



Actividad antifúngica *in vitro* de mezcla de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima*

In vitro antifungal activity of a mix orange terpenes against *Alternaria tenuissima*

Eber Addí Quintana-Obregón¹, Reyna Isabel Sánchez-Mariñez², Mario Onofre Cortez-Rocha³,
Gustavo Alfonso González-Aguilar⁴

¹CONACYT-CIAD, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán, Carretera El dorado Km 5.5, Col. Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, C.P. 80110 México. ²Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro. Hermosillo, Sonora, C.P. 83000, México. ³Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro. Hermosillo, Sonora, C.P. 83000, México. ⁴Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria km. 0.6, Hermosillo, Sonora, C.P. 83000, México.

Eber Addí Quintana-Obregón, e-mail: eber.quintana@ciad.mx

RESUMEN

Antecedentes: El género *Alternaria* en cártamo es de ocurrencia natural y plaguicidas sintéticos son utilizados para su control. En sustitución de estos compuestos el uso de alternativas de origen natural como los aceites esenciales, entre ellos los terpenos, puede ser viable para el control de estos hongos.

Objetivos: Evaluar la actividad antifúngica de una mezcla comercial de terpenos de naranja sobre el crecimiento *in vitro* de *Alternaria tenuissima* aislada de cártamo.

Métodos: La composición de volátiles de una mezcla de terpenos fue determinada por cromatografía de gases acoplado a masas. Posteriormente se calculó la concentración mínima inhibitoria y la concentración inhibitoria media a partir del crecimiento radial de *A. tenuissima* y se evaluó su efecto sobre la germinación de esporas y parámetros morfométricos.

Resultados y conclusiones: Se encontró una incidencia de 13.31 ± 2.19 % de *A. tenuissima* en semilla de cártamo. Asimismo, se detectó 96 % de dextro-limoneno en la mezcla de terpenos. En germinación de esporas a 538 ppm (concentración inhibitoria media) de terpenos, se observó inhibición sobre crecimiento del hongo. La mezcla de terpenos de naranja puede ser una alternativa para el control del *A. tenuissima*.

PALABRAS CLAVE: D-limoneno, extractos naturales, hongo fitopatógeno

ABSTRACT

Background: The genus *Alternaria* in safflower is naturally occurring and synthetic pesticides are commonly used. In substitution of these compounds the use natural compounds such as essential oils (for example terpene) are alternative possible as antifungal in *Alternaria*.

Objective: To evaluate the *in vitro* antifungal activity of an orange terpenes mix against *Alternaria tenuissima* isolated from safflower.

Methods: The volatile composition of a terpene mixture was quantified with mass-coupled gas chromatography. The minimum inhibitory concentration and mean inhibitory concentration were calculated from the radial growth in *A. tenuissima* and its effect on spore germination and morphometric parameters was evaluated.

Results and conclusions: *A. tenuissima* showed an incidence of 13.31 ± 2.19 % in safflower seed. A composition of 96 % D-limonene in orange terpenes was determinate. Germination of *A. tenuissima* spores was inhibited at 538 ppm of terpenes. The orange terpenes can be an alternative for the control of *A. tenuissima*.

KEYWORDS: D-limonene, natural extracts, phytopathogenic fungus

Recibido / Received: 02/05/2016

Aceptado / Accepted: 25/04/2017

INTRODUCCIÓN

La presencia del género *Alternaria* en cártamo es de ocurrencia natural (Mortensen *et al.*, 1983). En México, en cultivos comerciales de cártamo, particularmente en el Valle del Yaqui, Sonora, se ha aislado e identificado en la periferia de manchas foliares de la enfermedad denominada falsa cenicilla (Quintana-Obregón *et al.*, 2011; Quintana-Obregón *et al.*, 2013a). El género también está reportado en otros cultivos como manzanos, perales, brócoli, y trigo entre otros, afectando la producción y las ganancias del agricultor (Tietjen *et al.*, 1983; Mortensen *et al.*, 1983; Jones y Aldwinckle, 2002; Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Perelló *et al.*, 2015; Woudenberg *et al.*, 2015).

