

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología



Trabajo de Diploma

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Stemphyllium solani* Webber



Autor: Claudia Linares Rivero

Tutor: MSc. Katia Ojito Ramos

Lic. Dianella Iglesias Rodríguez

Santa Clara

2014

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



Trabajo de Diploma

**Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de
Citrus spp. frente a *Stemphyllium solani* Webber**

Autor: Claudia Linares Rivero

Tutor: MSc. Katia Ojito Ramos

Lic. Dianella Iglesias Rodríguez

Santa Clara

2014

Todos somos científicos cuando somos niños, pero al crecer, solo algunos conservan un poco de esa curiosidad, que es la madre de la ciencia.

Juan Aguilar M.

A mis padres y mi tía...

Agradecimientos

Mi eterno amor y agradecimiento a mis padres, que sin importar los defectos de mi carácter han sabido demostrarme lo importante que soy en sus vidas.

A mis tutoras Katia y Dianella, el tiempo que hemos trabajado juntas ha estado lleno de enseñanzas que permitieron mi crecimiento como persona y sobre todo como futura profesional. Gracias por ser mis amigas, compañeras de trabajo y maestras.

A Ernesto por ser mi apoyo incondicional en todo momento y permitirme estar a su lado ya hace casi cinco años.

A toda mi familia: mis abuelas, mi hermana, mi tía, mi tío, mis primas, mi primo y especialmente a Idania y Papito que realmente tienen un lugar importante en mi corazón.

A mis compañeros del aula por estar presentes en cada momento en que los necesité; de forma muy especial a las chicas del cuarto, porque son realmente mis amigas y la convivencia me ha enseñado que una persona pese a los defectos que pueda tener, cuando existe comprensión, respeto y confianza puede convertirse en un hermano.

A los profesores de la carrera y demás personas que de una forma u otra han apoyado mi preparación personal y la realización de este trabajo.

Resumen

Lycopersicon esculentum Mill. es una hortaliza con elevada aceptación dentro de la población mundial, la cual es afectada por *Stemphyllium solani* Webber, causante de la mancha gris. El control de esta enfermedad se basa en la aplicación preventiva de fungicidas químicos, por lo cual se hace necesaria la búsqueda de controles agroecológicos más saludables, como el uso de extractos vegetales. Estos extractos con frecuencia son obtenidos del género *Citrus* por ser este una abundante fuente de compuestos fenólicos con actividad antifúngica demostrada. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de cinco especies de cítricos frente a *S. solani*. Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido. Se determinaron las condiciones de extracción asistida por ultrasonido de fenoles totales en cuanto a tiempo de ultrasonido y rotoevaporación. Para cada extracto se estableció la concentración mínima inhibitoria, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios, además de la fracción química que inhibía el desarrollo del hongo. Se determinaron como condiciones de extracción de fenoles totales: tiempo de extracción 20min sin rotoevaporar. En todos los extractos, se obtuvieron concentraciones de fenoles totales superiores a los 36,17mg EAG/mL de extracto. El extracto de *C. aurantium* var. *sinensis* L. M. Hiroe en etanol mostró la menor concentración mínima inhibitoria frente a *S. solani* (0,04mg EAG/mL). Los extractos evaluados, excepto el de *C. aurantium* L. en etanol, mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *S. solani* de 100%. Todos los extractos excepto el de *C. aurantiifolia* Christm. Swingle en metanol, se consideraron promisorio en la inhibición de la germinación de conidios siendo los extractos de *C. reticulata* Blanco en metanol y *C. aurantium* en metanol los que mostraron mayores porcentajes de inhibición (100%). Las antraquinonas fueron los compuestos con mayor actividad antifúngica en los extractos. El presente estudio demostró la potencialidad del uso de extractos de hojas de *Citrus* spp. para el control agroecológico de *S. solani*.

Palabras claves: cítricos, fenoles, mancha gris, tomate.

Abstract

Lycopersicon esculentum Mill is a vegetable very popular in the world population, which is affected by *Stemphyllium solani* Webber, the cause of the gray leaf spot. The Control of this disease is based on the preventive application of chemical fungicides, that's why it is necessary to find healthier agroecological controls, as the use of plant extracts. These extracts are often obtained from *Citrus*, a rich source of phenolic compounds with demonstrated antifungal activity. The aim of this study was to determinate the *in vitro* antifungal activity of extracts from leaves of five *citrus* species against *S. solani*. The extracts were obtained by ultrasonic assisted extraction. The conditions of extraction assisted by total phenol's ultrasound were determined, as regards time of ultrasound and rotoevaporation. For each extract the minimum inhibitory concentration was established, the percentage of inhibition of the mycelial growth and the percentage of inhibition of germination of conidia were determined, and also the chemical fraction that inhibited the growth of the fungus. As condition of extraction of total phenols was determined the extraction time of 20min without rotoevaporate. In all extracts, higher concentrations of total phenols to 36,17mgEAG/mL of extract were obtained. The extract of *C. aurantium* var. *sinensis* L. M. Hiroe in ethanol showed the lowest minimum inhibitory concentration against *S. solani* (0,04mg EAG/mL). The tested extracts, except *C. aurantium* L. in ethanol, showed percentages of inhibition of mycelial growth of *S. solani* of 100%. All the extracts, except *C. aurantiifolia* Christm. Swingle in methanol, were considered as promising in the inhibition of conidials, being the extracts of *C. reticulata* Blanco in methanol and *C. aurantium* in methanol, the extracts with higher percentages of inhibition (100%). The anthraquinones were the compounds with the highest antifungal activity in the extracts. This study demonstrated the potential of using leaf extracts of *Citrus* spp. for the agroecological control of *S. solani*.

Keywords: *citrus*, gray leaf spot, phenols, tomato.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 Importancia económica del cultivo del tomate.....	3
2.1.2. Agente causal de la mancha gris del tomate.....	4
Ciclo de vida.....	5
Modo de infección.....	6
Afectaciones económicas que causa la enfermedad.....	6
2.1.3. Control de la mancha gris del tomate.....	7
2.2. Uso de extractos vegetales en el control de Enfermedades del tomate.....	9
2.3. Extractos de cítricos como fuente de compuestos antifúngicos.....	14
2.4. Técnicas empleadas para la determinación de la actividad antifúngica.....	16
Difusión en agar.....	16
Dilución en agar.....	16
Microdilución en agar.....	17
Bioautografía.....	17
Sistemas automatizados.....	17
Fotometría.....	18
Turbidimetría.....	18
Colorimetría	18
3. Materiales y Métodos	20
3.1. Determinación de las condiciones de extracción asistida por ultrasonido de fenoles totales a partir de extractos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	20
3.1.1. Cuantificación del contenido de fenoles totales.....	20
3.2. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	21
3.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. frente a <i>S. solani</i>	21
3.2.2. Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>S. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	22
3.2.3. Cálculo del porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de <i>S. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.	22
3.2.4. Identificación de la fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. que inhibe el crecimiento de <i>S. solani</i>	23
3.2.5. Procesamiento estadístico.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Condiciones de extracción asistida por ultrasonido de fenoles totales a partir de extractos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	25
4.1.1. Contenido de fenoles totales.....	27
4.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.	28
4.2.1. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. frente a <i>S. solani</i>	28
4.2.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>S. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	29

4.2.3. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de <i>S. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	30
4.2.4. Fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. que inhibe el crecimiento de <i>S. solani</i>	31
5. Discusión.....	34
5.1. Condiciones de extracción de fenoles totales asistida por ultrasonido a partir de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.	34
5.2. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.	36
5.2.1. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. frente a <i>S. solani</i>	36
5.2.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>S. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	37
5.2.3. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de <i>S. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	39
5.2.4. Fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. que inhibe el crecimiento de <i>S. solani</i>	40
6. Conclusiones.....	44
7. Recomendaciones.....	45
Bibliografía	
Anexos	

1. Introducción

El tomate es uno de los vegetales más difundidos y extensamente cultivados en el mundo (Asgedom *et al.*, 2011). Esta hortaliza ocupa un lugar preferencial en la dieta de un gran número de personas, debido a sus cualidades gustativas y su aporte nutricional basado en un alto contenido de minerales y vitaminas (Torres y Guinand, 2013). Razón por la cual es elevada su producción y comercialización tanto en estado fresco como conservado (Iannacone y Murrugarra, 2002).

En Cuba, el tomate consta de gran importancia para la industria de conservas (Robles *et al.*, 2011) y con el objetivo de extender su calendario de cosecha, se practica el modo de cultivo protegido. En estas instalaciones tienen lugar condiciones climáticas y agronómicas que resultan muy favorables para el desarrollo de enfermedades provocadas por hongos (Vázquez *et al.*, 2005), entre las cuales la mancha gris o quema foliar causada por *Stemphyllium solani* Weber, provoca notables afectaciones en la producción y comercialización de este vegetal (Cedeño *et al.*, 2011).

El control fitosanitario de esta enfermedad se realiza principalmente mediante el empleo, de forma preventiva, de fungicidas sintéticos como Daconil, Zineb, Manzate, Mancozeb, Captan y Oxicob mix (Mehta *et al.*, 2002). Estos químicos incrementan los costos de producción y causan perjuicios al ambiente y el hombre (Safaie *et al.*, 2012), por lo que resulta necesaria la búsqueda de alternativas menos costosas y más saludables, pero efectivas, para el manejo de esta enfermedad. Los extractos vegetales constituyen una fuente abundante de productos químicos naturales con actividad antifúngica demostrada (Centurión *et al.*, 2013), son biodegradables y de menor costo económico (Kumar, 2012). Por esta razón, pueden desempeñar un papel fundamental en un sistema ecológico integrado para el control de esta enfermedad (Haouala *et al.*, 2008).

Las especies pertenecientes al género *Citrus* L. constituyen una abundante fuente de metabolitos secundarios (Vasudeva y Sharma, 2012). Entre los cuales se destacan compuestos como alcaloides (Okwu *et al.*, 2007) saponinas (Ashok kumar *et al.*, 2011), flavonoides (Johan *et al.*, 2007) y taninos (Arenas *et al.*, 2009) que le confieren actividad antioxidante (Joji *et al.*, 2012), antiviral (Kostova, 2005), antibacteriana (Javed *et al.*, 2012) y antifúngica (Minz *et al.*, 2012).

En la mayor parte de los estudios que emplean extractos obtenidos de *Citrus* spp., se han utilizado los frutos de estas plantas, siendo poco empleadas las hojas con este propósito. Sin embargo, en el departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, se han realizado estudios que emplean extractos obtenidos de hojas de *Citrus aurantium* L., *Citrus aurantium* L. subf. *sinensis* L. M. Hiroe, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantiifolia* Christm. Swingle y *Citrus latifolia* Tanaka ex Yu. Tanaka, en los cuales se han cuantificado un elevado contenido de metabolitos bioactivos (Herrera, 2011) con actividad antifúngica *in vitro* frente a los patógenos de tomate *Passalora fulva* Cook. y *Alternaria solani* Sor (González, 2013), así como estudios *in vivo* frente a *P. fulva* (Ramirez, 2013). Si se tienen en cuenta los resultados de los estudios citados con anterioridad, sería útil probar el efecto de estos extractos frente a *S. solani*.

Objetivo general

- ✚ Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Stemphylium solani*.

