

Inefficiency of capsaicin to inhibit *in vitro* *Moniliophthora roreri* Cif & Par, causal agent of *Theobroma cacao* L. moniliasis

Ineficiencia de capsaicina para inhibir *in vitro* a *Moniliophthora roreri* Cif & Par, agente causal de moniliasis de *Theobroma cacao* L.

De la Cruz-Ricardez, Dario¹; Ortiz-García; Carlos F.^{1*}; Lagunes-Espinoza, Luz del C.¹; Torres-De la Cruz, Magdiel²

¹Programa de Producción Agroalimentaria en el Trópico, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n, C.P. 86500, H. Cárdenas, Tabasco, México. ²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas, km. 0.5, C.P. 86039, Villahermosa, Tabasco, México.

*Autor por correspondencia: cfortiz@colpos.mx

ABSTRACT

Objective: To evaluate *in vitro* the fungicidal efficiency of capsaicin to inhibit *Moniliophthora roreri*, causal agent of *Theobroma cacao* L. moniliasis.

Design/methodology/approach: Capsaicin reagent grade dissolved in absolute ethyl alcohol was used to prepare a stock solution of 2000 mg L⁻¹. Dilutions were prepared from this solution to obtain concentrations of 250, 500, 750 and 1000 mg L⁻¹. The efficacy on the inhibition of mycelial growth, sporulation and viability of conidia of *M. roreri* was evaluated with the plate dilution method. A completely randomized design (DCA) was established. The efficiency percentages were obtained by Abbott's formula (1925).

Results: The efficiency of capsaicin to inhibit mycelial growth of *M. roreri* was less than 15%. Likewise, it was inefficient in the inhibition of sporulation and spore viability (percentage of germination less than 5%). The efficiency of capsaicin in the inhibition of the mycelial development and the sporulation of *M. roreri*, is masked by the disinfecting action of the solvent from the concentration of 750 mg L⁻¹.

Limitations of the study/implications: The low efficiency of capsaicin to inhibit *M. roreri* requires the use of higher concentration solutions, always considering the solvent used as a comparative target.

Findings/conclusions: Capsaicin is ineffective in inhibiting the mycelial growth, sporulation and viability of *M. roreri* spores.

Key words: capsaicin, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora roreri*.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar *in vitro* la eficiencia de la capsaicina para inhibir a *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.).

Diseño/metodología/aproximación: Capsaicina grado reactivo disuelta en alcohol etílico absoluto se usó para preparar una solución stock de 2000 mg L⁻¹. A partir de esta solución se prepararon diluciones para obtener concentraciones de 250, 500, 750 y 1000 mg L⁻¹. La eficiencia sobre la inhibición del crecimiento micelial, la esporulación y la viabilidad de conidios de *M. roreri* se evaluó con el método de dilución en placa. Se estableció un diseño completamente al azar (DCA). Los porcentajes de eficiencia se obtuvieron mediante la fórmula de Abbott (1925).

Resultados: La eficiencia de la capsaicina para inhibir el crecimiento micelial de *M. roreri*, fue menor al 15%. De igual manera se mostró ineficiente en la inhibición de la esporulación y la viabilidad de esporas (porcentaje de germinación menor al 5%). La eficiencia de la capsaicina en la inhibición del desarrollo micelial y la esporulación de *M. roreri*, se enmascara por la acción desinfectante del solvente a partir de la concentración de 750 mg L⁻¹.

Limitaciones del estudio/implicaciones: La baja eficiencia de la capsaicina para inhibir *M. roreri* requiere del uso de soluciones de mayor concentración, considerando siempre utilizar como blanco comparativo el solvente utilizado.

Hallazgos/conclusiones: La capsaicina es ineficaz para inhibir el crecimiento micelial, esporulación y viabilidad de esporas de *M. roreri*.