En la actualidad, uno de los medios para controlar la presencia de hongos en campo, es la aplicación de compuestos químicos sintéticos, principalmente de la familia de los azoles (Quintana-Obregón *et al.*, 2013b). Sin embargo, los problemas asociados a estos compuestos como lo son el desarrollo de resistencia en cepas fúngicas (Bader *et al.*, 2015), han motivado a la búsqueda de alternativas con riesgos aceptables para el medio ambiente y la salud humana. Los aceites esenciales son un grupo de compuestos extraídos de fuentes naturales, de algunos de ellos se ha demostrado su capacidad antifúngica contra diversas especies (Adeyinka y Richard, 2015). Los terpenos son compuestos químicos entre los que se pueden encontrar hormonas, pigmentos o aceites esenciales extraídos de algunos cítricos. Los aceites esenciales por lo general son monoterpenos, y los más comunes son el limoneno y el mentol (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). Generalmente son utilizados por sus propiedades aromáticas, así como en la medicina tradicional, en remedios herbolarios, efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos (Croteau *et al.*, 2000). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de una mezcla comercial de terpenos de naranja sobre el crecimiento *in vitro* de *Alternaria tenuissima* aislada de cultivos de cártamo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Alternaria tenuissima*

Para obtener un aislado de *A. tenuissima* se colectaron semillas de un cultivo comercial de cártamo (CIANO-Oleica) del Valle del Yaqui, Sonora, México. Las semillas se desinfectaron por remojo

en una solución de NaOCl al 0.5% durante 2 min, se drenaron y lavaron por 3 min con agua estéril. Posteriormente se secaron en el área estéril de una campana de flujo laminar por 30 min. Las semillas desinfectadas se distribuyeron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían 15 mL de medio Agar Papa Dextrosa (APD) solidificado y estéril (10 semillas por placa). Las placas se incubaron a 25 °C hasta observar la formación de las colonias características de *A. tenuissima* y se determinó el porcentaje de infección en semillas. Con las colonias obtenidas se hicieron resiembras de las esporas en APD e incubaron a 25 °C durante 7-10 días para hacer la identificación de la cepa como lo reportan Quintana-Obregón *et al.* (2013a). Finalmente, se prepararon suspensiones de esporas agregando de 5-10 mL de Tween® 20 (0.1%) estéril y se determinó la concentración de esporas por mililitro de solución en una cámara de Neubauer.

Aceite esencial

Se utilizó una muestra comercial de terpenos de naranja (Aldrich W522708, Sigma-Aldrich, Francia), la cual se analizó mediante cromatografía de gases de acuerdo al procedimiento descrito por del Toro-Sánchez *et al.* (2010), para determinar su pureza a partir de su estructura química. La identificación de volátiles se realizó con un cromatógrafo de gases GC-3400Cx, acoplado a un detector selectivo de masas Saturn 2100T (Varian®, México) (GC-MS). La columna capilar utilizada fue DB-5 (30 m x 0.25 mm) (J&C Scientific, Agilent Technologies®, Pennsylvania, USA), dicha columna se acondicionó con un incremento de temperatura de 55 a 65 °C (1 °C/min), manteniéndose la temperatura por 3 min. Posteriormente, la temperatura se incrementó de 65 a 290 °C (10 °C/min) y temperatura final por 10 min. El gas acarreador utilizado fue helio a un flujo de 1 mL/min. Para la detección GC-MS se utilizó un sistema de ionización eléctrico de 70 eV. Las temperaturas del inyector y de la línea de transferencia MS fueron de 100 y 290 °C, respectivamente. Los constituyentes se identificaron mediante la comparación de espectros con la base de datos del sistema CG-MS llamado NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, USA).

Crecimiento radial

Se prepararon medios de cultivos en APD mezclados con diferentes concentraciones del aceite esencial (0, 10, 100, 500,



1000 y 10,000 ppm). Para ello se esterilizó el medio APD con Tween® 80 (1 %), dejándose enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C. Posteriormente se incorporó la cantidad de aceite esencial requerida para obtener las concentraciones deseadas y se prepararon placas en cajas de Petri, con 15 a 20 mL de medio. La siembra del hongo se realizó mediante inoculación por siembra en pozo, perforando el centro de cada placa con una pipeta Pasteur y en cada uno se adicionó 25 µL de inóculo conteniendo una concentración de 1×10^5 esporas/mL de *A. tenuissima* suspendidas en Tween® 20 (0.1 %). Asimismo, se preparó un control conteniendo únicamente APD e inóculo. Las placas se incubaron a 25 °C con fotoperiodo de 12 h luz-obscuridad. Se midió el diámetro de la colonia cada 12 h hasta que en la placa del control, ésta cubrió del 80-90 % de la superficie. Con los porcentajes de inhibición obtenidos se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración inhibitoria media (CI_{50}) a partir de análisis Probit utilizando el programa estadístico NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Utah, USA).