Objetivos específicos

1. Determinar las condiciones de extracción asistida por ultrasonido de fenoles totales a partir de hojas de *Citrus aurantium* L., *Citrus aurantium* L. subf. *sinensis* L. m. Hiroe, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle y *Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka), en cuanto a solvente, tiempo de ultrasonido y rotoevaporación.
2. Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *S. solani* por los extractos de hojas de cítricos.
3. Determinar el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *S. solani* por los extractos de hojas de cítricos.
4. Identificar los compuestos químicos del extracto con actividad antifúngica frente a *S. solani*.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Importancia económica del cultivo del tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753)] es una especie dicotiledónea perteneciente a la familia *Solanaceae* (Spooner *et al.*, 2005). Tiene su origen en la zona oeste de América del Sur, en Perú y México, donde se desarrolla de forma silvestre. Su hábitat natural consiste en una estrecha franja costera que se extiende desde el Ecuador (0 latitud) hasta el norte de Chile (30 latitud sur) y entre el Pacífico y los Andes, en altitudes que varían entre 0 y 2 000m (Gómez *et al.*, 2000).

Las cualidades gustativas del tomate y la posibilidad de sus diversos usos en estado fresco o elaborado le brindan una amplia aceptación y preferencia en la alimentación humana, debido a que el consumo de este vegetal constituye una vía sostenible para la eliminación de deficiencias de los micronutrientes (Gómez *et al.*, 2000). Esto es posible por su importante valor nutricional (Saeed *et al.*, 2012) basado en aportes minerales (calcio, hierro, fósforo, sodio) y vitamínicos (ácido ascórbico, tiamina y riboflavina) a nuestra dieta (Sarita, 1993).

El tomate es cultivado en todo el mundo, destacándose China, España, Estados Unidos, Egipto y Turquía como los países con mayores superficies de tierras dedicadas al cultivo (Tapia, 2013), el cual constituye una significativa fuente de ingresos monetarios (Babalola *et al.*, 2010). Para la segunda década del siglo XXI, el tomate representa una especie de creciente importancia económica, el cual constituye el 30% de la producción hortícola, con alrededor de $2,9 \times 10^6$ ha sembradas y 72 744 000 t de frutos cosechados (Agudelo *et al.*, 2011).

En contraste, la producción de tomates a escala industrial mostró una tendencia decreciente a partir del año 2010, pues en el año 2009 se obtuvieron valores de 42×10^6 t y a partir de este se observó una disminución hasta 33×10^6 t en el año 2012. No obstante a estos resultados, para el 2013 la producción ascendió un 5% con respecto al año anterior, lo que representó un aumento a 35×10^6 t de tomate (Tapia, 2013).

Aproximadamente el 93,5% del tomate se produce en el hemisferio norte (zona Mediterránea, Estados Unidos [California] y China) y el resto en el hemisferio sur (Brasil, Argentina y Australia) (Macua *et al.*, 2012), donde el continente asiático es el de mayor producción con 47 289 707t cultivadas y el africano el de más baja producción con solamente 12 062 901t (Domingos, 2011). El 31,5% de la producción mundial corresponde a Estados Unidos (California), como mayor productor con una gran estabilidad en el período 2009-2012 (Macua *et al.*, 2012).

En Cuba, el tomate constituye uno de los cultivos de mayor importancia por su extensión, demanda y formas de consumo, siendo de gran interés para la industria de conserva (Pupo, 2008). Se produce en casi todas las regiones y suelos, incluidos algunos afectados por salinidad en las zonas orientales del país (Moya *et al.*, 2005). Su cultivo constituye el 35% del volumen total de la producción de hortalizas, lo que representa 2660,3t y el 30% del área de siembra en Cuba (Guevara *et al.*, 2013); además, consta de un rendimiento promedio de 7t.ha⁻¹, uno de los más bajos de Centro América y del mundo (Toledo *et al.*, 2012). Esto se debe en gran medida al ataque de patógenos oportunistas como *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Sclerotium* spp., y *Rhizoctonia* spp. (Corpeño, 2004), *S. solani*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Guerrero *et al.*, 2007), *A. solani* y *P. fulva* que llegan a afectar notablemente la producción y el período post cosecha (Florido *et al.*, 2008).

2.1.2. Agente causal de la mancha gris del tomate

La mancha gris del tomate provocada por *S. solani* fue descubierta por primera vez en las inmediaciones de Gainesville, Florida (Estados Unidos), en plantas de tomate perteneciente a la variedad Globe, crecidas en un campo abandonado en el verano de 1924 (Weber *et al.*, 1932).

Del género *Stemphylium* se han estudiado 20 especies patógenas para plantas, seres humanos y animales (Camara *et al.*, 2002), la enfermedad que provocan estos hongos afectan a numerosas especies en gran parte del mundo. Entre las especies que causan las mayores afectaciones se encuentra *S. solani*, patógeno de *L. esculentum*, *Gossypium herbaceum* L. (algodón), *Lens culinaris* Medik. (lenteja) y *Allium sativum* L. (ajo) (Ilanovici *et al.*, 2011).

S. solani es de origen monofilético (Camara *et al.*, 2002 e Inderbitzin *et al.*, 2009) y consta de un estado sexual conocido como Pleospora (Camara *et al.*, 2002), pertenece al reino *Fungi*, phylum *Ascomycota*, a la clase *Dothideomycetes*, orden *Pleosporales*, familia *Pleosporaceae* y se encuentra situado en el género *Stemphylium* según Weber (1932). Este hongo presenta hifas oscuras y diversamente ramificadas, septadas e intercelulares, que muestra un crecimiento denso con producción abundante de conidios (Weber *et al.*, 1932), los cuales son multiseptados, siempre solitarios, pigmentados y formados a partir de una célula conidiófora en la punta de las hifas presentes en el micelio (Simmons *et al.*, 1967 e Inderbitzin *et al.*, 2009).

Los conidióforos son oscuros y septados, ligeramente más grandes que las hifas estériles, encontrándose ramificados en cultivos viejos. Los conidios se forman acrógena o pleurógenamente (Mayea *et al.*, 1983), con frecuencia se encuentran

formando de uno a ocho conidios secundarios y ocasionalmente conidios terciarios, los cuales son ligeramente más pequeños que los secundarios; el 60% o más de conidios miden 45-60 x 20-23µm. Estas estructuras son muriformes, de colores opacos a muy oscuros y oblongo-rectangulares. Tienen forma más o menos redondeada en los extremos con varios septos longitudinales y constreñidos cerca del tabique medio (Álvarez y Delgadillo, 2004). También, existen otras características morfológicas en el hongo, como la presencia de tabiques más o menos irregulares, numerosos septos transversales (dependiendo de la edad de los conidios) y la representación de una pared lisa en etapa juvenil pero poco reticulada tras la madurez (Weber *et al.*, 1932).

Ciclo de vida

La infección causada por *S. solani* ocurre a menudo en semilleros o casas de trasplante cuando las plantas aún se encuentran en estado juvenil (Schwartz y Gent, 2007). El desarrollo y la propagación de la enfermedad por lo general mantienen el ritmo de crecimiento de las plántulas en condiciones normales. Si el crecimiento es rápido, la enfermedad es a menudo escasa, mientras que si el desarrollo de las plántulas es inferior al normal, la enfermedad puede destruir las plantas de semillero antes de trasplantar. La planta en su conjunto está propensa a la infección en cualquier momento durante su vida, todas las partes aéreas, excepto el fruto muestran la enfermedad, siendo los tallos y las láminas de la hoja los órganos de más sensibilidad al ataque de *S. solani* (Weber *et al.*, 1932).

Las esporas germinan rápidamente en clima cálido y húmedo a temperaturas templadas (20-30°C) (Agrios, 2005), produciéndose un crecimiento extenso de las hifas sobre la superficie de la hoja durante una sola noche. Estas hifas penetran la epidermis directamente o a través de estomas (Schwartz y Gent., 2007). Dentro del huésped, el hongo se desarrolla intercelularmente en un periodo de 48 a 72h antes de que las células gravemente afectadas muestren indicios de la enfermedad. Después de tres días, la infección se puede distinguir macroscópicamente debido al color pardusco que toman las células muertas presentes en el tejido (Agrios, 2005).

En el hospedante se muestran conidióforos cortos y erectos, los cuales sobresalen de las estructuras estomáticas o atraviesan directamente la epidermis de las células muertas. Pocas horas después se produce la formación de conidios en las puntas de los conidióforos, los cuales se mantienen sujetos hasta ser retirados mecánicamente por algún agente externo. En las hojas infectadas caídas se producen numerosos conidios negros terminales que forman una superficie aterciopelada. En las hojas aun unidas a la planta enferma, los conidióforos son más o menos dispersos (Álvarez y Delgadillo, 2004).

El hongo sobrevive en residuos de cosechas y en el suelo o bien sobre la maleza susceptible. Las esporas del patógeno son dispersadas fácilmente por el viento, pero también pueden propagarse por salpicaduras de lluvia y el agua de riego. El desarrollo de la enfermedad puede verse favorecida además por periodos alternos de humedad y sequedad en las hojas de la planta infectada (Corpeño, 2004). El hongo sobrevive en hospedantes alternativos como gladiolos, malezas, otras solanáceas y sobre cultivos muertos o en descomposición (Schwartz y Gent, 2007).

Modo de infección

Esta enfermedad afecta a las hojas de tomate y primeramente a las hojas más viejas. Los primeros síntomas son motas circulares de color café a negro en las hojas, las cuales se expanden lentamente hasta alcanzar de 2 a 4mm de diámetro extendiéndose a ambos lados. En ocasiones, se desarrolla una mancha gris en el centro de la hoja rodeada de una aureola amarilla, la cual puede secarse y desprenderse dejando un agujero. Las hifas del hongo invaden las hojas causando numerosas lesiones y su senescencia, esta defoliación puede ser severa originando quemaduras solares en el fruto. Ocasionalmente aparecen lesiones similares en tallos jóvenes y pecíolos (Agrios, 2005).

Afectaciones económicas que causa la enfermedad

En Cuba, con el fin de extender los calendarios de cosecha de las hortalizas tradicionales se practica el modo de cultivo protegido, sistema donde tienen lugar condiciones climáticas y agronómicas que resultan muy favorables para el desarrollo de hongos fitopatógenos (Bernal, 2003) como *S. solani* agente causal de la "Mancha gris" o "Quema foliar" (Cedeño *et al.*, 2011). Este patógeno afecta mecánicamente el follaje de la planta y favorece la senescencia de las hojas lo que en consecuencia disminuye el proceso fotosintético. Posteriormente, el desarrollo de los frutos y semillas de este cultivo disminuye, lo que provoca afectaciones irreversibles en la producción y comercialización del mismo y con ello una marcada disminución en el

porcentaje de exportaciones e importaciones tanto de consumo interno como internacional.

2.1.3. Control de la mancha gris del tomate

El control de esta enfermedad se realiza a través de la utilización de varias técnicas preventivas y culturales, cuyo fundamento radica en la utilización de variedades genéticamente resistentes a este hongo, por ejemplo la variedad de tomate Phoenix, Better boy, Tropic y Malucie (Damicome y Brandenrger, 1993 y Mehta *et al.*, 2002), además de la inspección de las plantas para detectar los primeros síntomas. También se ha trabajado en el empleo de fungicidas sintéticos y se han estudiado estrategias de control biológico, basado en el uso de extractos vegetales (Rodríguez *et al.*, 2000 y Khalil *et al.*, 2005).

