

Optimización del efecto antifúngico de extractos de ají (*Capsicum frutescens*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Moniliophthora roreri*, causante de la moniliasis en cacao

Optimization of the antifungal effect of chili pepper (*Capsicum frutescens*) extracts on the *in vitro* growth of *Moniliophthora roreri*, the cause of moniliasis in cocoa

Karen Sirley Murcia Artunduaga^{1,2}, Adriana Vanessa Maca^{1,3}, Katerine Suarez Collazos^{1,4},
María del Rosario Castañeda^{1,5}.

¹SENNOVA. Centro de Gestión y Desarrollo Sostenible Surcolombiano. Regional Huila. Pitalito, Colombia. ² ✉ ksmurcia47@misena.edu.co

³ ✉ avmaca0@misena.edu.co ⁴ ✉ ksuarezc@sena.edu.co ⁵ ✉ mdcastaneda@sena.edu.co



<https://doi.org/10.15446/acag.v72n2.110673>

2023 | 72-2 p 188-195 | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 | Rec.: 2023-08-17 Acep.: 2023-10-10

Resumen

Moniliophthora roreri ha sido considerada como una de las limitaciones más preocupantes del cultivo de cacao en Colombia y el mundo, puesto que daña gravemente el fruto. Los agroquímicos aplicados no han sido suficientes para su control y generan diversas consecuencias al cultivo y a su entorno, razón por la cual el desarrollo de investigaciones dirigidas al planteamiento de alternativas de control ecológicamente viables para la salud del medio y del productor son alternativas potenciales de interés del sector, para así controlar efectivamente de la enfermedad. En Colombia existen especies vegetales con alto interés para el desarrollo biopreparados debido a sus múltiples beneficios, entre los cuales están los efectos antimicrobianos, que permiten la reducción de impactos negativos en la producción agrícola. De esta manera, el presente proyecto evaluó las condiciones óptimas del proceso de extracción de compuestos que maximizan el potencial antifúngico de *Capsicum frutescens*, a través el método de superficie de respuesta (MSR), bajo condiciones controladas en laboratorio, y haciendo la evaluación con factores continuos (temperatura en °C y concentración en v/v). De igual forma, se tomaron como factores categóricos el tipo de solvente A (acetato de etilo al 96 %) y E (etanol al 96 %), con lo que se encontró que las condiciones óptimas para obtener un porcentaje de inhibición superior al 90 % de *M. roreri*, en laboratorio, corresponden a extractos que fueron obtenidos usando como solvente acetato de etilo al 62 %, a una temperatura de 75 °C. De ello se infiere que aquellas son las condiciones que permiten un mejor arrastre de compuestos de interés antifúngico de la especie *C. frutescens*, por lo que podrían considerarse como materia prima potencial para la producción de insumos agrícolas biológicos.

Palabras claves: biofungicida, control biológico, enfermedad vegetal, Theobroma.

Abstract

Moniliophthora roreri has been considered one of the most worrisome limitations of cocoa cultivation in Colombia and the world due to its affectation with serious damage to the fruit. The current applied agrochemicals have not been sufficient for its control and have various negative effects on the crop and its environment. For that reason, it is necessary to perform research aimed at proposing effective ecologically viable control alternatives for the disease without affecting the environment and the producer's health. In Colombia, there are plant species of high interest for the development of biopreparations due to their multiple benefits, including antimicrobial effects, which allow the reduction of negative impacts on agricultural production. In this way, the present project evaluated the optimal conditions for the extraction process of compounds that maximize the antifungal potential of *Capsicum frutescens*, using the response surface methodology (MSR) under controlled laboratory conditions. The evaluation was made with continuous factors (temperature in °C and concentration in v/v), and in the same way with categorical factors such as the solvent type A (96 % ethyl acetate) and E (96 % ethanol), finding that the optimal conditions to obtain a percentage of inhibition greater than 90 % of *M. roreri* under laboratory conditions, correspond to extracts that were obtained using 62 % ethyl acetate as a solvent, at a temperature of 75 °C. It can be inferred that these are the conditions that allow a better dragging of compounds of antifungal interest of the species *C. frutescens*. Therefore, they could be considered as potential raw material for the production of biological agricultural inputs.

Keywords: biological control, biofungicide, plant disease, Theobroma.

Introducción

Los problemas fitosanitarios son los principales causantes de pérdidas productivas y, por tanto, económicas del cultivo de cacao a nivel mundial. Múltiples autores mencionan que el cultivo puede verse afectado hasta en un 100 % de la plantación, lo cual es reflejo de diversos problemas productivos relacionados con la moniliasis del cacao (Correa, Castro y Coy, 2014; Ramírez, 2017; Anzules *et al.*, 2019; Antolínez *et al.*, 2020). Por ello, desde los años 1950, se han registrado los primeros estudios acerca de cómo controlar *M. roreri* en Colombia. Estas investigaciones se centraron en estrategias culturales, como la realización de podas y el control de la humedad relativa; sin embargo, y a pesar de los esfuerzos, la severidad de la enfermedad en ese país se mantuvo hasta afectar más de 4000 hectáreas sembradas de cacao en la zona de Urabá, lo que generó pérdidas económicas a los pequeños y medianos productores, al punto de desestimular la inversión en este cultivo y generar transición hacia otras actividades económicas (Aranzazu y Jaimes, 2010; Compañía Nacional de Chocolates, 2019).