Germinación de esporas

Con la CI_{50} obtenida se evaluó el efecto sobre la germinación de esporas mediante inoculación por siembra en placa. Para ello se inocularon 1×10^4 esporas/mL distribuidas uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo en la placa. El medio se preparó como se describió anteriormente en la prueba de crecimiento radial, pero sin perforar el medio sólido. Las placas se incubaron a 25 °C con fotoperiodo de 12 h luz-obscuridad. Posteriormente se tomaron muestras aleatorias a las 4, 8, y 18 h después de la incubación. Las muestras se observaron en el microscopio óptico y en cada placa de Petri se contó el número de esporas germinadas y no germinadas, así como el número de polos desarrollados. Se definió que una espora polarizada es la que presenta pequeñas protuberancias sobre su superficie, o bien, la presencia de un túbulo germinal siempre y cuando este sea menor que el diámetro de la espora (Harris, 1999). Finalmente se calculó el porcentaje de germinación.

Mediciones morfométricas

El ensayo de germinación de esporas se realizó con la CI_{50} obtenida por Probit y controles, se tomaron entre 10 y 20 imágenes

al azar en diferentes campos a magnificaciones de 400 y 1000x. A cada una se le realizaron mediciones morfométricas de las esporas hasta tener al menos 25 observaciones a 400x utilizando el programa Image-Pro Plus v. 6.3 (Media Cybernetics, Inc., USA, 1993-2008). Se midió la longitud y el diámetro promedio de las esporas. El ensayo se realizó por triplicado, obteniéndose de 75-100 mediciones por cada tratamiento.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos (promedios y desviación estándar) de crecimiento radial, germinación de esporas y morfométricos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha = 0.05$) para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos (concentraciones de mezcla de terpenos). Además, se realizaron pruebas de rangos múltiples de Tukey en intervalo de confianza del 95 % utilizando el programa estadístico JMP versión 5.0 (SAS, 2002, Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis cromatográfico del aceite esencial de la mezcla de terpenos de naranja mostró como componente mayoritario a la fracción dextro-limoneno, y en menor proporción otros compuestos (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del cromatograma de mezcla de terpenos

Tiempo (min) de retención	% en la mezcla	Compuesto químico identificado
6.500	0.623	3-Careno
8.177	0.325	beta-Terpineno
9.109	1.316	beta-Pinene
11.186	96.807	dextro-Limoneno
15.519	0.329	beta-Linalol
16.562	0.386	óxido de Limoneno
19.221	0.213	(+)-Carvona

Este resultado concuerda con lo reportado en estudios previos, donde el D-limoneno fue el componente mayoritario en mezclas de terpenos extraídos de naranja (Kelebek y Selli, 2011). El D-limoneno es considerado un compuesto de baja toxicidad y es reconocido como un constituyente GRAS (generalmente

reconocido como seguro) en los alimentos por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos de Norteamérica (Food and Drug Administration, FDA), por lo que una de sus aplicaciones ha sido como ingrediente activo para prevenir el desarrollo de algunas plagas (Sun, 2007; Ciriminna *et al.*, 2014). Por lo tanto, la mezcla de terpenos puede considerarse para su evaluación como antimicrobiano en la conservación de alimentos.

En el ensayo de porcentaje de infección interna de semillas de cártamo colectadas, se encontró una incidencia de *A. tenuissima* del 13.31 ± 2.19 %, considerando que ésta se propaga sistemáticamente en el interior de la semilla. Este porcentaje de infección en semilla está ≈ 6 % por debajo de lo reportado previamente por Quintana-Obregón *et al.* (2011), quienes encontraron 19.5 % de infección en la semilla. Con los datos anteriores, se confirma el problema de infección sistémica del cártamo con *A. tenuissima*, ya que la infección proviene desde el interior de la semilla, por lo que es necesario buscar mecanismos de control que rompan este tipo de cadena de infección sistémica.