Control agrotécnico

Para el cultivo exitoso de esta hortaliza se hace necesaria la utilización de camas elevadas con el fin de evitar zonas sombrías y favorecer la ventilación de los trasplantes para propiciar el secado rápido del follaje (Álvarez y Delgadillo, 2004). Es conveniente además, el empleo de sesiones de riego que permitan el secado de los cultivos antes del rocío nocturno, ya que el riego superior por aspersión es más favorable para el desarrollo de la enfermedad que el riego por surco (Gómez *et al.*, 2000). Otras medidas preventivas utilizadas para el manejo de esta enfermedad son la realización de un examen previo de los trasplantes antes de la plantación en campo, la utilización de rotaciones de cultivos con plantas no solanáceas y la eliminación de malezas y residuos de plantas infectadas inmediatamente después de la cosecha (Mayea *et al.*, 1983).

Control químico

El control químico de la enfermedad se realiza mediante la aplicación preventiva de diferentes fungicidas químicos también llamados de contacto, los cuales suelen ser de amplio espectro y actúan solamente sobre la superficie de la planta donde el fungicida ha sido asperjado, por lo que se recomienda cubrir la mayor parte de la planta con este tipo de productos (B. de Faz, 1985). Son capaces de evitar la germinación de los esporangios en las células vegetal. En el caso de *S. solani* se utilizan los siguientes fungicidas de carácter preventivo: Daconil 75% (SYNGENTA CROP PROTECTION S.A) con principio activo clortalonil + carbendazepina, Zineb (SYNGENTA AGRO, S.A)

con principio activo Zinebzetilen-bis-dico-carbamato de Zn, Manzate D-80 (Du Pont Ibérica, S.A.) con principio activo Etilenobisditiocarbamato + Zn + Mn y Manco y Dithane M-45 con Mancozeb como producto activo y complejo (polimérico) de etilenbis (ditiocarbamato) manganeso con sal de cinc, Captan (FMC Corporation, Estados Unidos) con principio activo de N-triclorometilo ciclohexano-4 en 1,2-dicarboximida. Estos antifúngicos deben ser aplicados a intervalos de 7-10 días (Álvarez y Delgadillo, 2004). Otro control químico utilizado por los agricultores frente a la mancha gris del tomate es el antifúngico Oxicob mix (BRAVOAG, S.A. DE C.V.) y como principio activo Oxidloruro de cobre + Mancozeb. Cuya acción altera o interrumpe numerosos procesos bioquímicos de naturaleza enzimática, indispensables para la respiración y transporte de energía en las células del hongo. Afecta la oxidación de los ácidos grasos y de los aminoácidos, e impide la incorporación de oxígeno y la liberación de CO₂ al medio. Además de inhibir la germinación de la espora y el desarrollo del tubo germinativo del hongo (<http://www.bravoag.com.mx>). El antifúngico debe ser aplicado de 2-4 kg.ha⁻¹, con cinco días entre la última aplicación y la cosecha.

Control biológico

Como estrategia de control biológico frente a este patógeno existen investigaciones orientadas al empleo de bacterias antagonistas por sus potencialidades biocontroladoras (Robles, 2011). Entre estas se destaca *P. fluorescens* que produce antibióticos y sideróforos, los cuales son muy activos en el suelo (Bernal *et al.*, 2006) y *Serratia plymuthica* con una alta actividad quitinolítica y propiedades antifúngicas (Kurze *et al.*, 2001). Por otra parte *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp y *Bacillus subtilis*, las cuales son capaces de producir endotoxinas, antibióticos y proteínas con actividad antifúngica (Agrios, 2005); han sido utilizadas también como organismos antagonistas. Otra estrategia de control biológico lo constituye el empleo de extractos vegetales, debido a la ventaja ambiental y económica que representa este método para los agricultores. En este sentido, se utilizaron por primera vez extractos hidroalcohólicos *in vitro* de *Olea europaea* L., frente a *S. solani*, que inhibieron parcialmente el crecimiento fúngico (10,7%) (Al-Mughrabi *et al.*, 2001). Además, se emplearon *in vitro* frente este hongo extractos con butanol y agua de hojas y raíces de *Euphorbia macroclada* Boiss, (Al-Mughrabi, 2003), con los cuales se obtuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de un 47,1% y 43% respectivamente. Así mismo, otras especies como *Acacia farnesiana* Wall. (aroma amarilla), *Parthenium hysterophorus* L. (escoba amarga) y *Pluchea carlinensis* L. (salvia cimarrona) fueron probadas en condiciones *in vitro*, mostrando porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores al 80% (Rodríguez *et al.*, 2000). De modo similar se han probado extractos etanólicos de

Anthemis nobilis L., *Artemisia arborescense* L., *Convolvulus siculus* L., *Salvia triloba* L., *Achillea tominotosa* L. y *Salvia indica* B. Heyne ex Roem. y Schult. (Khalil *et al.*, 2005), obteniéndose con esta última resultados de inhibición superiores al 65%.

Del total de estudios consultados, en ningún caso se determinó la actividad antifúngica de los extractos en condiciones *in vivo*. La escasa existencia de esta clase de investigación, pudiera constituir una de las causas de no contar en el mercado con un fungicida natural que pueda emplearse como una estrategia de manejo integrado para esta enfermedad. Generalmente los resultados de estudios *in vitro* no son extrapolables a las condiciones *in vivo*, debido a la complejidad de interacciones que se establecen en los patosistemas, que influyen en las actividades de los metabolitos y los resultados de la acción final del extracto.

2.2. Uso de extractos vegetales en el control de enfermedades del tomate

El desarrollo de resistencia de organismos patógenos hacia diferentes agroquímicos, ha provocado un aumento significativo de los costos de producción y problemas graves de contaminación ambiental (Díaz *et al.*, 2013). Consecuentemente, algunos investigadores han enfocado su trabajo hacia la búsqueda de técnicas alternativas, surgiendo de esta forma los llamados controles biológicos. Estas formulaciones pueden ser mezclas muy simples de ingredientes naturales con actividades específicas o mezclas complejas con efectos múltiples tanto en el hospedante como en el agente patógeno (Krishna y McSpadden, 2006).

Las plantas son capaces de sintetizar una gran variedad de moléculas orgánicas o metabolitos secundarios, productos naturales que han sido ampliamente estudiados, siendo probada su aplicabilidad como fuente atractiva para el control de organismos patógenos de tomate (Díaz *et al.*, 2013) (Tabla I). Una característica importante de estos extractos naturales es su capacidad de 100% de biodegradabilidad y carácter inocuo (Díaz *et al.*, 2013), además de poseer una mayor especificidad, debido a la presencia de diversas estructuras químicas que intervienen en procesos metabólicos más específicos (Cotoras *et al.*, 2004). Además, presentan un menor impacto ambiental y económico, y poseen un efecto similar o mayor que los antifúngicos sintéticos en el control de plagas (Díaz *et al.*, 2013).

Tabla I. Extractos vegetales empleados en el control de hongos patógenos del tomate

Hongo fitopatógenos	Extractos vegetales	Actividad antifúngica	Referencias
<i>S. solani</i>	Extractos etanólicos de <i>Parthenium hysterophorus</i> L., <i>Acacia farnesiana</i> Wall. y <i>Pluchea carlinensis</i> L.	89% de inhibición del crecimiento micelial	Rodríguez <i>et al.</i> (2000)
	Extractos hidroalcohólicos de <i>Olea europea</i> L.	10,7% de inhibición del crecimiento micelial	Al-Mughrabi (2001)
	Extractos con éter-petróleo, butanol, cloroformo y agua de <i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	24,5% de inhibición del crecimiento micelial	Al-Mughrabi (2003)
	Extractos etanólicos de <i>Salvia indica</i> L.	62% de inhibición del crecimiento micelial	Khalil <i>et al.</i> (2005)
	Aseites esenciales de <i>Plectranthus cylindraceus</i> Hoechst	100% de inhibición del crecimiento micelial	Marwah <i>et al.</i> (2007)
	Aseites esenciales de <i>Cuminum cyminum</i> L. y <i>Pimpinella anisum</i> L.	100% de inhibición del crecimiento micelial	El-Said y Goder (2014)
<i>A. solani</i>	Extractos en agua, etanol, eter-petroleo, ciclo-hexano, acetona y cloroformo de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	7 mm de crecimiento micelial	Subudhi <i>et al.</i> (2008)
	Extracto en etanol de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	100% de inhibición del crecimiento micelial. Reducción de la incidencia del ataque (<i>in vivo</i>)	Hassanein <i>et al.</i> (2008)
	Extractos en acetona, éter, benzeno, etil-acetato, petróleo, etanol y agua de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	100% de inhibición de la germinación de esporas	Mishra <i>et al.</i> (2009)
	Extracto etanólicos de <i>Tagetes erecta</i> L.	74% de inhibición del crecimiento micelial	Pupo <i>et al.</i> , 2009
	Extractos etanólicos y acuosos de <i>Dodonaea viscosa</i> L.	56,9% de inhibición del crecimiento micelial	Aslam <i>et al.</i> (2010)
	Extractos acuosos de hojas de <i>Cannabis sativa</i> L.	53.5% de inhibición del crecimiento micelial	Tapwal <i>et al.</i> (2011)

Tabla I. Extractos vegetales empleados en el control de hongos patógenos del tomate

Hongo fitopatógenos	Extractos vegetales	Actividad antifúngica	Referencias
	Extracto en metanol y agua de <i>Acorus calamus</i> L.	89% de inhibición de la germinación de conidios	Singh <i>et al.</i> (2010)
	Extractos metanólico de <i>Lauris nobilis</i> L.	79% de inhibición del crecimiento micelial	Yanar <i>et al.</i> (2011)
<i>Fusarium oxysporium</i> Schlee.	Extractos etanólicos de <i>Parthenium hysterophorus</i> L.	95% de inhibición del crecimiento micelial	Rodríguez <i>et al.</i> (2000)
	Extractos acuosos de <i>Eugenia caryophyllus</i> L.	83,3% de inhibición del crecimiento micelial	Alkhail <i>et al.</i> (2005)
	Extractos metanólicos de <i>Eugenia aromatica</i> Kuntze	92% Inhibición del crecimiento micelial	Ngurah y Khalimi (2009)
	Extractos acuosos de <i>Trachystemon orientalis</i> L.	100% de inhibición del crecimiento micelial	Onaran y Yilar <i>et al.</i> (2012)
	Aceites esenciales de <i>Allium sativum</i> L.	90%de inhibición del crecimiento micelial	Benkeblia (2004)
	Extracto en etanol de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	70% de inhibición del crecimiento micelial Reducción de la incidencia del ataque <i>in vivo</i>	Hassanein <i>et al.</i> (2008)
	Extracto etanólicos de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	80% de inhibición del crecimiento micelial	Shrivastava <i>et al.</i> (2011)
	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	98% de inhibición del crecimiento micelial	Hadian (2012)
	Extracto metanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L.	100% de inhibición del crecimiento micelial	Al-Rahmah <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhizoctonia solani</i> Khün.	Extractos etanólicos de <i>Salvia indica</i> L.	51,6% de inhibición del crecimiento micelial	Khalil <i>et al.</i> (2005)
	Extractos etanólicos de <i>Allium sativum</i> L.	20 mm de inhibición del crecimiento micelial	Dawar <i>et al.</i> (2008)
	Extractos etanólicos y acuosos de <i>Adhatoda zeylanica</i> Mill.	54.86% de inhibición del crecimiento radial del micelio	Aslam <i>et al.</i> (2010)