Aunque las actividades de control químico de la enfermedad han logrado tener un grado de eficacia, traen consecuencias negativas asociadas a las trazas en el producto final, su uso excesivo e indiscriminado, efectos nocivos en la salud y el medio ambiente, resistencia del patógeno, y elevados costos para los pequeños agricultores, entre otros (Gutiérrez, 2015; Ortiz, Torres y Hernández, 2015; Cárdenas, Aquiles y Rodríguez, 2017; Antolínez *et al.*, 2020; Ugarte, 2020).

Por otro lado, existen regulaciones internacionales frente a pesticidas de síntesis química, que protegen la salud de los consumidores y limitan en gran parte las exportaciones del país (Fountain y Huetz, 2020). Por lo anterior, se han establecido medidas de control orientadas principalmente a inhibir la germinación de esporas que afectan directamente los frutos de cacao y evitan su propagación, empleando métodos alternativos biológicos para el control de la moniliasis del cacao, como bacterias fototróficas que presentan mejor comportamiento que los fungicidas químicos (Cruz y Davila, 2021), los uso de extractos vegetales con efectos inhibidores a nivel de laboratorio (Guerrero y Risco, 2019; Ugarte, 2020), y los cuales se presentan como una prometedora opción para control de *M. roreri*, tanto por su efecto inhibitorio agudo, como por su potencial efecto a exposiciones prolongadas (Tirado, Lopera y Ríos, 2016). Entre las especies utilizadas para la obtención de los extractos vegetales de control, se tiene la planta de ají (*Capsicum spp.*), sus extractos han despertado el interés en la industria agrícola por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, con componentes activos, como capsaicinoides (capsaicina y la dihidrocapsaicina encontrados en mayor proporción), que son un

gran grupo de sustancias responsables del sabor característico de los ají y de la sensación de pungencia al consumirlos (Cruz *et al.*, 2007; Morán *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2013; Leos *et al.*, 2022).

Por ello, la presente investigación pretendió evidenciar el efecto antifúngico de extractos etanólicos de *Capsicum spp.*, de modo que permitan brindar al agricultor una opción mucho más sana, viable económica y ambientalmente amigable para reemplazar a los plaguicidas químicos sintéticos, en los cultivos de cacao.

Materiales y métodos

Aislamiento y purificación del patógeno *Moniliophthora roreri*

Se procedió al aislamiento de *M. roreri* tomado de frutos de cacao en etapas iniciales de necrosis externa, junto con otras manifestaciones sintomáticas (CNC, 2019), que son distintivas de la infección por moniliasis. Estos frutos fueron recolectados de fincas productoras representativas en los municipios del sur del Huila. Posteriormente, se transportaron al laboratorio de biotecnología ubicado en el Centro de Gestión y Desarrollo Sostenible Surcolombiano, Sede Yamboró. Los frutos se sometieron a un proceso de desinfección que involucró agua destilada, hipoclorito de sodio al 1.5 % y etanol al 70 %. Luego, se sembraron cortes de tejido desinfectado en medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA) contenidos en placas Petri de 10 cm. Las placas Petri fueron incubadas a una temperatura constante de 28 °C durante 7 días.

Para obtener morfotipos purificados, se realizaron transferencias de estructuras, cada 8 días, hacia los medios de cultivo que mostraron mayor crecimiento de las colonias descritas, tanto macroscópicas como microscópicas, por Evans *et al.* (1978). Una vez obtenida la cepa madre con las típicas características y estructuras reproductivas, se llevaron a cabo réplicas en placas Petri incubadas en oscuridad, para su posterior uso en los experimentos de inhibición.

Colección de materia prima para preparación de extractos

Se colectaron frutos de *Capsicum frutescens*, verificando la especie con los datos almacenados en el Herbario Amazónico Colombiano - SINCHI (Cárdenas, Sua y Castaño, 2022); se transportaron al laboratorio de biotecnología del Centro de Gestión y Desarrollo Sostenible Surcolombiano Sede Yamboró, donde se desinfectaron y secaron a temperatura constante de 40 °C por 36 h en un horno de vacío (Tecnal TR395). Después, se llevaron a calentamiento con temperatura controlada y reflujo para evitar pérdidas por evaporación, con

un tiempo y agitación de extracción constante de 60 min y 300 rpm respectivamente. Se estableció una relación de 2/20 (masa/volumen) y se evaluaron como factores continuos 3 temperaturas de extracción 30, 63 y 96 °C, y 3 soluciones en proporción 30, 60 y 96 % v/v preparadas con agua destilada y solventes que fueron evaluados como 2 factores categóricos A (acetato de etilo al 96 %) y E (etanol al 96 %); Posteriormente, las soluciones resultantes se sometieron a un procedimiento de eliminación del solvente mediante un rotoevaporador (Halthen modelo MMRE 04). Por último, los extractos se preservaron en recipientes de vidrio ámbar, estériles, a una temperatura de 14 °C.