Palabras clave: capsaicina, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora roreri*.

para la membrana; además de inducir un estrés osmótico en las células de los microorganismos (Kurita et al., 2002). Por estas razones, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia fungicida de la capsaicina para inhibir *in vitro* a *M. roreri*, agente causal de la moniliasis de *Theobroma cacao* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento de *M. roreri* (MR) fue obtenido en el Laboratorio de Fito patología del Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco a partir de fruto de *Theobroma cacao* L. de huertas comerciales, preservando la cepa en medio de cultivo V8 sólido.

Para el estudio del efecto de la capsaicina se utilizó capsaicina grado reactivo (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA). Para determinar el efecto de la capsaicina sobre el crecimiento micelial (CM), la esporulación (ES) y la viabilidad de las esporas (VE) producidas por MR, se preparó una solución stock de capsaicina a una concentración de 2000 mg L⁻¹, utilizando alcohol etílico absoluto como solvente (Peña-Alvarez et al., 2012). Posteriormente se realizaron cinco diluciones de capsaicina+solvente (CAP+SOL) para obtener concentraciones de 250, 500, 750 y 1000 mg L⁻¹ (tratamientos), tomando una concentración de 0 mg L⁻¹ como testigo. Las cuatro concentraciones de CAP+SOL se agregaron por separado y esterilizadas al medio de cultivo V8 clarificado, antes de vaciar a las cajas de Petri, utilizando jeringas con filtros de 0.20 µm (Corning®, Germany) a fin de mantener la asepsia del medio. Posteriormente, 10 mL de medio de cultivo con capsaicina, se transfirieron a cajas de Petri de 90 mm mediante jeringa de auto llenado (Socorex® 173, Switzerland).

INTRODUCCIÓN

Moniliophthora roreri es un patógeno hemibiotrófico que produce la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.) considerada como la enfermedad más dañina en Latinoamérica. En México está presente desde el 2005 (Phillips-Mora et al., 2006). Desde entonces es el principal problema fitosanitario de la producción de cacao provocando anualmente pérdidas mayores al 75% de la producción (Torres-De la Cruz et al., 2011). Actualmente la estrategia más recomendada para el control de esta enfermedad, es el manejo integrado (Ortiz-García et al., 2015). Sin embargo, algunos productores, han optado por el abandono de sus plantaciones o el cambio del uso del suelo debido al reducido ingreso económico familiar por unidad de producción. En la búsqueda de alternativas sustentables para el control *M. roreri*, se reportan el uso de extractos vegetales (De la Cruz-Ricardez et al., 2016); esto debido a los contenidos de compuestos naturales como fenoles, carotenoides, alcaloides, etcétera. Tal es el caso de los capsaicinoides presentes en frutos de *Capsicum*. La capsaicina es el principal componente pungente o irritante de los frutos de *Capsicum*, se sintetiza y acumula en las células epiteliales de la placenta (Ben-Chaim et al., 2006). El interés de la capsaicina, más que su uso gastronómico, se debe a las aplicaciones en la medicina (Spiller et al., 2008; Chapa-Oliver y Mejía-Teniente, 2016) y por sus propiedades antioxidantes (Campos-Hernández et al., 2018). Además, múltiples estudios indican sus propiedades bactericidas y fungicidas (Cichewicz y Thorpe, 1996; Jones et al., 1997; Moreno-Limón et al., 2012; Bacon et al., 2017). Esto debido a que la capsaicina ingresa a las células y funciona como una sustancia tóxica

Debido al uso de etanol en las diluciones de capsaicina, se evaluó el efecto directo del solvente (SOL) sobre MR empleando el mismo volumen de etanol usado para las diluciones de la capsaicina: 1.25, 2.5, 3.75 y 5 mL de etanol para 250, 500, 750 y 1000 mg L⁻¹ respectivamente. El SOL se adicionó al medio de cultivo V8 clarificado siguiendo el método descrito anteriormente para la capsaicina y se evaluaron las mismas variables.