Tabla I. Extractos vegetales empleados en el control de hongos patógenos del tomate

Hongo fitopatógenos	Extractos vegetales	Actividad antifúngica	Referencias
	<i>Aceite esencial de Thymus vulgaris</i> L.	91.83% de inhibición del crecimiento micelial	Safaie <i>et al.</i> (2012)
	Extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	96 % de inhibición del crecimiento micelial	Hadian (2012)
	Extracto metanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L.	100% de inhibición del crecimiento micelial	Al-Rahmah <i>et al.</i> (2013)
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	Aceites esenciales de <i>Artemisia annua</i> L.	100% de inhibición de la germinación de conidios	Soylu <i>et al.</i> (2005)
	Extractos acuosos de <i>Carum carvi</i> L.	94,4% de inhibición del crecimiento micelial	Alkhail <i>et al.</i> (2005)
	Aceites esenciales de <i>Ocimum sanctum</i> L.	100% de inhibición del crecimiento micelial	Siripornvisal <i>et al.</i> (2009)
	Aceites esenciales de <i>Pimpinella anisum</i> S. G. Gmel	100% de inhibición del crecimiento micelial	Behdani <i>et al.</i> (2012)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Lib.	Aceites esenciales de <i>Artemisia annua</i> L.	100% de inhibición de la germinación de conidios	Soylu <i>et al.</i> (2005)
	<i>Aceite esencial de Thymus kotschyanus</i> Boiss	91% de inhibición del crecimiento micelial	Safaie <i>et al.</i> (2012)
<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	Extractos en éter-petróleo, butanol, cloroformo y agua de <i>Euphorbia macroclada</i> Boiss	81,3% de inhibición del crecimiento micelial	Al-Mughrabi (2003)
	Aceites esenciales de <i>Artemisia annua</i> L.	100% de inhibición de la germinación conidial y del tubo germinativo	Soylu <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizopus stolonifer</i> Ehrenb	Extractos en éter-petróleo, butanol, cloroformo y agua de <i>Euphorbia macroclada</i> Boiss	56,1% de inhibición del crecimiento micelial	Al-Mughrabi (2003)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.	Extracto de hojas de <i>Flouencia cernua</i>	93,4% de inhibición micelial y de esporulación	Guerrero <i>et al.</i> (2007)
<i>Phytophthora infestans</i> Mont	Aceites esenciales de <i>Artemisia annua</i> L.	100% de inhibición germinación de conidios	Soylu <i>et al.</i> (2005)
<i>Passalora fulva</i> Cooke U. Braun & Crous	Aceites esenciales de <i>Artemisia annua</i> L.	72% de inhibición de la germinación conidial y del tubo germinativo	Pupo <i>et al.</i> (2009)

Tabla I. Extractos vegetales empleados en el control de hongos patógenos del tomate

Hongo fitopatógenos	Extractos vegetales	Actividad antifúngica	Referencias
	Extracto crudo de <i>Allium sativum</i> L.	96% de inhibición de la germinación de conidios	Ting <i>et al.</i> (2011)
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	Extractos fermentados y no fermentados metanólicos y cetónicos de <i>Larrea tridentata</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Coville y <i>Flourensia cernua</i>	100% de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Díaz <i>et al.</i> (2013)
	Extracto crudo de <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	83% de inhibición del crecimiento micelial	Formighieri <i>et al.</i> (2010)
<i>Pythium aphanidermatum</i> Edson	Extracto metanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L.	100% de inhibición del crecimiento micelial	Al-Rahmah <i>et al.</i> (2013)

Los patógenos más estudiados en las investigaciones citadas fueron *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporium* con nueve y once estudios respectivamente. Los resultados pueden deberse a que *Fusarium oxysporium* es considerado mundialmente como uno de los hongos que más afecta el cultivo del tomate y causa pérdidas económicas serias a los productores (Al-Rahmah *et al.*, 2013). Además, produce retraso en el crecimiento de la planta y síntomas de marchitamiento foliar, hasta que ocurre la total desecación del cultivo (Tello y Lacasa, 1988).

En el caso de *Alternaria solani*, este hongo actúa reduciendo el área fotosintética de la planta y en ocasiones extremas puede producir desfoliación total de la misma (Leiva *et al.*, 2006). De igual modo, en la elección frecuente de este patógeno como objeto de estudio pudo influir la facilidad con que se realiza el cultivo y la manipulación *in vitro* de este hongo, lo que constituye una importante ventaja para su estudio (Veitía *et al.*, 2008)

Entre los extractos de plantas más evaluados por los investigadores se encuentran los de *Allium sativum* L.(ajo) y *Azadirachta indica* A. Juss (árbol de neem), los cuales son capaces de inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esporas de los hongos, *A. solani* (Hassanein *et al.*, 2008), *F. oxysporium* (Hadian, 2012), *R. solani* (Dawar *et al.*, 2008), *Phytophthora infestans* (Nwachukwu y Asawalam, 2014), *Passalora fulva* (Ting *et al.*, 2011) y *Sclerotium rolfsii* (Farooq *et al.*, 2010).

La actividad antifúngica del ajo se debe a la presencia de derivados fenólicos y saponinas en su composición fitoquímica (Navarro *et al.*, 2007), además de

compuestos volátiles sulfurados como la alicina, la cual actúa como un inhibidor respiratorio y el ajoeno capaz de destruir la integridad de la pared celular del patógeno (Khallil *et al.*, 2001). Por su parte, el árbol de neem presentan propiedades antifúngicas debido a la presencia en su composición química de constituyentes biológicamente activos como alcaloides, flavonoides, triterpenoides, compuestos fenólicos, carotinoides, esteroides y acetonas, siendo el de mayor actividad el compuesto triterpenoide azadiractina (Hashmat *et al.*, 2012). Este constituyente es capaz de causar la deformación en los micelios y vesículas del hongo, produciendo de esta forma la muerte del organismo debido a una vacuolización celular o shock osmótico (Razzaghi *et al.*, 2005).

Entre los extractos de plantas que mostraron la mayor actividad antifúngica (100% de inhibición del crecimiento micelial) se encuentran los aceites esenciales de *Plectranthus cylindraceus* Hoehst, *Cuminum cyminum* L. y *Pimpinella anisum* L. frente a *S. solani*, atribuido a la existencia en estas plantas de terpenos como el carvacrol y α -terpenoleno (El-Said y Goder, 2014). De forma similar, aceites esenciales de *Artemisia annua* inhibieron completamente el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahliae* debido a la presencia de fitoconstituyentes antifúngicos como alcanfor, cetona, 1,8-cineol, óxido del caryofileno, α -copaeno y canfeno (Soylu *et al.*, 2005). Además, el extracto de *Cinnamomum zeylanicum* frente a *Alternaria solani* a causa de la presencia de fenoles y terpenoides en su composición fitoquímica (Mishra *et al.*, 2009), el de *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua*, frente a *Phytophthora capsici* debido a la abundancia de polifenoles, (Díaz *et al.*, 2013), el de *Thymus vulgaris* frente a *Fusarium oxysporium* y *Pythium aphanidermatum* por la presencia de compuestos fenólicos tales como el timol y el carvacrol (Al-Rahmah *et al.*, 2013) y los extractos de *Trachystemon orientalis* (Onaran y Yilar *et al.*, 2012) que también inhibieron totalmente el crecimiento de *Fusarium oxysporum* a consecuencia de la aparición de estructuras sulfuradas y saponinas en su composición.

2.3. Extractos de cítricos como fuente de compuestos antifúngicos

El género *Citrus* L. perteneciente a la familia *Rutaceae* constituye una abundante fuente de metabolitos secundarios, entre los cuales se destacan los compuestos fenólicos, con actividad antifúngica demostrada (Landeró *et al.*, 2013). Estos compuestos permiten la inhibición de diversas patologías ocasionadas por hongos, ya son sintetizados por la planta como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta al ataque de agentes externos y otras condiciones de estrés

(Ribera, 2007). Muchos de estos metabolitos han sido caracterizados químicamente, y su importancia, tanto en la prevención como control de enfermedades fúngicas y bacterianas, ha sido demostrada (Rodríguez *et al.*, 2000 y Pérez *et al.*, 2013)

En consecuencia, se han realizado estudios de determinación de la actividad antifúngica frente a *F. oxysporum* con extractos de frutos y hojas de *C. sinensis*, *C. aurantiifolia* y *C. reticulata*, los cuales mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de 83,55%, 71,10% y 68,14% respectivamente. La actividad antifúngica de estos extractos puede deberse a la presencia en hojas y frutos de compuestos fenólicos y alcaloides cuyo modo de acción se basa en el deterioro de diversos sistemas enzimáticos presentes en los hongos, incluyendo aquéllos involucrados en la producción de energía. Además, interfieren en la integridad de las membranas celulares y la síntesis de componentes estructurales de las mismas así como provocando una distorsión de la pared celular. (Okwu *et al.*, 2007).

Similarmente, extractos hidroalcohólicos de hojas de *C. aurantium* L., *C. aurantium* L. subf. *Sinensis*, *C. reticulata* Blanco, *C. aurantiifolia* Christm. Swingle y *C. latifolia* Tanaka ex Yu. Tanaka fueron probados frente a *Passalora fulva* y *Alternaria solani* (Iglesias, 2012). En esta investigación se demostró que todos los extractos anteriormente mencionados mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial y la germinación de conidios superiores al 50%, siendo el extracto de *C. aurantiifolia* el más efectivo frente a *P. fulva* y el de *C. latifolia* el más efectivo frente a *A. solani*. La actividad antifúngica de estos extractos frente a *P. fulva* se debió a la presencia en sus hojas de fitoconstituyentes como las quinonas que constan de una elevada capacidad de formar complejos irreversibles con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de membranas microbiales, lo cual conduce a la inactivación de estas (Domingo y López, 2003). Sin embargo, frente a *A. solani* los compuestos más activos fueron los flavonoles 3-glicosilados y flavonas que deben su actividad antimicrobiana a la capacidad de alterar las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de las membranas microbianas, interfiriendo con su fluidez, además de provocar la fusión de orgánulos citoplasmáticos. Del mismo modo, estos compuestos pueden formar complejos con la pared de las células microbianas y las proteínas solubles en el citoplasma, alterando la función de estas estructuras (Cushnie y Lamb, 2005)

De modo análogo, con el empleo de aceites esenciales de *Citrus reticulata* Blanco se obtuvieron porcentajes de inhibición de la germinación de conidios de 100% frente a *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium oryzae*. Los autores atribuyen este resultado a la presencia en los aceites esenciales del monoterpeno limoneno causante de daños estructurales a la membrana celular de hongo y presente en un 46,7% en los extractos (Chutia *et al.*,

2009). De igual forma, los aceites esenciales de *Citrus aurantiifolia* variedad Bearss, Mexican y Sans épines con altas concentraciones de limoneno inhibieron totalmente el crecimiento micelial de *Phaeoramularia angolensis*. (Dongmo *et al.*, 2009).

También, se han empleado extractos con éter de petróleo y cloroformo a partir de epicarpio *C. latifolia* frente a *Monilia Fructícola* y *Botrytis cinérea* Pers. obteniéndose resultados promisorios a causa de la presencia de componentes como polifenoles, cetonas, aldehídos, triterpenoides (Duarte y Ramírez, 2013) así como extractos de cáscaras de frutos pertenecientes a *C. sinensis*, *C. limón* y *C. reticulata* frente a *Penicillium digitatum*, *Curvularia sp.*, y *Colletotrichum sp.* en los que se probó actividad antifúngica de los compuestos 6,7-dimethoxy-cumarina, tangeritina y nobiletina (Johann *et al.*, 2007).