Optimización del proceso de extracción de compuestos antifúngicos

Con el propósito de identificar las condiciones más efectivas en la extracción de compuestos que maximizan las propiedades antifúngicas de *C. frutescens*, se empleó el método de superficie de respuesta (MSR). Para garantizar la adecuada distribución de los datos, se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, con valores de *p* mayores a 0.05, a través del software estadístico Minitab 21.4. Este programa permitió la creación de gráficos tridimensionales para un modelo completo de dos factores continuos, a través de la evaluación del efecto de las variables temperatura en grados Celsius (°C) y el porcentaje de solución como concentración (v/v) sobre la variable de respuesta: el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. royeri*.

Los modelos se originaron calculado un análisis de varianza (ANOVA) y los valores de *p*, y posterior a ello se hizo un análisis de regresión basado en el método de mínimos cuadrados, con un nivel de significancia del 95 % para determinar el coeficiente de regresión (R²). El diseño global del experimento consistió en 27 experimentos realizados por triplicado de manera completamente aleatoria. Los promedios obtenidos de los datos se ajustaron al modelo cuadrático (Ecuación 1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde *y* es la variable respuesta, β_0 es el coeficiente de interacción, β_i , X_i y X_j son las variables independientes, β_i , β_{ii} , β_{ij} son los coeficientes respectivamente para términos lineales, cuadráticos y su combinación, mientras que ε representa el error experimental aleatorio.

Determinación de inhibición de crecimiento micelial

La actividad antifúngica de los extractos se evaluó mediante el análisis del crecimiento del micelio en placas Petri. Los extractos, libres de solvente, se introdujeron al medio de cultivo PDA en una concentración de 1000 ppm. Se llevaron a cabo tres repeticiones para cada muestra. Tras la solidificación del medio, se colocaron discos de micelio del patógeno con un diámetro de 2 mm en el centro de los pozos (obtenidos de un cultivo previamente incubado de 10 días). Se observó un crecimiento macroscópico del hongo después de 3 días de la siembra, por tanto, se inició la monitorización desde ese día, midiendo el crecimiento radial del micelio.

En el caso de control, se usó agua destilada estéril en lugar de los extractos diluidos en el medio. De esta manera, el porcentaje de inhibición, que se tomó como la medida para determinar la actividad de los extractos en el crecimiento del micelio, se calculó comparando el diámetro de las colonias tratadas con las del grupo de control, mediante la siguiente fórmula (Ecuación 2):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{C-T}{C} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde *C* es el crecimiento diametral del hongo en el control (sin tratamiento) y *T* es el crecimiento diametral del hongo con el tratamiento.

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se analizaron mediante un ANOVA y una prueba de Tukey al 5 % para determinar las diferencias entre los pares de medias, puesto que la normalidad de los datos fue corroborada mediante Kolmogórov Smirnov, con valores *p* > 0.05.

Resultados y discusión

El resultado de la optimización del proceso de extracción mostró alta variación en el porcentaje de inhibición del patógeno, pues presentó valores mínimos cercanos al 60 % y máximos superiores al 90 % con respecto a los factores de temperatura, concentración y tipo de solvente (Figura 1). Se considera que las variaciones son producto del efecto de las variables propias del proceso sobre el sistema de extracción (calentamiento con temperatura controlada, agitación constante y reflujos). Un estudio similar de Flores *et al.*, (2016) indica que los compuestos obtenidos, varían como consecuencia de la interacción de los factores del proceso de extracción con la naturaleza de los compuestos bioactivos (difusión, estabilidad o degradación, inactivación, solubilización, polaridad y otros) que determinan su concentración final.

El análisis de varianza con $p < 0.05$ (Tabla 1) mostró que las variables que influyen sobre la superficie de respuesta del MSR, corresponden a la temperatura ($p. 0.049$) y concentración ($p. 0.034$); por lo tanto, se puede inferir que la variación en las temperaturas a las que se exponen los solventes contribuyen al aumento de la solubilidad, las tasas de difusión y el arrastre de los compuestos que inhiben el patógeno. Rodríguez *et al.* (2014) mencionan que los tratamientos térmicos en los procesos de extracción pueden generar una mejor permeabilidad y plasticidad de los materiales, debido a la expansión y ruptura de estructuras celulares. Así mismo, las variaciones en la concentración del solvente influyen en la velocidad y rendimiento de la extracción como resultado de la fuerza de transferencia de masas por conducción, por lo que se encuentra que, a mayor concentración del disolvente, mayor fuerza motriz y, por tanto, mayor extracción de compuestos afines con el disolvente (Rodríguez *et al.*, 2014).

Por otro lado, aunque no se presentaron valores significativos con respecto al solvente, sí se obtuvo mayor eficiencia con los extractos obtenidos con el solvente acetato de etilo sobre el crecimiento del patógeno a nivel *in vitro* (Figura 2 y 3). Durante el seguimiento visual y la toma de datos continua de las placas para analizar la respuesta del hongo frente al tratamiento optimizado, se observaron diámetros de 8 mm que variaron ligeramente en un rango de 3 mm, lo cuales fueron valores más favorables a los registrados por el etanol, que estuvieron entre 12 y 20 mm (Figura 2).