Para la efectividad de capsaicina sobre el crecimiento micelial (CM) sobre *M. rorei*, a partir de cultivos de MR de 15 días de edad, se extrajeron fragmentos de 5 mm de diámetro, los cuales se depositaron en el centro de cajas de Petri que contenían medio V8 clarificado y las concentraciones CAP + SOL y solvente SOL. Posteriormente se incubaron a 25 °C en oscuridad. El CM se registró cada 24 h en dos ejes ortogonales y concluyó cuando las colonias del tratamiento testigo llenaron completamente la caja. La medición del crecimiento radial se realizó con un vernier manual marca Pretul®. Posteriormente se calculó el área de CM total y se determinó el porcentaje del área de inhibición del CM, por cada tratamiento.

Para la efectividad de capsaicina sobre la esporulación (ES) de *M. rorei*, se recolectaron de las cajas con medio donde se evaluó el efecto de la capsaicina sobre el CM, esporas para determinar el efecto de la capsaicina sobre la ES. Para ello, se agregaron a las cajas Petri, 5 mL de la solución de agua destilada estéril + Tween 80 (0.1%), se realizó un raspado de esporas con espátula de acero inoxidable estéril y se recuperó el sobrenadante. La suspensión de conidios se homogenizó durante 10 min utilizando un agitador magnético (Thermolyne®, Artur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, EUA) y se filtró con gasa clínica para separar el micelio. El conteo de conidios se realizó en cámara de Neubauer (Hausser Scientific, USA) y el número total se estimó mediante la fórmula de Lipa y Slizynski (1973):

$$C = (C_c)(4 \times 10^6)(F_d / 80)$$

donde: C=Número de esporas mL⁻¹, C_c=Número promedio de esporas contadas en la cámara de Neubauer y F_d=Factor de dilución.

Efectividad de extractos sobre la viabilidad de esporas de *M. rorei*

A partir de las esporas producidas en presencia de la CAP

+ SOL, se obtuvo una suspensión de 5×10⁶ esporas mL⁻¹, de la cual se depositaron 30 μL en cuatro zonas de la caja de Petri con medio V8 clarificado. La alícuota de esporas se cubrió con cubreobjetos estériles y las cajas con medio V8 + inóculo se incubaron a 25±0.5 °C en oscuridad. El porcentaje de germinación se determinó mediante la observación de 100 esporas por tratamiento y repetición, cada 24 h y concluyeron cuando el testigo obtuvo el 90 % de germinación (120 h).

Diseño experimental y análisis de datos

Cada bioensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar (DCA), con cinco repeticiones por tratamiento (cada una de las concentraciones de capsaicina), empleando como unidad experimental una caja de Petri. La efectividad de la capsaicina sobre el CM, ES y VE se calculó mediante la fórmula de Abbot (1925):

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100$$

donde: E=Eficiencia, V_t=Valor de la variable en el testigo, E_m=Valor de la variable en el tratamiento con los extractos metanólicos. Posteriormente, los datos se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción y se sometieron a un ANOVA y separación de medias (Tukey, 0.05) utilizando el programa InfoStat versión 2017.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectividad de capsaicina sobre el crecimiento micelial, esporulación y viabilidad de esporas de *M. rorei*

La Figura 1, muestra los efectos de cuatro concentraciones de capsaicina sobre MR. Inicialmente se destaca que el crecimiento de las colonias del tratamiento testigo se desarrolló con forma, tamaño y textura normal, de color crema, con centro de color de café claro a salmón, tal como lo describe Evans (1981) en cultivo *in vitro*, lo que muestra que las condiciones de experimentación fueron las adecuadas para el estudio, y se observaron efectos diferenciados por concentración. Con la concentración de 1000 mg L⁻¹ de CAP + SOL y los 5 mL de SOL el CM de MR fue inhibido completamente; mientras que con la concentración de 750 mg L⁻¹ la colonia de MR creció lentamente alrededor del disco de micelio sembrado, con micelio poco denso y una apariencia clara; con la concentración de 250 mg L⁻¹ la colonia mostró textura y color de micelio similar a la colonia testigo.