Sin embargo, en la bibliografía consultada no se encontraron estudios que referencien el empleo de extractos obtenidos a partir del género *Citrus* frente a *S. solani*, lo cual resultaría conveniente debido a las elevadas concentraciones de metabolitos bioactivos presentes en las hojas de estas plantas.

2.4. Técnicas empleadas para la determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica que poseen determinados extractos vegetales ha sido objeto de estudio en numerosas investigaciones, siendo necesario el respaldo de estas por diferentes ensayos experimentales; tales como la difusión, dilución y microdilución en agar, el examen bioautográfico, la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas y sistemas automatizados como la fotometría y turbidimetría. Estas técnicas tienen como propósito la comprobación de la potencia y efectividad de los productos en estudio para asegurar su confiabilidad (Touré *et al.*, 2010).

Difusión en agar

La difusión en agar es una técnica estandarizada por Bauer en 1966 (Hadacek y Greger, 2000). Esta presenta su basamento en la inhibición del crecimiento fúngico mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido, en el que el resultado se evidencia con la formación de halos de inhibición (Huamaní y Ruiz *et al.*, 2005).

Esta técnica es aplicable en la determinación de patrones de susceptibilidad antimicrobiana, además de ser un método sensible y reproducible. Constituye uno de los métodos más utilizados en investigaciones para la evaluación de sustancias puras y tiene como ventaja el uso de una pequeña cantidad de muestra, además de que permite probar varios compuestos frente un mismo microorganismo al mismo tiempo (Chaparro *et al.*, 2010). En contraste, este ensayo resulta de alto costo económico lo cual constituye una desventaja para su utilización (Hadacek y Greger, 2000).

Dilución en agar

El método de dilución en agar fue descrito por Rideal y Walker en 1905 y estandarizado para evaluar el crecimiento micelial de fragmentos fúngicos por Espinel-Ingroff *et al.*, (1995). Esta metodología tiene su basamento en la preparación de placas de Petri con agar, a las cuales se les agrega de forma independiente el compuesto a evaluar a distintas concentraciones (Amadi *et al.*, 2010), luego se inoculan cada una de las placas con una suspensión del microorganismo objeto de estudio (Huamaní *et al.*, 2005).

La técnica de dilución en agar puede ser empleada para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antifúngico frente a un determinado cultivo. Con respecto a la técnica de difusión, permite una definición más exacta de la concentración de los componentes del medio y se muestra una mejor comparación para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Hadacek y Greger, 2000), la cual representa la menor concentración capaz de inhibir visiblemente el crecimiento antimicrobiano,

luego de un periodo de incubación (Touré *et al.*, 2010). No obstante, esta técnica tiene como desventaja que es de mayor complejidad en su proceder y cuenta con una instrumentación más costosa (Rey, 2008).

Microdilución en agar

Este ensayo es una alternativa del método de dilución que fue estandarizado por Wilson *et al.* (1997). La técnica se basa en la aplicación mediante diluciones seriadas de un fungicida en una microplaca de 96 pocillos, la cual es inoculada con el microorganismo en cuestión. Tras el periodo de incubación y empleando una solución reveladora (debido a reacciones de oxidación-reducción) las muestras son evaluadas (Calvo *et al.*, 2011). El análisis rápido de la actividad de los fungicidas y la facilidad para evaluar gran cantidad de diluciones con empleo de poca cantidad de reactivos constituyen ventajas de este método para un adecuado trabajo de laboratorio (Wilson *et al.*, 1997).

Bioautografía

Este método fue descrito por Slusarenko (1998). Su basamento consiste en la corrida cromatográfica en placa delgada (TLC) del producto a evaluar, al que posteriormente se le aplica el microorganismo en cuestión y luego una solución reveladora. Este método a partir de la presencia de coloración en la placa cromatográfica permite determinar zonas de inhibición del crecimiento micelial (Mahlo *et al.*, 2010).

La bioautografía resulta ventajosa pues permite la separación e identificación de componentes antifúngicos activos en la solución, además emplea pequeñas cantidades de muestra para la realización del experimento (Runyoro *et al.*, 2006). En contraste, resulta desventajosa la elevada probabilidad de volatilización de algún compuesto durante el ensayo, ocasionando la pérdida de fitoconstituyentes que pudieran tener actividad antifúngica (Hadacek y Greger, 2000).

Sistemas automatizados

Los sistemas automatizados constituyen un conjunto de técnicas que facilitan el trabajo en el laboratorio, ya que mejoran la sensibilidad analítica de los métodos y son capaces de detectar el desarrollo antifúngico en una suspensión, con y sin antimicrobianos, antes que el laboratorista pueda detectar turbidez. Entre los métodos utilizados en los sistemas automatizados podemos encontrar la colorimetría, turbidimetría, fluorimetría (García, 2002). Estos sistemas favorecen la estandarización y control de la calidad y facilitan la obtención de resultados que pueden ser procesados estadísticamente, lo cual le confiere un elevado grado de robustez a este

método, además de disminuir los errores post-analíticos. Por el contrario, un inconveniente de estas técnicas es el alto costo en insumos (aproximadamente 3 veces el valor de los métodos manuales), lo que dificulta su implementación en países en vías de desarrollo (Trenholme *et al.*, 1989).

Fotometría

Este método fue adaptado para medir actividad antifúngica por Janh *et al.* (1995). El mismo permite la determinación cualitativa de un analito mediante de la dispersión que forma este en el disolvente (Avellaneda, 2013). La aplicabilidad del método fotométrico en la determinación de la actividad antifúngica se realiza mediante la utilización de un indicador óxido-reductor, capaz de formar señales fluorescentes responsables de un cambio metabólico en algún componente del microorganismo analizado (Hadacek y Greger, 2000).

Turbidimetría

La turbidimetría es un método adaptado por Janh *et al.*, (1995) para medir actividad antifúngica. Permite determinar la concentración de partículas en una suspensión, la cual puede ser determinada midiendo la disminución de la energía radiante que incide atravesando una cubeta, similar en forma a un tubo de ensayo o midiendo la radiación dispersada a un ángulo determinado. Este ensayo tiene como desventaja la posible volatilización de los componentes empleados durante el tiempo de lectura, lo que acarrearía pérdidas de fitoconstituyentes con posible actividad antifúngica (Hadacek y Greger, 2000).

Colorimetría

La técnica de colorimetría fue descrita por Kongkathipl (2003). La información obtenida a partir de este ensayo es procesada automáticamente por un equipo y facilita tras la aplicación de una sustancia reveladora la determinación de concentraciones de microorganismos. La colorimetría provee resultados que pueden ser fácilmente comparables, pero a la vez, debido al empleo de indicadores de color, esta técnica presenta costos muy elevados, lo que constituye una desventaja para su utilización (Klančnik *et al.*, 2010).

La evaluación *in vitro* de la actividad biológica de un producto antifúngico es esencial para conocer la sensibilidad del mismo, es por ello que debe seleccionarse el método más efectivo y de mejor aplicabilidad para desarrollar un estudio que brinde los resultados más certeros posibles (Iglesias, 2012). Dentro de los ensayos experimentales mencionados anteriormente, la microdilución en agar constituye el

método más exacto para la determinación de la MIC; mientras que para la determinación de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial es más ventajoso la utilización de la dilución en agar, que resulta más estricto para la obtención de un resultado cuantitativo, que permitirá conocer con exactitud la medida de la inhibición del crecimiento, independientemente de las desventajas que pueda presentar (García, 2002).

3. Materiales y Métodos

3.1. Determinación de las condiciones de extracción asistida por ultrasonido de fenoles totales a partir de extractos de hojas de *Citrus* spp.

Las hojas de *C. aurantium* (naranja agrio), *C. aurantium* subf. *sinensis* (naranja dulce), *C. reticulata* (mandarina), *C. aurantiifolia* (limón criollo) y *Citrus latifolia* (lima persa) fueron colectadas en áreas del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, se realizó la identificación taxonómica de las plantas y posteriormente fue depositada una muestra vegetal de cada especie en el herbario perteneciente a esta institución (O. Méndez No. 9882, 9878, 9884, 9885, 9883 (ULV). El material colectado se lavó con agua destilada y secó en una estufa a 60°C durante 72h, posteriormente se trituró en un molino de cinco pulgadas (Chrisly & Norris, Chelmsford, Reino Unido).

En la determinación de las condiciones de extracción de fenoles totales asistida por ultrasonido se consideraron como variables a evaluar la influencia en la concentración de fenoles totales de cinco tiempos de extracción y el empleo o no de rotoevaporación después de la ultrasonicación.

A 2g del material vegetal se le adicionará 20mL de metanol al 70%, etanol al 70% o agua destilada, según correspondiese. Posteriormente, se sometieron a baño ultrasónico (Branson Ultrasonic Corporation, Estados Unidos) durante 10, 15, 20, 25 o 30min a una temperatura de 27°C. Los extractos se filtraron al vacío (Water Circulating Multi Propose Vacuum Pump SHB-III, Liuyi, China) y finalmente se rotoevaporaron o no en un rotoevaporador (Heidolph, Alemania modelo Borata 4000). Se utilizaron 15 réplicas para cada variable.

3.1.1. Cuantificación del contenido de fenoles totales

Se cuantificó el contenido de fenoles totales de los extractos según el método descrito por Tuberoso *et al.* (2009) con modificaciones. A 1mL del extracto se le adicionaron 80µL de Folin-Ciocalteu 1N y se dejó reposar durante 5min. Seguidamente, se añadieron 800µL de carbonato de sodio 7% y se completó hasta 2mL con agua destilada. La muestra se agitó fuertemente y se dejó reposar durante 90min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China) a una longitud de onda de 750nm, mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón ácido gálico a diferentes concentraciones. El contenido de fenoles totales

de cada extracto se determinó en mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto (EAG/mL), todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Los aislados de *S. solani* fueron suministrados por el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara, Cuba. El microorganismo fue transferido a placa de Petri (9 x 9 cm) con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) durante siete días, a 27°C en oscuridad total.

3.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *S. solani*.

Se determinó la MIC de los extractos hidroalcohólicos de hojas de cítricos según el método de microdilución en agar descrito por Wilson *et al.* (1997), para cada extracto y controles se realizaron por triplicado y el experimento se repitió una vez.

En una microplaca de 96 pocillos, fueron colocados en cada pocillo 100µL de medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). Al primer pocillo de cada fila se le añadió 100µL del extracto a una concentración de fenoles totales de 40mg EAG/mL de extracto, a partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas hasta 0,1565mg/mL empleando 100µL. Posteriormente, se agregaron 100µL de una suspensión de 5×10^5 propágulos/mL de *S. solani*, a cada pocillo.

En este ensayo se utilizó como control de esterilidad el medio de cultivo PDB sin el microorganismo, como control positivo el microorganismo en medio de cultivo PDB con el fungicida Silvacur 0,1% (Bayer Crop Science, Alemania) y como controles negativos, el microorganismo en medio de cultivo PDB puro o con el solvente diluido en agua a la misma proporción de dilución de los extractos. Las placas se incubaron a 27°C durante tres días con 100% de humedad relativa, en oscuridad.

