org/10.1007/BF03356318>.
50. Luo, J., Xu, F., Zhang, X., Shao, X., Wei, Y. & Wang, H. (2020). Transcriptome analysis of *Penicillium italicum* in response to the flavonoids from *Sedum aizoon* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 62. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02836-z>
51. Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. & Rao, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5062–5069. <https://doi.org/10.1128/AAC.01050-10>
52. Muriithi, B. W., Dubois, T., Kirui, L., Latorff, H. M. G., Mohamed, S., Abdel-Rahman, E. M., et al. (2024). Impact of integrating pest and pollinator management training on knowledge, perceptions, and livelihoods of avocado farmers in Kenya. *Journal of Integrated Pest Management*, 15(1), 35. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmae025>