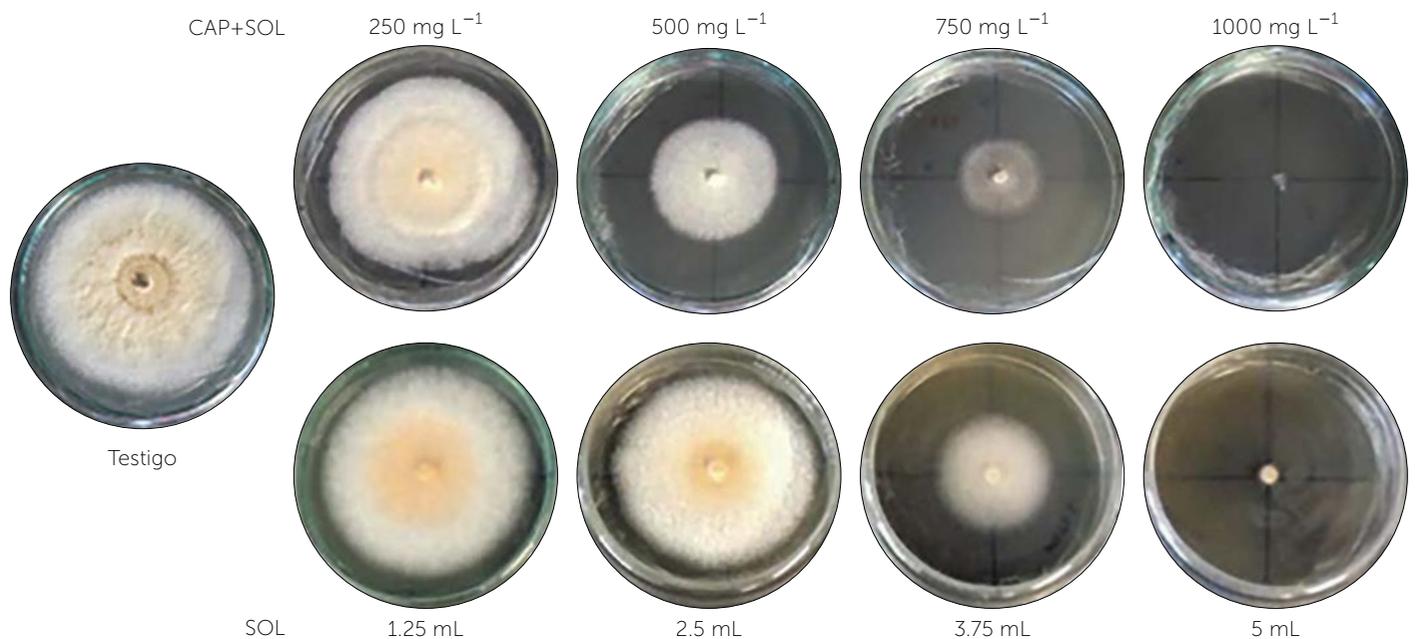


Figura 1. Aspectos de crecimiento micelial y esporulación de *Moniliophthora roreri* en diferentes concentraciones de capsaicina + solvente (CAP+SOL) y el solvente (SOL) probadas en medio V8 clarificado.

Una vez restado el efecto del SOL correspondiente de cada concentración, el ANOVA y pruebas de separación de medias mostraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la efectividad de la capsaicina sobre el CM de *M. roreri* (Figura 2A). La concentración de 500 mg L⁻¹ de capsaicina presentó la mayor eficiencia con 14.18% de eficiencia, seguido de 750 mg L⁻¹ con 8.16% de eficiencia y 250 mg L⁻¹ con 4.27% de eficiencia. Lo que muestra que la capsaicina presenta baja efectividad sobre el CM, del orden del 14 % en las cuatro concentraciones evaluadas. Es importante señalar que cuando la concentración supera los 500 mg L⁻¹ la efectividad no se expresa de forma directa, debido a la interferencia del efecto antimicrobiano del etanol que inicia a cubrir la respuesta de ésta, como se mostró en las concentraciones de 750 y 1000 mg L⁻¹ de capsaicina.