Como indicador del desarrollo del hongo se añadió a cada pocillo 40µL de una solución de p-iodonitrotetrazolio violeta (INT) a 0,2mg/mL. La INT incolora actúa como aceptor de electrones y es reducida apareciendo una coloración roja en presencia de organismos biológicamente activos. Cuando existe inhibición de la actividad biológica de los organismos, la INT se torna incolora o reduce marcadamente su coloración roja inicial. La MIC se definió como la menor concentración del extracto que inhibió el desarrollo del hongo.

3.2.2. Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *S. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Se determinó el efecto de los extractos que mostraron los menores valores de MIC en el crecimiento radial de micelio, según el método de dilución en agar descrito por Guerrero, (2007). Para cada extracto y controles se realizaron tres réplicas y el experimento se repitió una vez.

El PDA con los extractos a una concentración de 20mg EAG/mL de extracto fue vertido en placas de Petri (9 x 9 cm). Después de la solidificación se colocó en el centro de cada placa con un disco de 0,6cm de diámetro de micelio de un cultivo de siete días de *S. solani*. Las placas fueron incubadas por siete días en la oscuridad a una temperatura de 27°C. Luego de las 72h de realizado el experimento, se midió diariamente el diámetro del micelio. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial utilizando la fórmula $[(C-T)/C * 100]$, donde C y T corresponden a la extensión hifal (cm) en los cultivos control y tratados, respectivamente. Se consideraron promisorios los extractos que mostraron valores de inhibición superiores al 50%.

En este ensayo se utilizó como control de esterilidad el medio de cultivo PDA sin el microorganismo, como control positivo el microorganismo en medio de cultivo PDA con el fungicida Silvacur combi 30 EC 0,1% (tebuconazol 22,5% y triadimenol 7,5%) y como controles negativos, el microorganismo en medio de cultivo PDA puro o con el solvente diluido en agua a la misma proporción de dilución de los extractos.

3.2.3. Cálculo del porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de *S. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

La inhibición de la germinación de conidios se determinó mediante la técnica de la gota colgante descrita por Kumaresan *et al.* (2005).

En agua destilada estéril o en los extractos vegetales a una concentración de 20mg EAG/mL de extracto de fenoles totales, se agitó un disco de micelio de 0,6cm de diámetro con el fin de lograr una abundante dispersión de los conidios contenidos en el micelio. A portaobjetos excavados se les aplicó una gota de la suspensión conidial de *S. solani* a una concentración de 5×10^5 conidios/mL. Los portaobjetos fueron colocados en cámaras húmedas e incubadas durante 24h a una temperatura de 27°C. y en oscuridad. Para la determinación del porcentaje de inhibición de la germinación de conidios por los extracto, se evaluaron al microscopio tres campos por cada gota,

contándose al azar 100 conidios y se determinó el número de esporas germinadas (cuando el tubo germinativo fue igual o superior en longitud al conidio). Se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación conidial empleando la fórmula $[(C-T)/C * 100]$, donde C y T corresponden al número de conidios germinados en los cultivos Control y Tratados respectivamente. Se consideraron promisorios los extractos que mostraron valores de inhibición superiores al 50%.

Como control positivo se empleó el fungicida Silvacur combi 30 EC 0,1% (tebuconazol 22.5% y triadimenol 7,5%) y como controles negativos el solvente diluido en agua a la misma proporción de dilución del extracto y agua destilada estéril, además fue utilizado un control de esterilidad. Para cada extracto y controles se realizaron tres réplicas y el experimento se repitió una vez.

3.2.4. Identificación de la fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. que inhibe el crecimiento de *S. solani*

Se determinó según el método bioautográfico descrito por Mahlo *et al.* (2010) con modificaciones. Los cromatogramas obtenidos en condiciones descritas por Iglesias (2012) fueron inoculados con una suspensión de *S. solani* obtenidas en las condiciones escritas en el acápite 3.3.3 a una concentración de 5×10^5 propágulos/mL, obtenidos a partir de un cultivo crecido en PDB durante 72h. Los cromatogramas fueron incubados en cámaras húmedas a 27°C, 100% de humedad relativa y oscuridad durante 24h. Transcurrido ese tiempo fueron asperjados con una solución de p-iodonitrotetrazolio violeta (INT) a 0,2mg/mL e incubados durante 24h en las condiciones descritas anteriormente. La aparición de zonas blancas en los cromatogramas indicó la inhibición del crecimiento fúngico.

Se calculó el valor de R_f de cada zona blanca en el cromatograma, midiendo el desplazamiento relativo de cada mancha, respecto al frente del solvente. Las áreas de inhibición se compararon con los R_f relativos a las manchas en las placas de Cromatografía en Placa Delgada (TLC) de referencias.

3.2.5. Procesamiento estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico PASW *Statistics*, versión 18, verificándose los supuestos de normalidad Sapiro Wilk. Los datos que no seguían distribución normal se procesaron mediante análisis de varianza para dos variables no relacionadas, U de Mann Whitney, y varias muestras independientes, Kruskal Wallis.

En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Condiciones de extracción asistida por ultrasonido de fenoles totales a partir de extractos de hojas de *Citrus* spp.

Se obtuvieron tres clases de extractos, cinco extractos en etanol 70%: *C. aurantium* (*C. aurantium*-et), *C. aurantium* subf. *sinensis* (*C. aurantium* subf *sinensis*-et), *C. reticulata* (*C. reticulata*-et), *C. aurantiifolia* (*C. aurantiifolia*-et) y *C. latifolia* (*C. latifolia*-et), cinco extractos en metanol 70%: *C. aurantium* (*C. aurantium*-met), *C. aurantium* subf. *sinensis* (*C. aurantium* subf *sinensis*-met), *C. reticulata* (*C. reticulata*-met), *C. aurantiifolia* (*C. aurantiifolia*-met) y *C. latifolia* (*C. latifolia*-met) y cinco en agua destilada: *C. aurantium* (*C. aurantium*-ac), *C. aurantium* L. subf. *sinensis* (*C. aurantium* subf *sinensis*-ac), *C. reticulata* (*C. reticulata*-ac), *C. aurantiifolia* (*C. aurantiifolia*-ac) y *C. latifolia* (*C. latifolia*-ac).

El tiempo de extracción asistida por ultrasonido y la rotoevaporación o no de los extractos analizados, tuvieron influencia en la concentración de fenoles totales de los extractos de cítricos (Figura 1 y 2).

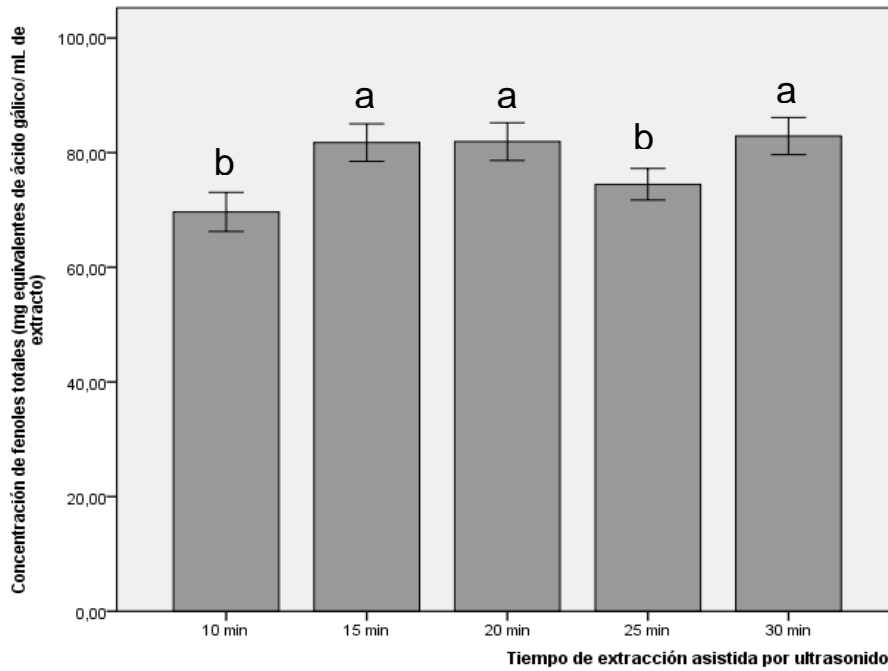


Figura 1. Concentración de fenoles totales en extractos de hojas de *C. aurantium* var. *sinensis*; *C. aurantium*; *C. latifolia*; *C. aurantiifolia*; *C. reticulata* en etanol 70%, metanol 70% y agua a diferentes tiempos de extracción asistida por ultrasonido. Cada barra representa la media de 15 réplicas \pm error típico de la media. (Kruskal Wallis ($p \leq 0,05$) / U de Mann Whitney ($p \leq 0,01$)).

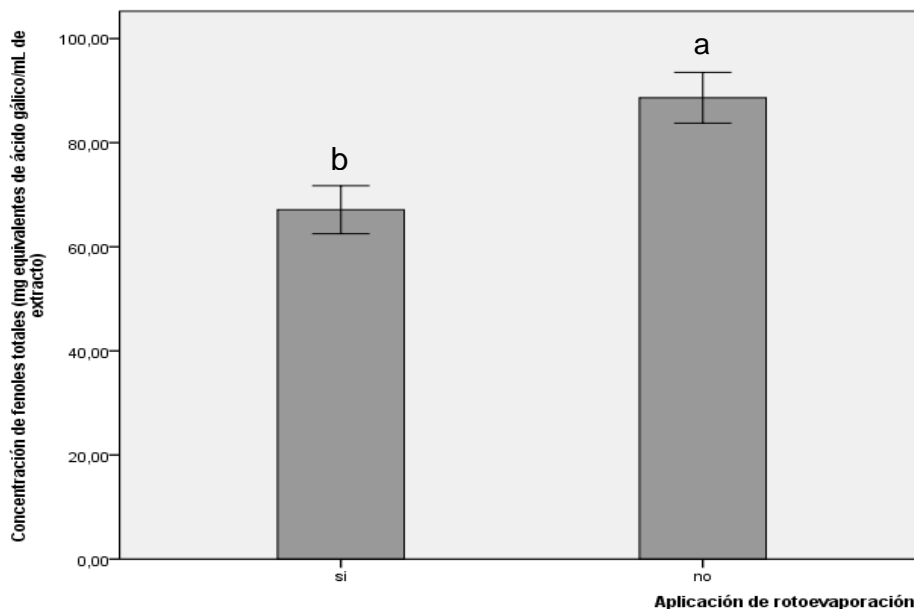


Figura 2. Concentración de fenoles totales de extractos de hojas de *C. aurantium* var. *sinensis*; *C. aurantium*; *C. latifolia*; *C. aurantiifolia*; *C. reticulata* en etanol 70%, metanol 70% (-met) con empleo o no de rotoevaporación. Cada barra representa la media de 15 réplicas \pm error típico de la media. (U de Mann Whitney ($p \leq 0,05$)).

Las mayores concentraciones de fenoles totales se obtuvieron cuando se aplicó el ultrasonido por 20min y no se rotoevaporó.

4.1.1. Contenido de fenoles totales

En todos los extractos se obtuvieron concentraciones de fenoles totales superiores a los 36,17mg EAG/mL de extracto, como se muestra en la tabla II. El extracto que mostró la mayor concentración de fenoles totales fue el de *C. reticulata* en agua, mientras que el *C. aurantiifolia* en etanol mostró la menor concentración.