En la prueba de crecimiento radial del hongo, el tratamiento con medio APD cubrió el 90 % de la placa a las 192 h de incubación. No se encontraron diferencias significativas en crecimiento radial entre los tratamientos con APD y APD con Tween® 80. El radio de la colonia de *A. tenuissima* en medio APD fue de 35 ± 1.33 mm. La observación de que el hongo no es afectado por la presencia de Tween® 80 en el medio, nos permite sugerir que este surfactante es un vehículo adecuado para la aplicación de aceites esenciales en *A. tenuissima*, ya que no tiene efecto sobre la inhibición del hongo, ni favorece su desarrollo. Un efecto similar del Tween® 80 se observó en cultivos en medio sólido de *Aspergillus fumigatus* sin embargo, en medio líquido si se reportó la inhibición de los hongos estudiados (Inouye *et al.*, 2001). Lo anterior se puede deber a la capacidad surfactante no iónica que presenta el Tween® 80 (Ruiz, 2009). Además, los resultados diferentes observados entre medios de cultivo líquido y sólido, probablemente se deban a la interacción que se da sobre la superficie de la célula, siendo mayor el contacto en condiciones líquidas. Al utilizar medio sólido en nuestro estudio, el Tween® 80 no afectó el desarrollo de las esporas. Por otra parte, a las 96 h de incubación se encontraron diferencias significativas entre la mezcla de terpenos y los controles a partir de las 500 ppm en medio APD (Tabla

2). Con estos datos se calcularon las CI_{50} y la CMI con análisis Probit, siendo éstas de 538 y 80,946 ppm, respectivamente. No se han encontrado reportes previos del uso de aceites esenciales para el control de *A. tenuissima*, ni de inhibición por el D-limoneno en las bases de datos disponibles. En otros géneros de hongos si se ha estudiado su capacidad antifúngica, evaluando principalmente la inhibición en especies de *Aspergillus* en concentraciones de hasta 500,000 ppm (CMI). Sin embargo, para el caso de especies micotoxigénicas como en *Aspergillus flavus* se requirió de una menor concentración, 62,000 ppm (Gomes *et al.*, 2014), similar a la obtenida en nuestro estudio. Esta información adquiere especial interés, ya que se ha reportado la producción de metabolitos secundarios citotóxicos por especies del género *Alternaria*, incluida *A. tenuissima* (Wu *et al.*, 2014). Por lo anterior, es necesario determinar el efecto de estos compuestos en la producción de metabolitos secundarios que pudieran considerarse como micotoxinas, principalmente con presencia del D-limoneno para descartar o confirmar la estimulación de estos compuestos como respuesta a la inhibición causada por el aceite esencial como un mecanismo de defensa.

Tabla 2. Efecto de la mezcla de terpenos a diferente concentración sobre el crecimiento radial de *A. tenuissima* a las 96 horas de incubación, a 25 °C

Concentración (ppm)	Radio de la colonia (mm)
0	20.75 ± 0.43^A
10	19.00 ± 1.80^{AB}
100	16.67 ± 1.75^B
500	12.17 ± 0.15^C
1000	9.83 ± 0.58^C
10,000	0 ± 0^D

*Promedio de tres replicas y DE. Letras en superíndices indican grupos estadísticos en columna ($P < 0.05$).

En el ensayo de germinación de esporas no se encontró diferencia significativa entre el medio APD y el medio APD con Tween® 80 (1 %), corroborando que en la etapa de germinación de esporas, previa a la etapa de crecimiento radial, la presencia del surfactante no estimula ni inhibe el desarrollo de la espora. Con respecto al tratamiento con terpenos, las evaluaciones con las CI_{50} permiten dosificar el medio de cultivo a concentraciones



donde es posible observar mecanismos de respuesta en un corto período. En la Figura 1 se presenta la cinética de germinación de esporas de *A. tenuissima* con la CI_{50} calculada. Se encontró diferencia significativa a las 8 y 12 h, inhibiéndose la germinación con el tratamiento con la mezcla de terpenos. Después de las 24 h el hongo alcanzó un 100 % de germinación de esporas. Con respecto al número de polos inducidos o inhibidos por los tratamientos, solo se encontró diferencia significativa a las 8 h entre el tratamiento control y el control Tween® 80, siendo el promedio de polos de 0.97 ± 0.11 y 1.60 ± 1.00 , respectivamente. Este ligero aumento en el tratamiento con Tween®80 pudiera indicar un incremento en la actividad de la división nuclear previo a la polarización y a la elongación del túbulo germinal.

No se observó ninguna tendencia en la evaluación de los parámetros morfométricos que aportara pruebas contundentes de alteraciones por la mezcla de terpenos (Tabla 3), siendo el efecto solo en la disminución de la germinación y evidenciado en el desarrollo posterior del micelio en crecimiento radial. Con estos datos se puede concluir que la mezcla de terpenos con el componente mayoritario D-limoneno, puede ser considerado en estudios posteriores para el tratamiento de semillas y prevenir el

desarrollo de *A. tenuissima*. Por otra parte, el evaluar el efecto de estos en fase de vapor, podría incrementar la actividad anti-fúngica del hongo (Laird y Phillips, 2012).