Con respecto a la esporulación (ES), no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en la eficiencia de ambas concentraciones de capsaicina sobre la ES de *M. roreri*. Con las concentraciones de 250 y 500 mg L⁻¹ la eficiencia fue de 4.79 y 4.68% respectivamente (Figura 2B). Lo anterior indica que la eficiencia de la capsaicina en la reducción de la ES fue baja, por lo que el efecto observado (>85%) es atribuible al solvente.

Para la evaluación de la viabilidad de esporas (VE), se evaluaron las esporas provenientes de las concentraciones con capsaicina de 250 y 500 mg L⁻¹. Los porcentajes de

eficiencia de la capsaicina sobre la VE producidas por *M. roreri* se muestran en la Figura 2C, y únicamente con la concentración de 250 mg L⁻¹, se obtuvo una eficiencia de 5.64%. Lo anterior indica que la eficiencia de la capsaicina para inhibir la VE es muy baja (<5%) y que los tratamientos con capsaicina no inhiben la germinación de esporas de *M. roreri*.

La capsaicina, es el principal capsaicinoide presente en frutos de *Capsicum* (Ben-Chaim *et al.*, 2006), es considerada como antimicrobiana, debido a que ingresa a las células y funciona como una sustancia tóxica generando estrés osmótico (Kurita *et al.*, 2002). Se han reportado algunos trabajos de la evaluación del efecto de la capsaicina sobre microorganismos; por ejemplo, Moreno-Limón *et al.* (2012) encontraron que la capsaicina diluida en alcohol etílico a concentración de 200 y 1000 mg L⁻¹ mostró un halo de inhibición de 11 y 4.67 mm respectivamente en el crecimiento de *Aspergillus flavus*; sin embargo, extractos de *C. annuum* var. *aviculare* (piquín) mostraron mayor efecto que la capsaicina en el mismo estudio. Lo que concuerda con nuestros resultados de que la capsaicina tiene poco efecto sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos, en este caso sobre *M. roreri*. Igualmente, al evaluar extractos metanólicos de cuatro especies de *Capsicum*, se encontró que *C. annuum* var. *glabriusculum* tiene mayor efecto de inhibición sobre *M. roreri* que *C. chinense*, quien presentó mayor contenido de capsaicina (De la Cruz-Ricardez, 2018).

Fue evidente el efecto directo del solvente observado sobre *M. royeri*. El uso de alcohol etílico es reportado en la literatura como desinfectante en materiales del área médica y de laboratorios (Kieff y Fink, 2011; Chang et al., 2012) y también su efecto directo sobre hongos que descomponen los alimentos (Dao y Dantigny, 2011). Esto se debe a la rápida acción que tiene el etanol sobre los microorganismos, la cual consiste en destruir la membrana celular y desnaturalizar las proteínas (Chandler et al., 2004). Su acción es rápida (15 s), y sus efectos biológicos de daño microbiano permanecen por varias horas, incluso días (Rodakiewicz-Nowak et al., 1999). Paschos et al. (2015), evaluaron el efecto del etanol sobre la actividad metabólica de *Fusarium oxysporum*, encontrando que tanto la producción de biomasa y el crecimiento se vieron afectados por la presencia mínima de etanol (1%). Asimismo, Sequeira et al. (2017) observaron efecto antifúngico sobre el crecimiento de *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum* y *P. corylophilum* con soluciones etánolicas de 30 y 70%. Ponzó et al. (2018) indicaron que el etanol al 30, 40 y 50% inhibe completamente el crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* spp. Lo anterior concuerda con nuestros resultados al observar efectos del alcohol etílico sobre *M. royeri*. Aunque, las concentraciones usadas en este estudio fueron muy bajas; el volumen más alto de alcohol etílico que se usó en las diluciones fue de 5 mL que equivale al 5%, mostrando efecto fungicida; sin embargo, las concentraciones de 3.75, 2.50 y 1.25%, muestran efecto fungistático. Mlikota et al. (2004), reportaron que etanol al 30% inhibe totalmente la germinación de esporas de *B. cinérea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *A. niger*, mientras que con 10% de etanol no hay inhibición de la germinación en ninguno de los hongos. Esto concuerda con los resultados al no tener inhibición en la germinación de esporas de *M. royeri* con etanol al 1.25, 2.50 y 3.75%.