Tabla II: Concentración de fenoles totales en extractos de hojas de cítricos en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-ac). Letras distintas indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

Extracto	Concentración de fenoles mg EAG/mL ($\bar{X} \pm$ desviación estándar)
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -et	64,68 \pm 1,46 ^e
<i>C. aurantium</i> -et	103,58 \pm 2,76 ^b
<i>C. latifolia</i> -et	66,46 \pm 3,67 ^e
<i>C. aurantiifolia</i> -et	36,17 \pm 1,75 ^g
<i>C. reticulata</i> -et	68,77 \pm 2,44 ^e
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -met	66,07 \pm 1,21 ^e
<i>C. aurantium</i> -met	100,77 \pm 2,64 ^b
<i>C. latifolia</i> -met	68,52 \pm 3,04 ^e
<i>C. aurantiifolia</i> -met	41,20 \pm 1,94 ^f
<i>C. reticulata</i> -met	75,81 \pm 2,02 ^d
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -ac	84,83 \pm 1,66 ^c
<i>C. aurantium</i> -ac	105,35 \pm 4,33 ^b
<i>C. latifolia</i> -ac	85,73 \pm 4,05 ^c
<i>C. aurantiifolia</i> -ac	46,18 \pm 3,09 ^f
<i>C. reticulata</i> -ac	135,10 \pm 4,87 ^a

4.2. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

4.2.1. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *S. solani*

Todos los extractos mostraron actividad antifúngica a concentraciones inferiores a 40mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto (Tabla III). El extracto que mostró la menor MIC fue el de *C. aurantium* var. *sinensis*-et mientras que los de mayor MIC fueron: *C. aurantium* var. *sinensis*-ac, *C. aurantiifolia*-et, *C. reticulata*-ac, además de *C. latifolia* y *C. aurantium* en los tres solventes de extracción.

Tabla III: Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos de cítricos en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met) y agua (-ac) frente a *Stemphyllium solani*.

Extracto/ control positivo	MIC (mg EAG/mL)
Silvacur	< 0,04
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -et	0,039
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -met	0,04
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -ac	> 40
<i>C. aurantium</i> -et	> 40
<i>C. aurantium</i> -met	> 40
<i>C. aurantium</i> -ac	> 40
<i>C. aurantiifolia</i> -et	> 40
<i>C. aurantiifolia</i> -met	0,1562
<i>C. aurantiifolia</i> -ac	20
<i>C. latifolia</i> -et	> 40
<i>C. latifolia</i> -met	> 40
<i>C. latifolia</i> -ac	> 40
<i>C. reticulata</i> -et	2,5
<i>C. reticulata</i> -met	2,5
<i>C. reticulata</i> -ac	> 40

Teniendo en cuenta estos resultados, se emplearon en el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial los extractos de *C. aurantium* var. *sinensis* en etanol y metanol, *C. aurantiifolia* en metanol y *C. reticulata* en etanol y metanol, que fueron los extractos que mostraron los menores valores de MIC y se estableció para los demás ensayos de determinación de actividad antifúngica una concentración de trabajo de 20mg EAG/mL de extracto.

4.2.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *S. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Los extractos evaluados con excepción del extracto *C. aurantiifolia*-et presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *S. solani* de 100%, este resultado fue similar al obtenido cuando se empleó el fungicida sintético Silvacur combi 30 EC 0,1% (tebuconazol 22,5% y triadimenol 7,5%) (Figura 3).

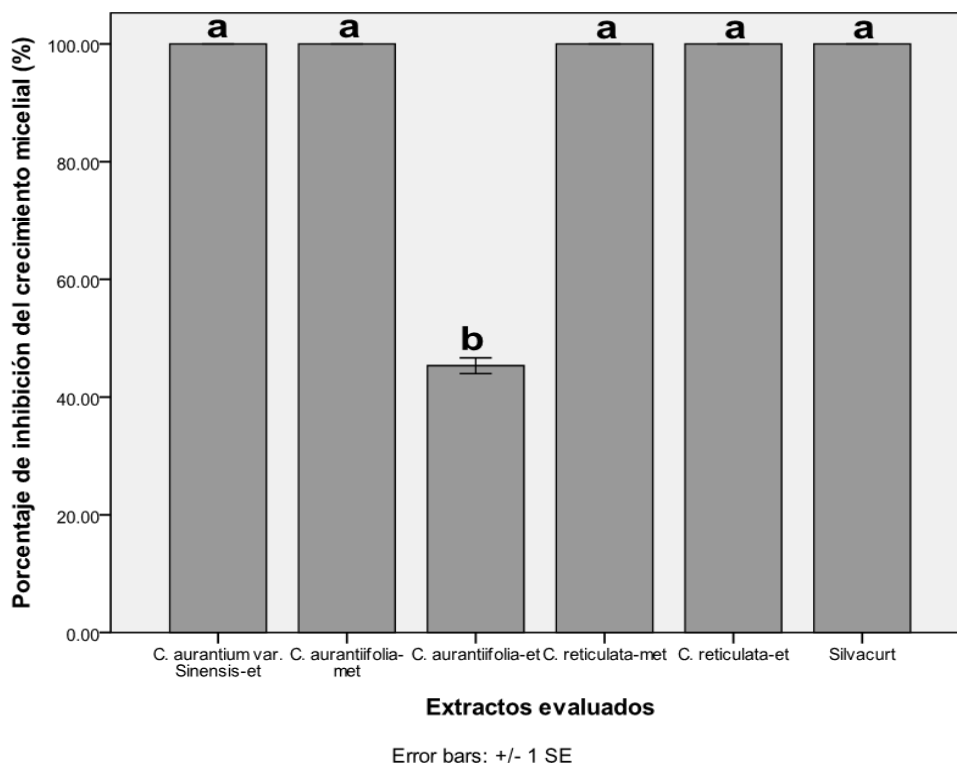


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *S. solani* por extractos de hojas de *C. aurantium* var. *sinensis*; *C. aurantium*; *C. latifolia*; *C. aurantiifolia*; *C. reticulata* en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met), a los siete días de incubación. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes \pm el error estándar. Letras distintas en las barras indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

En este trabajo no existe una correspondencia entre los extractos con menor MIC y los extractos con mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.

4.2.3. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de *S. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Todos los extractos evaluados, con excepción de *C. aurantiifolia*-met se consideraron promisorios para la inhibición de la germinación de conidios de *S. solani*, ya que mostraron una inhibición superior al 50% (Figura 4). Los extractos que mostraron mayor porcentaje de inhibición de la germinación de conidios fueron *C. aurantium*-met y *C. reticulata*-met resultado que fue similar al obtenido cuando se empleó el fungicida sintético Silvacur combi 30 EC 0,1% (tebuconazol 22,5% y triadimenol 7,5%). En el caso de *C. reticulata*-met, este resultado coincide con el que mostró una inhibición del crecimiento micelial de 100%.

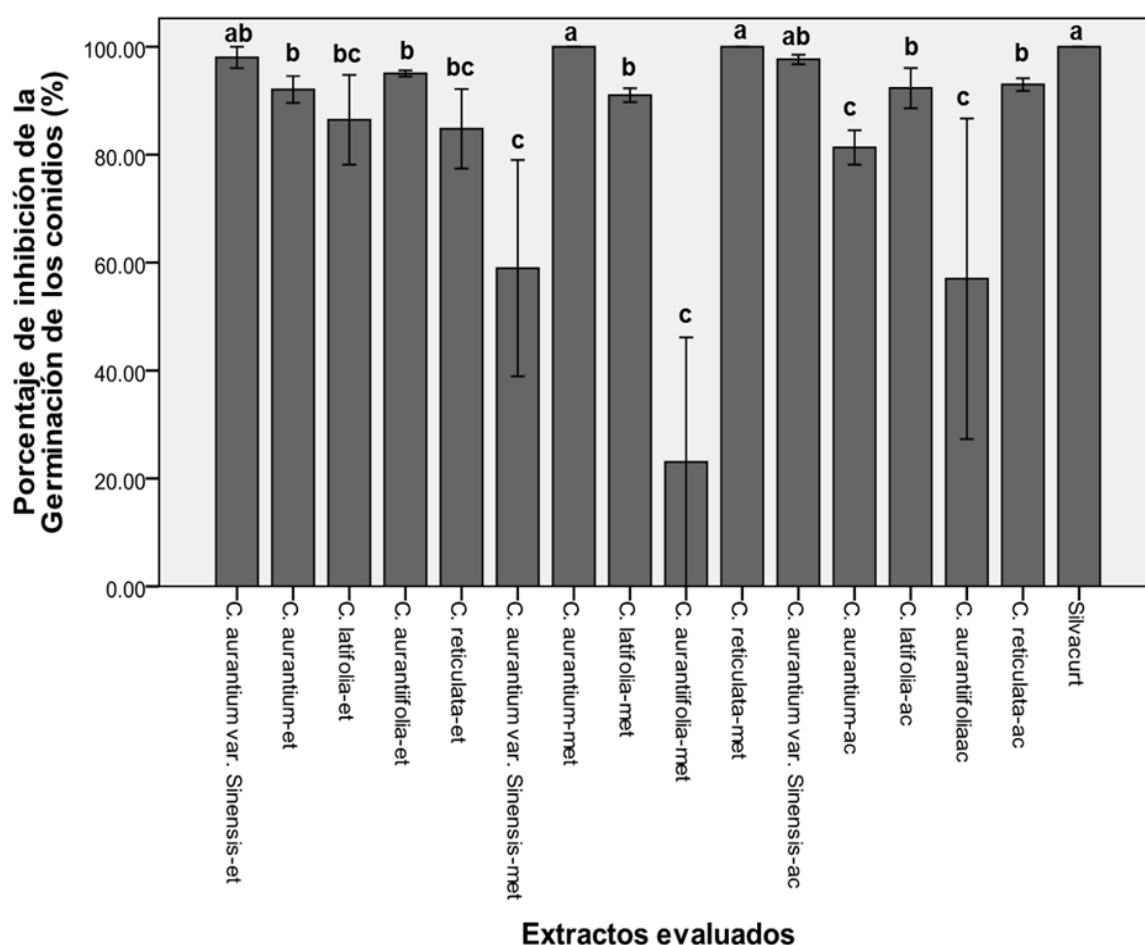
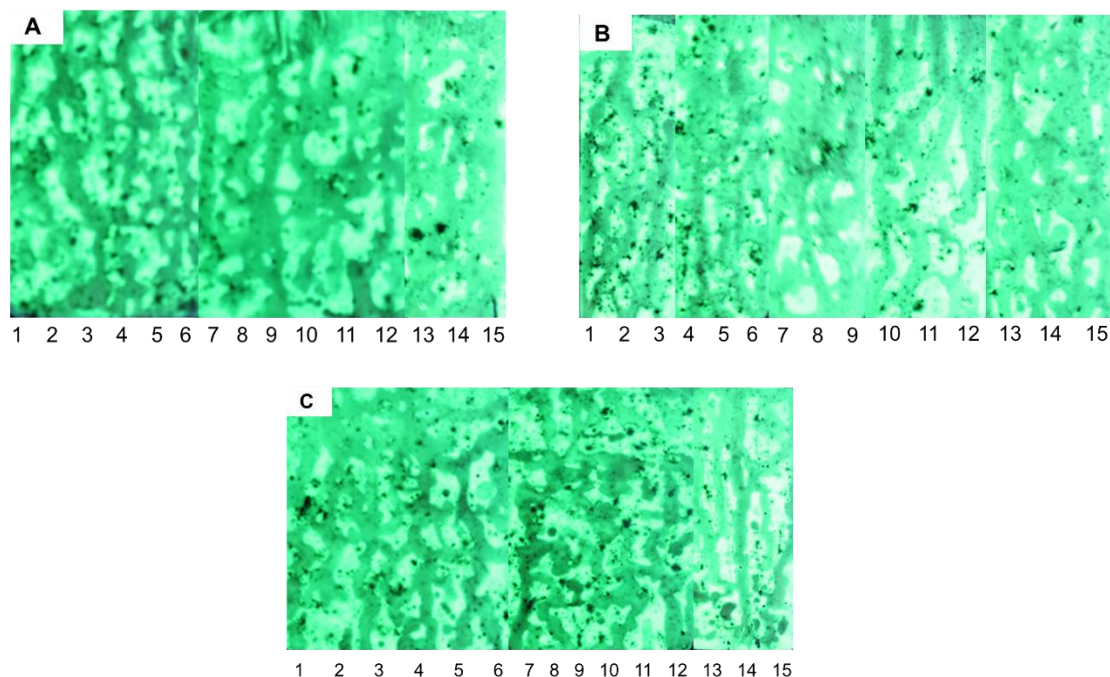