Lo anterior nos permite inferir que el acetato de etilo presenta mayor afinidad con los compuestos antifúngicos de *C. frutescens*, como lo reportó Arteaga (2019) para el género *Capsicum*, donde el acetato de etilo presentó valores superiores en cuanto a la concentración de capsaicina en las oleorresinas si se

comparan con los resultados del etanol y bencina de petróleo, evaluados como solventes con el método Soxhlet. Así mismo, Restrepo, Llanos y Fonseca (2007) evidenciaron que el acetato de etilo presentó valores más favorables que el hexano en la extracción de oleorresinas de dos especies de ají pungente al determinar la capsaicina y la dihidrocapsaicina por HPLC. Sin embargo, es importante resaltar que el fruto de ají presenta múltiples metabolitos que de

Tabla 1. Análisis de varianza de superficie de respuesta: inhibición vs. porcentaje v/v; temperatura; solvente

Fuente	GL	SC Ajustado.	MC Ajustado.	Valor F	Valor p
Modelo	8	2429.04	303.63	83.11	0.000
Lineal	3	17.18	5.73	4.57	0.028
Porcentaje v/v	1	6.44	6.44	61.76	0.034
Temperatura	1	50.07	50.07	50.02	0.049
Solvente	1	7.68	7.68	2.10	0.190
Cuadrado	2	2165.91	1082.95	296.42	0.000
Porcentaje v/v *Porcentaje v/v	1	26.13	26.13	7.15	0.032
Temperatura *Temperatura	1	2088.76	2088.76	571.72	0.000
Interacción de 2 factores	3	12.85	4.28	1.17	0.386
Porcentaje v/v*Temperatura	1	0.90	0.90	0.25	0.634
Porcentaje v/v*Solvente	1	10.63	10.63	2.91	0.132
Temperatura *Solvente	1	3.84	3.84	1.05	0.339
Error	7	25.57	3.65		
Falta de ajuste	4	19.55	4.89	2.43	0.246
Error puro	3	6.03	2.01		
Total	15	2454.62			

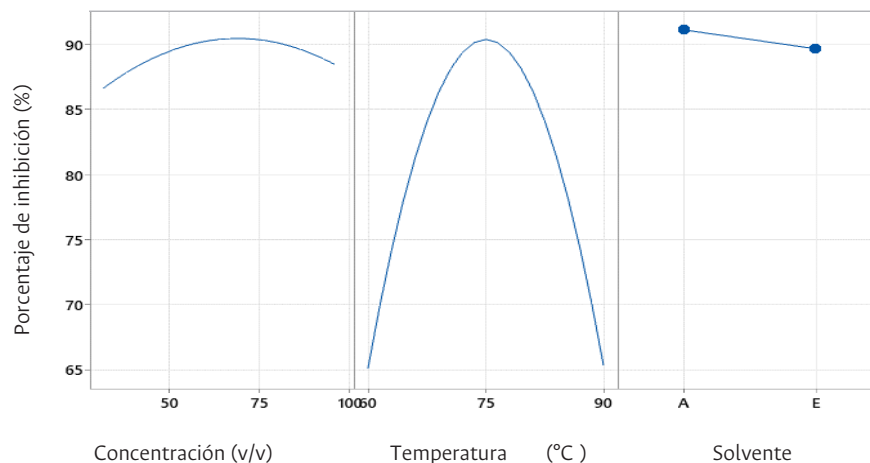


Figura 1. Comportamiento de efectos principales sobre el porcentaje de inhibición del *M. roreri*.

minerales. Por su parte, solventes dipolares como el acetato de etilo presentan una polaridad intermedia y pueden solubilizar solutos de polaridad relativa similar (Beltrán *et al.*, 2013).

Sin embargo, el género *Capsicum* ha sido reportado por múltiples autores debido a la producción de metabolitos secundarios extraídos mediante la variación de condiciones de concentración, temperatura, tamaños de partículas y tipos de solventes; tales autores usualmente discuten sobre los metabolitos como protección contra fitopatógenos en los cultivos, dado que contienen principios activos pungentes y otros compuestos de interés, como los orgánicos volátiles con múltiples polaridades: vitaminas C, E y A, oleorresinas, tiamina, compuestos fenólicos, carotenoides y antioxidantes que contrarrestan la oxidación de los lípidos mediante la captación de radicales libres y tienen su acción en el control de plagas y enfermedades (Jeong *et al.*, 2011; Bosland *et al.*, 2012; Meckelmann *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2019).

igual manera son transportados en el proceso de extracción y pueden complementarse para ejercer su acción antifúngica.