CONCLUSIONES

La capsaicina, muestra bajo efecto *in vitro* sobre el crecimiento micelial (<15%) de *M. royeri* y efectos aun menores sobre la esporulación y la viabilidad de esporas (<5%). El efecto de la capsaicina sobre el crecimiento micelial y esporulación de *M. royeri*, se enmascara por la acción del solvente a partir de 750 mg L⁻¹.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca al primer autor para la realización de sus estudios de posgrado.

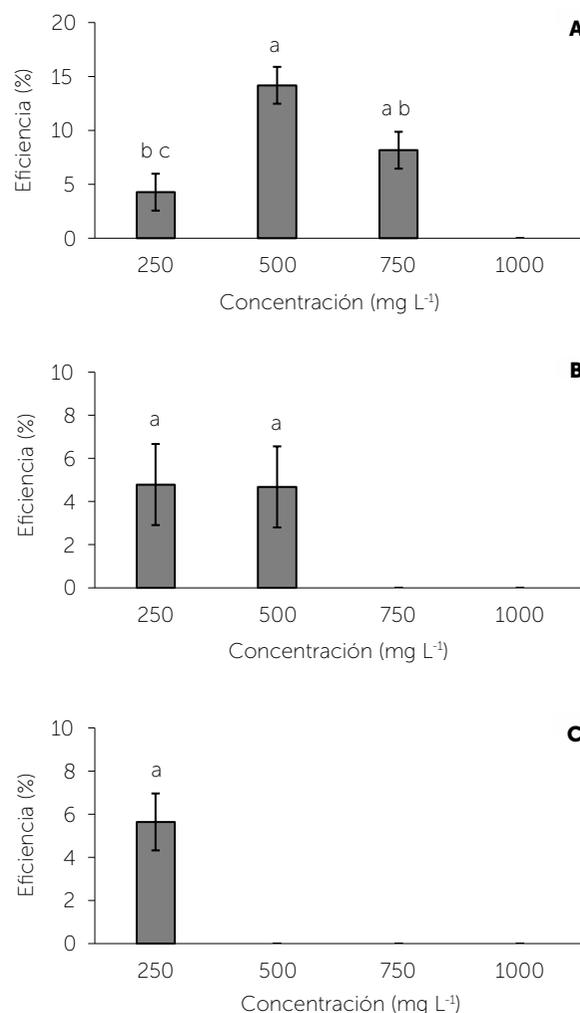


Figura 2. Eficiencia de cuatro concentraciones de capsaicina sobre *M. royeri*. A) Crecimiento micelial, B) Esporulación, C) Viabilidad de esporas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 256-267.
- Bacon, K., Boyer R., Denbow C., O'Keefe S., Neilson A., y Williams R. (2017). Antibacterial activity of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) extract fractions against select foodborne pathogens. *Food Science and Nutrition* 5: 730-738.
- Ben-Chaim, A., Borovsky Y., Falise M., Mazourek M., Kang B.C., Paran I., y Jahn M. (2006). QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1481-1490.
- Campos-Hernández, N., Jaramillo-Flores M.E., Téllez-Medina D.I., y Alamilla-Beltrán L. (2018). Effect of traditional dehydration processing of pepper jalapeno rayado (*Capsicum annuum*) on secondary metabolites with antioxidant activity. *CyTA-J. Food* 16: 316-324.
- Chandler, M., Stanley G.A., Rogers P., y Chambers P. (2004). A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology* 54: 427-454.
- Chang, D.A., Florea M., y Seiberling K.A. (2012). Desinfección de laringoscopios de fibra óptica flexibles después de la