Tabla 3. Efecto de la CI_{50} de la mezcla de terpenos en la morfometría de esporas de *Alternaria tenuissima*

Tratamiento	Ancho (µm)	Largo (µm)
4 horas de incubación		
Control	34.09 ± 7.62 ^A	61.56 ± 15.34 ^A
Control Tween	32.06 ± 7.63 ^{AB}	53.19 ± 16.52 ^B
Terpeno	30.03 ± 7.68 ^B	47.21 ± 12.89 ^B
8 horas de incubación		
Control	25.52 ± 6.66 ^B	50.58 ± 12.89 ^A
Control Tween	30.00 ± 9.22 ^{A^B}	52.26 ± 14.08 ^A
Terpeno	28.31 ± 7.44 ^{A^B}	50.10 ± 12.00 ^A
12 horas de incubación		
Control	30.00 ± 7.40 ^C	53.58 ± 12.04 ^A
Control Tween	36.26 ± 10.05 ^A	56.25 ± 15.59 ^A
Terpeno	34.60 ± 10.62 ^{AB}	54.83 ± 16.87 ^A

*Promedio de 75 datos y DE. Letras superíndices indican grupos estadísticos en columnas por tiempo de incubación ($P < 0.05$).

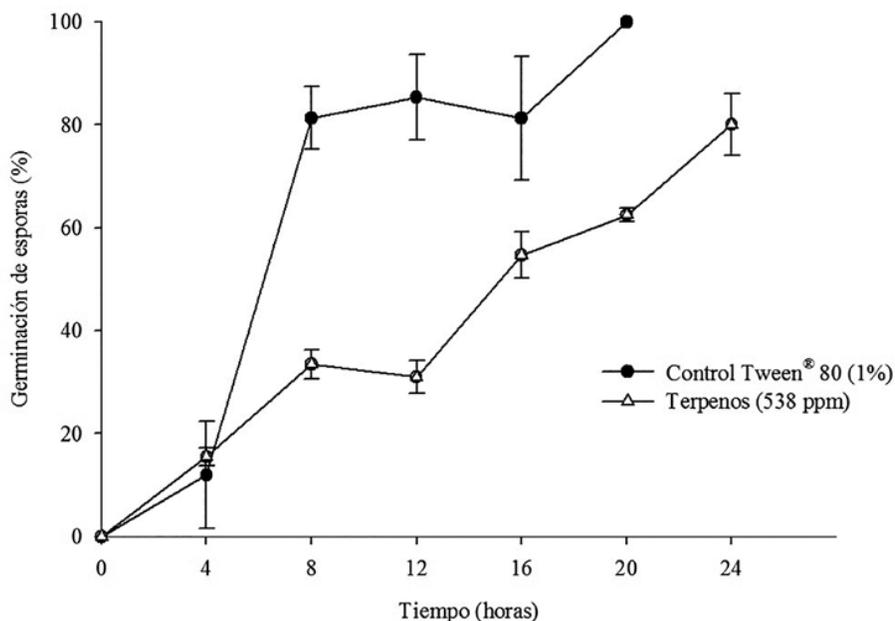


Figura 1. Porcentaje de germinación de esporas (promedio y DE) de *Alternaria tenuissima* a 25°C, control Tween® 80 y tratamiento con la mezcla de terpenos.

En conclusión, la mezcla de terpenos de naranja puede ser considerada como una alternativa viable para el control de *Alternaria tenuissima*. Sin embargo, antes de su uso experimental será necesario evaluar los efectos de su aplicación sobre la posible activación o inhibición en la producción de metabolitos secundarios, así como determinar la actividad antifúngica en otras fases de aplicación, como el vapor del aceite.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (Prodep) por el financiamiento del proyecto de incorporación de nuevos PTC “Elucidación de mecanismos morfométricos de inhibición de aceites esenciales y quitosano en hongos fitopatógenos de importancia en México”, con folio CESUES-PTC-021.