Las gráficas de contornos (Figura 3) permiten observar el efecto de la concentración de los solventes y la temperatura. Se puede evidenciar que el porcentaje de inhibición para ambos solventes presenta comportamientos similares en relación con rangos de temperatura entre 70 y 80 °C; la mejor fue de 75 °C. Beltrán *et al.* (2013) indican que a medida que la temperatura se eleva sin superar excesos, es posible mejorar la velocidad de extracción, lo que simplifica la transferencia de los compuestos desde la estructura vegetal hacia el solvente. Respecto a la concentración, se evidencia que para el solvente acetato de etilo el rango óptimo es de 62 v/v y para el caso del solvente etanol, estos valores difieren entre 50 a >90 v/v. El etanol y el agua destilada forman un complejo de solventes polares en los cuales pueden disolverse diversos solutos polares e iónicos, incluyendo proteínas, carbohidratos y sales

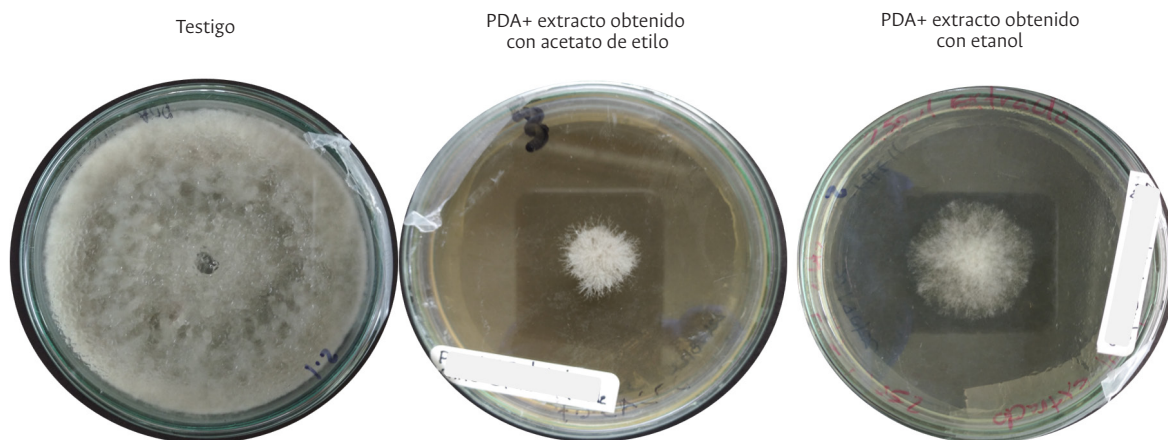
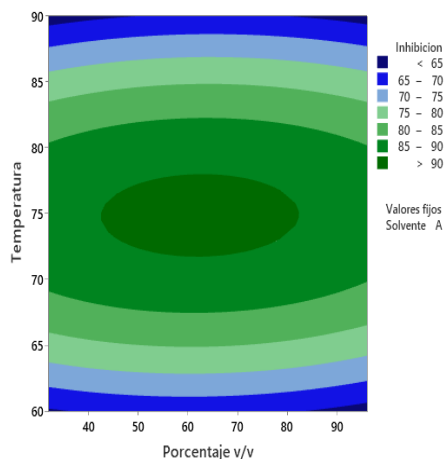


Figura 2. Diámetro de colonia de *M. roreri* en medio de cultivo PDA+ tratamientos inhibitorios en los primeros 7 días de evaluación.

Gráfica de contorno de Inhibición vs. Temperatura; Porcentaje v/v



Gráfica de contorno de Inhibición vs. Temperatura; Porcentaje v/v

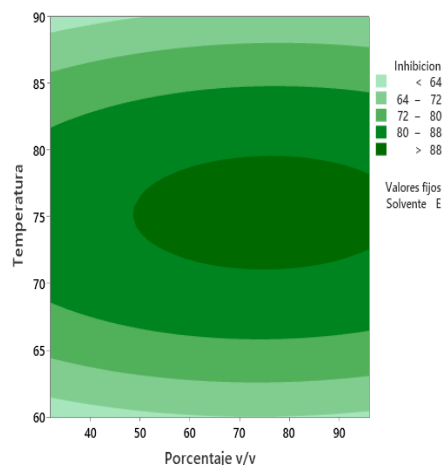


Figura 3. Gráficas de contorno de inhibición de solvente A y E con temperatura vs. porcentaje v/v.

El análisis de regresión generó la Ecuación 3 y la gráfica de superficie de respuesta (Figura 4), que corresponden al modelo optimizado para las variables temperatura y concentración sobre la variable categórica tipo de solvente. Esta ecuación es un modelo cuadrático que se ajustan bien al considerar el diseño experimental aplicado al solvente acetato de etilo por presentar mejores rendimientos. Este solvente en particular mostró un excelente coeficiente de determinación (R²) del 98.96 %, acompañado por una R² ajustada del 97.77 % y un R² de predicción del 92.54 %. Además, las pruebas de falta de ajuste realizadas en los modelos cuadráticos no resultaron ser significativas ($p > 0.05$), lo que indica que los datos se representan de manera adecuada en relación con el diseño experimental utilizado.

A nivel de laboratorio, después de la siembra del patógeno, se observó que el efecto inhibitorio de los extractos de *C. frutescens* se redujo al séptimo día de evaluación (Figura 5); por lo que se realizaron réplicas de *M. roreri* cada 7 días en PDA con el mismo tratamiento, tomando las cepas que previamente habían sido sometidas al tratamiento. Al cabo de 28 días se observó pérdida de capacidad de crecimiento y multiplicación. A nivel microscópico, en la estructura micelial (Figura 6A), se evidenció que a los 7 días del tratamiento las estructuras reproductoras de *M. roreri* se vieron afectadas dado que los conidióforos de las hifas perdieron la capacidad de alargarse para formar los conidios (Figura 6B). A los 14 días de evaluación, se notó rotura de la membrana y de la pared celular del fitopatógeno, lo que generó pérdida del protoplasma, malformación de las hifas y ausencia de conidiósporas (Figura 6C). Lo anterior permite establecer que, en caso *in vitro*, el efecto inhibitorio del extracto obtenido con el solvente acetato de etilo requiere de una aplicación cada 7 días por mínimo 21 días para lograr su máxima eficacia.