- contaminación *in vitro* con *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 138: 11921.
- Chapa-Oliver, A. M., y Mejia-Teniente L. (2016). Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules* 21: 931-945.
- Cichewicz, R. H., y Thorpe P.A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 61-70.
- Dao, T., y Dantigny P. (2011). Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control* 22: 360-368.
- De la Cruz-Ricardez, D., Lagunes-Espinoza L.C., Ortiz-García C.F., y Pablo-Pérez M. (2016). Actividad antifúngica *in vitro* del extracto acuoso y alcaloideo de *Lupinus* spp. en *M. roleri*. *Agroproductividad* 9: 3-9.
- De la Cruz-Ricardez, D. (2018). Efecto *in vitro* del extracto metanólico de especies de *Capsicum* sobre *Moniliophthora roleri* y su caracterización química. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco.
- Evans, H. C. (1981). Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (Monilia) *roreri*. *Phytopathological Papers* 24: 44.
- Jones, N.L., Shabib S. y Sherman P.M. (1997). Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters* 146: 223-227.
- Kieff, D., y Fink D. (2011). Decontamination of nasal atomizer tips: alcohol versus guards. *Otolaryngology - Head and Neck Surg* 145: 411-413.
- Kurita, S., Kitagawa E., Chang-Hwa K., Momose Y., y Iwahashi H. (2002). Studies on the Antimicrobial Mechanisms of Capsaicin Using Yeast DNA Microarray. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66: 532-536.
- Lipa, J.J., and Slizynsky K. (1973). Wskazówki metodyczne I terminologia dowyznaczenia snedniej dawki swiertelnej (LD50) w patologii owadow i toksykologii [Methodological instructions and terminology for determination of average lethal dose (LD50) in insect pathology and toxicology]. *Prace Nauk. Inst. Ochr. Roślin* 15: 59-83. (in Polish).
- Mlikota, G.M.F., Mansour M.F., Smilanick J.L., y Mackey B. E. (2004). Survival of spores of *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 96: 1354-1360.
- Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez S.M., Cárdenas-Ávila M.L, Hernández-Piñero J.L., y Núñez-González M. A. (2012). Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica* 34: 171-184.
- 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 roleri*, en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38: 191-196.
- Paschos, T., Xiros C., y Christakopoulos P. (2015). Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *BMC Biotechnology* 15:1-12.
- Peña-Alvarez, A., Alvarado L.A., and Vera-Avila L.E. (2012). Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in hot peppers by ultrasound assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Instrumentation Science and Technology* 40: 429-440.
- Phillips-Mora, W., Coutiño A., Ortiz C. F., Lopez A.P., Hernandez J., y Aime M.C. (2006). First report of *Moniliophthora roleri* causing frosty pod rot (monilliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55: 584
- Ponzo, S. F., Aparecida B. E., Pereira da Silva B. M., y Cia P. (2018). Ethanol on the postharvest control of anthracnose in 'Kumagai' guava. *postharvest technology* 77: 160-167.
- Rodakiewicz-Nowak, Haber J., Pozdnyakova N., Leontievsky A., y Golovleva L. A. (1999). Effect of Ethanol on Enzymatic Activity of Fungal Laccases. *Bioscience Reports* 19: 589-600.
- Sequeira O. S., Phillips A.J.L., y Macedo M.F. (2017). Ethanol as an antifungal treatment for paper: short-term and long-term effects. *Studies in Conservation* 62: 33-42.
- Spiller, F., Alves M.K., Vieira S.M., Carvalho T.A., Leite C.E., Lunardelli A., Poloni J.A., Cunha F.Q., y de Oliveira J.R. (2008). Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60: 473-478.
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García C.F., Téliz-Ortiz D., Mora-Aguilera A., y Nava-Díaz C. (2011). Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora roleri*) of cocoa in Tabasco, Mexico. *Journal of Plant Pathology* 93: 31-36.