LITERATURA CITADA

- Adeyinka, A., F. Richard, 2015. Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: a review. *International Journal of Biotechnology and Food Science* 3: 31-35.
- Ávalos-García, A., E. Pérez-Urria, 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, serie Fisiología Vegetal 2: 119-145.
- Bader, O., J. Tünnermann., A. Dudakova, M. Tangwattanachuleeporn, M. Weig, U. Groß, 2015. Environmental azole resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59: 4356-4359.
- Ciriminna, R., M. Lomeli-Rodríguez, P. Carà, J.A. López-Sánchez, M. Pagliaro, 2014. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chemical Communications* 50: 15288-15296.
- Croteau, R., T.M. Kutchan, N.G. Lewis, 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., W. Gruissem, R. Jones (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Wiley. Pp.1250-1318.
- del Toro-Sánchez, C.L., J.F. Ayala-Zavala, L. Machi, H. Santacruz, M.A. Villegas-Ochoa, E. Álvarez-Parrilla, G.A. González-Aguilar, 2010. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 67: 431-441.
- Fraire-Cordero, M.L., D. Nieto-Ángel, E. Cárdenas-Soriano, G. Gutiérrez-Alonso, R. Bujanos-Muñoz, H. Vaquera-Huerta, 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 25-33.
- Gomes, M.S., M.d.G. Cardoso, M.J. Soares, L.R. Batista, S.M.F. Machado, M.A. Andrade, C.M.O. de Azeredo, J.M. Valerio, L.M. Rodrigues, 2014. Use of essential oils of the genus *Citrus* as biocidal agents. *American Journal of Plant Sciences* 5: 299-305.
- Harris, S.D., 1999. Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Microbiology* 145: 2747-2756.
- Inouye, S., T. Tsuruoka, K. Uchida, H. Yamaguchi, 2001. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology and Immunology* 45: 201-208.
- Jones, A.L., H.S. Aldwinckle, 2002. *Plagas y enfermedades del manzano y del peral*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Kelebek, H., S. Selli, 2011. Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 1855-1862.
- Laird, K., C. Phillips, 2012. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology* 54: 169-174.
- Mortensen, K., J.W. Bergman, E.E. Burns, 1983. Importance of *Alternaria carthami* and *A. alternata* in causing leaf spot diseases of safflower. *Plant Disease* 67: 1187-1190.
- Perelló, A., M. Aulicino, C. Martinelli, M. Regueira, V. Moreno, S. Stenglein, 2015. Caracterización morfo-cultural de nuevos grupos taxonómicos de *Alternaria* asociados a enfermedades del trigo en Argentina. *Revista Ciencias Morfológicas* 17: 1-15.
- Quintana-Obregón, E.A., J. López-Cervantes, L.A. Chávez-Cira, D.I. Sánchez-Machado, M.O. Cortez-Rocha, 2011. Actividad antifúngica del quitosano contra *Alternaria tenuissima* *in vitro* y en semilla de cártamo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 168-171.
- Quintana-Obregón, E.A., M. Plascencia-Jatomea, A. Burgos-Hernández, P. Figueroa-López, M.O. Cortez-Rocha, 2013a. Aislamiento e identificación de hongos de las hojas infectadas con la falsa cenicienta en cultivos de cártamo en el Valle del Yaqui, México. *Revista Mexicana de Micología* 37: 19-27.
- Quintana-Obregón, E.A., M. Plascencia-Jatomea, M.O. Cortez-Rocha, 2013b. Impacto del uso de azoles: Implicaciones agrícolas y daños a la salud. In: Ramírez de León, J.A., R.M. Uresti-Marín, M.L. Aldana-Madrid, M.G.F. Loarca-Piña (eds.), *Avances en Ciencia y Tecnología Alimentaria en México*. Editorial Plaza, México, D.F. Pp. 523-536.
- Ruiz, L.F., 2009. Actividad superficial de mezclas de soluciones de surfactantes no-iónicos Tween 20 y Tween 80 en interfaz líquido-aire. Tesis de Licenciatura, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Carabobo.
- Sun, J., 2007. D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review* 12: 259-264.
- Tietjen, K.G., E. Schaller, U. Matern, 1983. Phytotoxins from *Alternaria carthami* chowdhury: structural identification and physiological significance. *Physiological Plant Pathology* 23: 387-400.
- Woudenberg, J.H.C., M.F. Seidl, J.Z. Groenewald, M. de Vries, J.B. Stielow, B.P.H.J. Thomma, P.W. Crous, 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82: 1-21.
- Wu, W.B., G.C. Yue, Q.L. Huang, L.L. Sun, W. Zhang, 2014. A new compound from an endophytic fungus *Alternaria tenuissima*. *Journal of Asian Natural Products Research* 16: 777-782.