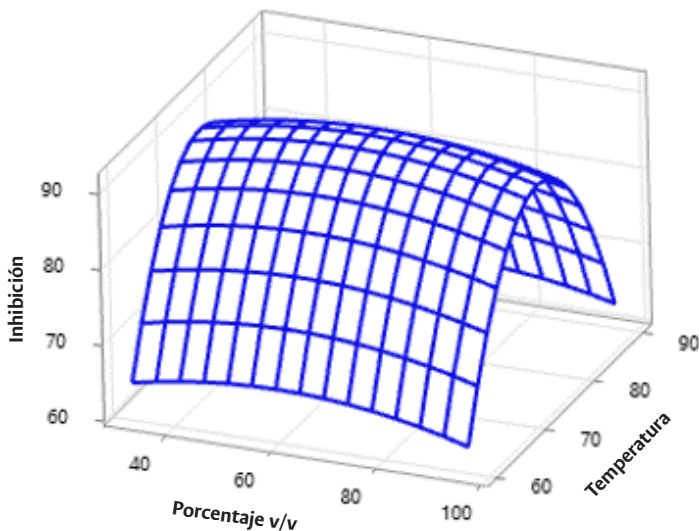


Figura 4. Superficie de inhibición vs. temperatura; porcentaje v/v.

Algunos autores mencionan que el posible efecto inhibitorio se debe a que el ají posee una mezcla de amidas con propiedades antifúngicas (Langenheim, 2003; Elad *et al.*, 2007; Sánchez y Garcés, 2012; Mejía, 2013; Li *et al.*, 2020). Estas son sustancias nitrogenadas de naturaleza lipídica, que se clasifican como alcaloides y actúan a nivel celular interfiriendo en la replicación del DNA de los microorganismos, específicamente impidiendo el intercambio catiónico en la membrana, lo cual altera las respuestas del microorganismo a los estímulos externos, y a su vez le impide la excreción de sustratos desde el citoplasma, además de la inhibición de enzimas y la disminución de la capacidad de modular el funcionamiento de los quimiorreceptores y nociceptores; ello genera señales y estímulos de irritación que afectan los mecanismos de defensa e inducen el estrés y deterioro celular.

Conclusiones

El uso del método de superficie de respuesta (MSR) es eficiente para la optimización de procesos de extracción de metabolitos con diversos usos o aplicaciones, ya que permite predecir comportamientos reales de las variables de respuesta a nivel de laboratorio, maximizando el uso de recursos.

Fue posible mejorar el efecto de los extractos de ají con propiedades antifúngicas para el control *in vitro* de *M. roreri* a través de la optimización de la acción de los compuestos obtenidos a partir de un adecuado proceso de extracción. Con ello, se logró inhibir el crecimiento micelial más del 90 %, mediante los extractos que fueron obtenidos con solvente acetato de etilo al 62 %, a una temperatura de 75 °C; por lo que se consideran como materia prima potencial para la producción de biofungicidas. Esto tiene implicaciones beneficiosas en la creación de productos que tengan un impacto reducido en el entorno y en la salud de agricultores y consumidores.

$$\begin{aligned} \text{Inhibición} = & 541.2 + 0.275p\text{Porcentaje v/v} \\ & + 16.671 \text{ temperatura} \\ & 0.00276 \text{ porcentaje v/v} * \text{porcentaje v/v} \\ & 0.11179 \text{ temperatura} * \text{temperatura} \\ & + 0.00094 \text{ porcentaje v/v} * \text{temperatura} \end{aligned}$$

(Ec. 3)

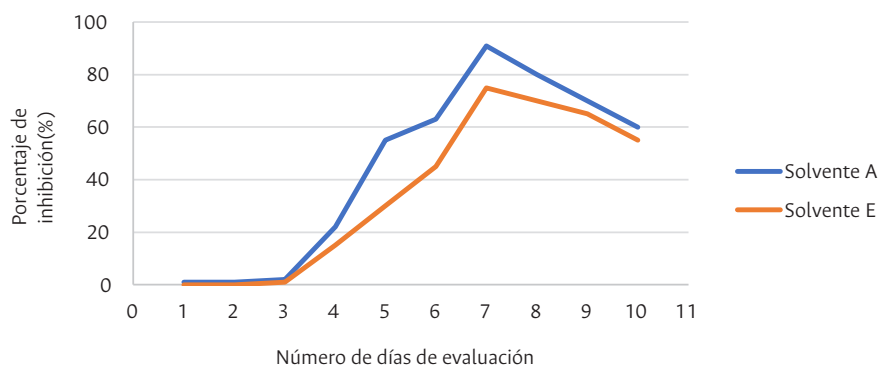


Figura 5. Dinámica de inhibición del patógeno frente a los solventes.

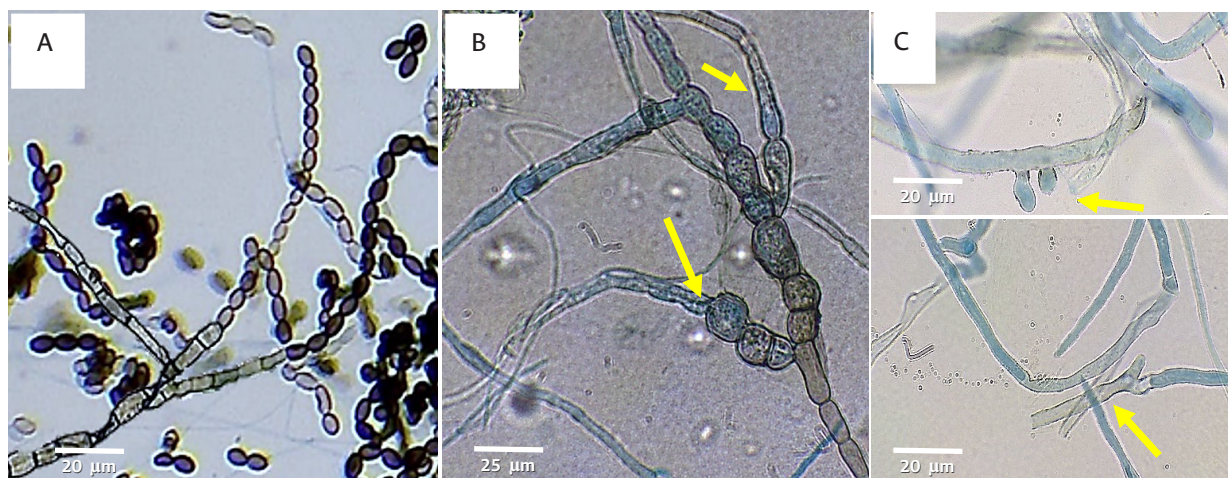


Figura 6. Microscopía de colonia de *M. roleri*, (A) 20x previo a los tratamientos; (B y C) 40x posterior al tratamiento.

Referencias

- Antolínez Sandoval, E. Y.; Almanza Merchán, P. J.; Barona Rodríguez, A. F.; Polanco Díaz, E. y Serrano Cely, P. A. (2020). Estado actual de la cacaocultura: una revisión de sus principales limitantes. *Ciencia y agricultura*, 17(2), 1-11. <https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n2.2020.10729>
- Anzules Toala, V.; Borjas Ventura, R.; Alvarado Huamán, L.; Castro Cepero, V. y Julca Otiniano, A. (2019). Control cultural, biológico y químico de *Moniliophthora roleri* y *Phytophthora* spp. en *Theobroma cacao* 'CCN 51'. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 511-520. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>
- Aranzazu, H. F. y Jaimes, S. Y., (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roleri*). Corpoica. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12699>
- Beltrán Delgado, Y.; Morris Quevedo, H.; De la Cruz, E. R.; Quevedo Morales Y. y Bermúdez Savón, R. C. (2013). Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(2), 121-129. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002013000200001&lng=es&tlng=pt
- Blanco Ríos, A. K.; Medina Juárez, L. Á.; González Aguilar, G. A. y Gámez Meza, N. (2013). Antioxidant activity of the phenolic and oily fractions of different sweet bell peppers. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 57(2), 137-143.
- Bosland, P. W.; Votava, E. J. y Votava, E. M. (2012). *Peppers: Vegetable and spice capsicums. Crop production science in horticulture*. CABI.
- Cárdenas, D.; Sua, S.; y Castaño Arboleda, N. (2022). *Herbario amazónico colombiano*. Version 9.13. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI. https://ipt.biodiversidad.co/sinchi/resource?r=coah_sinchi
- Cárdenas Pardo, N.; Aquiles Enrique, S. R. y Rodríguez, A. (2017). Spatial analysis of diseases incidense in different cocoa genotypes (*Theobroma cacao* L.) in Yopal (Casanare), Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 22(2), 209-220. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.61161>
- Compañía Nacional de Chocolates - CNC. (2019). *La moniliasis del cacao: daños, síntomas, epidemiología y manejo*. Área de Fomento Agrícola. <https://www.agrosavia.co/media/11540/69317.pdf>
- Correa Álvarez, J.; Castro Martínez, S. y Coy, J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roleri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388-399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>

- Cruz Lagla, M. y Dávila Castro, C. M. (2021). *Aplicación de fungicidas con diferentes dosis para el control de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo del cacao (Theobroma cacao) en el sector Gualipe*. [Tesis de grado]. Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7299>
- Cruz Pérez, A. B.; González Hernández, V. A.; Soto Hernández, R. M.; Gutiérrez Espinosa, M. A.; Gardea Béjar, A. A. y Pérez Grajález, M. (2007). Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. *Agrociencia*, 41(6), 627-635.
- Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. y Delen, N. (2007). Botrytis spp. y las enfermedades que causan en los sistemas agrícolas: una introducción. En *Botrytis: biología, patología y control* (pp. 1-8). Springer.
- Evans, H. C.; Stalpers, J. A.; Samson, R. A. y Benny, G. L. (1978). On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 56(20). <https://doi.org/10.1139/b78-305>
- Flores Martínez, H.; León Campos, C.; Estarrón Espinosa, M. y Orozco-Ávila, I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 773-785. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62048168009>
- Fountain, A. y Huetz Adams, F. (2020). *Barómetro del cacao 2020*. [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://voicenetwork.cc/wp-content/uploads/2021/04/2020-Baro%CC%81metro-del-Cacao-ES.pdf](https://voicenetwork.cc/wp-content/uploads/2021/04/2020-Baro%CC%81metro-del-Cacao-ES.pdf)
- Guerrero, C. y Risco, L. (2019). Efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias.
- Gutiérrez F. C. (2015). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de paico (*Chenopodium ambrosioides*), khoa (*Clinopodium bolivianum*) y ruda (*Ruta graveolens*) frente a *Moniliophthora* spp. aislada a partir de muestras de cacao con moniliasis, la Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés.
- Jeong, W. Y.; Jin, J. S.; Cho, Y. A.; Lee, J. H.; Park, S.; Jeong, S. W.; Kim, Y. H.; Lim, C. S.; Abd El Aty, A. M.; Kim, G. S. et al. (2011). Determination of polyphenols in three *Capsicum annum* L. (bell pepper) varieties using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(21), 2967-2974. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201100524>
- Langenheim, J. H. (2003). Ecological roles of resins. In *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany* (pp. 196-253). Timber Press Science.
- Leos Escobedo, L.; García Carrillo, M.; Delgadillo Martínez, J.; Valenzuela García, A. A.; Angulo Castro, A.; Preciado Rangel, P. y Rueda Puente, E. O. (2022). Elaboración y rizobacterias en el control biológico de *Phytophthora capsici* en cultivares de *Capsicum annum*. *Biotecnia*, 24(1), 30-37. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i1.1490>
- Li, Y.; Bai, P.; Wei, L.; Kang, R.; Chen, L.; Zhang, M.; Tan, E. K. y Liu, W. (2020). Capsaicin functions as *Drosophila* ovipositional repellent and causes intestinal dysplasia. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66900-2>
- Meckelmann, S. W.; Riegel, D. W.; Van Zonneveld, M. J.; Ríos, L.; Peña, K.; Ugas, R.; Quinónez, L.; Mueller Seitz, E. y Petz, M. (2013). Compositional characterization of native Peruvian chili peppers (*Capsicum* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(10), 2530-2537. https://doi.org/10.1021/JF304986Q/SUPPL_FILE/JF304986Q_SI_001.XLS
- Mejía F. (2013). Aislamiento y caracterización fisicoquímica de la capsaicina de tres variedades de ají. [Tesis de grado]. Facultades de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://doi.org/10.1021/jf304986q>
- Morán Bañuelos, S. H.; Aguilar Rincón, V. H.; Corona Torres, T.; Castillo González, F.; Soto Hernández, R. M y San Miguel Chávez, R. (2008). Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia*, 42(7), 807-816.
- Ortiz García, C. F.; Torres de la Cruz, M. y Hernández-Mateo, S. C. (2015). Comparación de dos sistemas de manejo del cultivo del cacao, en presencia de *Moniliophthora roreri*, en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(2), 191-196. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802015000200009
- Ramírez Gil, J. G. (2017). Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., en la hacienda Theobroma, Colombia. *Revista Protección Vegetal*. 31(1), 42-49. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v31n1/rpv06116.pdf>
- Restrepo Gallego, M.; Llanos Ríos, N. y Fonseca Echeverri, C. E. (2007). Composición de las oleorresinas de dos variedades de ají picante (habanero y tabasco) obtenidas mediante lixiviación con solventes orgánicos. *Revista Lasallista de Investigación*, 4(1), 14-19. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492007000100003&lang=es
- Risco, L. (2019). Efecto de seis extractos vegetales sobre el desarrollo del agente causal de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L.). https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UTEQ_5021e5627ad61c02475b02b5e2689352
- Rodríguez Miranda, J.; Hernández Santos, B.; Herman Lara, E.; Gómez-Aldapa, C. A.; García, H. S. y Martínez-Sánchez, C. E. (2014). Efecto de algunas variables sobre el rendimiento de extracción de aceite de semilla de calabaza mexicana. *CyTA - Revista de Alimentación*, 12(1), 9-15. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.777123>
- Sánchez Mora, F. D. y Garcés Fiallos, F. R. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 3(3), 249-258. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357633703006>
- Shi, Z.; El Obeid, T.; Riley, M.; Li, M.; Page, A. y Liu, J. (2019). High chili intake and cognitive function among 4582 adults: An open cohort study over 15 years. *Nutrients*, 11(5), 1183. <https://doi.org/10.3390/NU11051183>
- Tirado Gallego, P. A.; Lopera Álvarez, A. y Ríos Osorio, L. A. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 417-430. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517
- Ugarte, K. (2020). *Uso de cinco extractos botánicos en el control de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao*. Universidad Técnica de Machala.