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la germinación de conidios *in vitro* de *S. solani* por extractos de hojas de *C. aurantium* var. *sinensis*; *C. aurantium*; *C. latifolia*; *C. aurantiifolia*; *C. reticulata* en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-ac) calculado las 24 horas de incubación. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes \pm el error estándar. Letras distintas en las barras indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

4.2.4. Fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. que inhibe el crecimiento de *S. solani*

Todos los extractos evaluados mediante bioautografía mostraron zonas de inhibición de la actividad de ambos hongos (Figura 5).



Leyenda

- | | | |
|---|--|--|
| 1- <i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -et | 2- <i>C. aurantium</i> -et | 3- <i>C. latifolia</i> -et |
| 4- <i>C. aurantiifolia</i> -et | 5- <i>C. reticulata</i> -et | 6- <i>C. aurantium</i> var. <i>Sinensis</i> -met |
| 7- <i>C. aurantium</i> -met | 8- <i>C. latifolia</i> -met | 9- <i>C. aurantiifolia</i> -met |
| 10- <i>C. reticulata</i> -met | 11- <i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -ac | 12- <i>C. aurantium</i> -ac |
| 13- <i>C. latifolia</i> -ac | 14- <i>C. aurantiifolia</i> -ac | 15- <i>C. reticulata</i> -ac |

Figura 5. Bioautogramas desarrollados con diferentes sistemas de solventes. (A) n-butanol-ácido acético-agua [BAA], (B) n-propanol-acetato de etilo-agua [PAA] y (C) metanol-acetato de etilo-agua [MAA] frente a *S. solani*.

En todos los extractos de hojas de *Citrus* spp. se calcularon valores de R_f de compuestos con actividad antifúngica no identificados por TLC, de igual manera, compuestos identificados mediante TLC no mostraron esta actividad (Anexo 1).

En la tabla IV se muestran los compuestos químicos, de cada extracto, con actividad antifúngica frente a *S. solani*.

Tabla IV: Compuestos químicos identificados en extractos de hojas de *C. aurantium* var. *sinensis*; *Citrus aurantium*; *Citrus latifolia*; *Citrus aurantiifolia*; *Citrus reticulata* en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-ac) con actividad antifúngica frente a *Stemphyllium solani*.

Extracto	Compuesto identificado con actividad antifúngica
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -et	Saponinas Flavonoides 3,5 metoxilado y cumarinas Otros
<i>C. aurantium</i> -et	Antraquinonas Saponinas Otros
<i>C. latifolia</i> -et	Saponinas Otros
<i>C. aurantiifolia</i> -et	Antraquinonas Otros
<i>C. reticulata</i> -et	Saponinas Otros Flavonoides 3,5 metoxilado y cumarinas Antraquinonas
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -met	Saponinas Otros Flavonoides 3,5 metoxilado y cumarinas Antraquinonas
<i>C. aurantium</i> -met	Saponinas Otros Antraquinonas
<i>C. latifolia</i> -met	Otros Antraquinonas
<i>C. aurantiifolia</i> -met	Saponinas Otros Antraquinonas
<i>C. reticulata</i> -met	Saponinas Flavonoides 3,5 metoxilado y cumarinas Antraquinonas
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -ac	Otros Antraquinonas Flavonoides 3,5 metoxilado y cumarinas I
<i>C. aurantium</i> -ac	Otros Antraquinonas
<i>C. latifolia</i> -ac	Saponinas Antraquinonas
<i>C. aurantiifolia</i> -ac	Saponinas Otros Antraquinonas Flavonoides 3,5 metoxilado y cumarinas
<i>C. reticulata</i> -ac	Antraquinonas

De los compuestos identificados por TLC, mostraron actividad antifúngica frente a *S. solani* las antraquinonas, los flavonoides 3,5 metoxilados, saponinas y cumarinas, de los cuales las antraquinonas fueron los compuestos que mostraron esta actividad con mayor frecuencia (Tabla IV). Los extractos que mostraron la mayor cantidad de compuestos químicos con actividad antifúngica fueron *C. aurantiifolia*-et, *C. reticulata*-et y *C. aurantiifolia*-met.

5. Discusión

5.1. Condiciones de extracción de fenoles totales asistida por ultrasonido a partir de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

En este estudio se empleó el método de extracción asistido por ultrasonido satisfactoriamente, y se obtuvieron extractos con concentraciones de metabolitos secundarios, sin pérdida de la actividad biológica de interés. Además, no se emplearon solventes orgánicos que debido a sus propiedades físicas pudieran afectar la capacidad de cavitación de las células (Li *et al.*, 2008). En su lugar se usaron solventes muy apropiados para la extracción de fenoles como etanol y metanol, además del agua (Falleh, 2012).

Se determinó usar como tiempos de extracción 20 min, pues de esta forma se cuantificaron concentraciones de fenoles totales superiores. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores (Espert *et al.*, 2012), los que recomiendan este tiempo de extracción para conseguir la máxima extracción de fenoles totales, pues de esta manera aumenta gradualmente la cavitación celular, lo que conlleva a la ruptura de las paredes celulares y un máximo rendimiento de la difusión de metabolitos celulares a través de las membranas, sin provocar afectaciones a los compuestos de interés (Falleh, 2012). En contraste, si se alargara el tiempo de extracción, la incidencia de la propia técnica ultrasónica puede provocar la consecuente ralentización del proceso total y el posible deterioro de los componentes, dada su interacción con los diferentes solventes (Ya-Qin *et al.*, 2009).

En este trabajo se decidió no rotoevaporar los extractos, pues aunque en la bibliografía consultada la utilización de la rotoevaporación se describe como una técnica que permite obtener una mayor concentración de metabolitos secundarios en el extracto a partir de la eliminación de solventes, las altas temperaturas de ebullición a la que es sometida el extracto provocan la pérdida de varios compuestos químicos de importancia biológica (Mosquera *et al.*, 2013).

La extracción asistida por ultrasonido, minimiza de forma adecuada el consumo de disolventes orgánicos tóxicos y el tiempo de extracción (Espert *et al.*, 2012). Así mismo, aumentan la velocidad de transferencia de componentes en los extractos, provocada por una mayor penetración del solvente en la matriz celular y por tanto un aumento en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de material vegetal. Además, constituye una técnica de alta intensidad y de bajo costo económico, reproducible y simple (Larrea, 2012).

La cuantificación del contenido de fenoles totales presentes en los extractos, constituye una herramienta eficaz para la realización de ensayos *in vitro*, los cuales se encuentran orientados a determinar actividades biológicas (Mujica *et al.*, 2009). Uno de los ensayos fotométricos más universales, es el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu desarrollado por Swain y Hills (1959), basado en la reducción del ácido fosfomolibdico hasta óxidos azules de molibdeno (Ajila *et al.*, 2011). Esta técnica consta de una elevada aplicabilidad, la misma requiere instrumentos más accesibles y de menor complejidad (García, 2004).

En la bibliografía consultada, en todos los estudios para la cuantificación de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu y como patrón el ácido gálico. Sin embargo, existen dificultades para la comparación de los resultados analíticos, debido a la utilización de diferentes unidades de medidas para expresar las concentraciones de estos metabolitos como son: mg EAG/100g de peso fresco de extracto (Gorinsteina *et al.*, 2006) y mg EAG/100mL de extracto (Benites *et al.*, 2011). De esta forma, a partir de extractos de *C. sinensis* se determinaron concentraciones de fenoles de 118mg EAG/100g de extracto (Li *et al.*, 2006) y 22mg EAG/100mL (Keskin- Šašić *et al.*, 2012). De modo similar, con el extracto de *C. reticulata* se obtuvieron concentraciones de fenoles totales de 206mg EAG/100 mL (Benites *et al.*, 2011). Los resultados referidos con anterioridad son modularmente inferiores a los alcanzados en el presente trabajo si se tiene en cuenta que los extractos evaluados se obtuvieron a una concentración de 0,1g de material vegetal por mL de solvente. Queda demostrado que las especies de cítricos evaluadas en este trabajo, contienen elevadas concentraciones de fenoles totales.

En contraste, con extractos etanólicos de hojas de *C. latifolia* y *C. aurantiifolia* bajo las mismas condiciones de extracción, se obtuvieron concentraciones de fenoles totales de 191 y 243mg EAG/mL de extracto (González, 2013), resultados superiores a los alcanzados en este trabajo con estas especies. Las diferencias entre estos resultados pudo deberse a la época del año en que se realizó la colecta del material vegetal y a la edad del órgano de la planta colectado.

5.2. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Las necesidades actuales del uso de fungicidas ambientales como estrategia de control biológico, ha orientado las investigaciones hacia el uso de extractos de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas (Haggag y Mohamed, 2007). En este sentido, uno de los géneros más utilizados es *Citrus*, dentro del cual se han evaluado las especies *C. aurantiifolia* (Duarte y Ramírez, 2013), *C. sinensis* (Rongai *et al.*, 2012) y *C. limettoides* Tanaka (Vasudeva y Sharma, 2012) frente a los patógenos de planta *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Cladosporium herbarium* respectivamente.

5.2.1. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *S. solani*

La menor concentración a la cual un producto es capaz de inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo luego de un periodo de incubación, ha sido estudiado en trabajos donde se investiga el papel de extractos de plantas como control biológico frente agentes patógenos (Džamić *et al.*, 2008). El estudio de este parámetro resulta provechoso para determinar la dosis exacta a aplicar de un producto antimicrobiano frente a cualquier microorganismo, así como para confirmar su resistencia (Sen y Batra, 2012).

Frente a *S. solani* se ha encontrado en la bibliografía consultada solamente un estudio de determinación de la MIC mediante dilución en agar con extractos etanólicos de hojas de *S. indica* donde se obtuvo un valor de MIC de 0,1mg/mL (Khalil *et al.*, 2005), mayor al obtenido con los extractos de *C. aurantium* var. *sinensis* en etanol y metanol del presente estudio. Los autores atribuyen este resultado a la presencia de mono, di, triterpenos, sesquiterpenos, lignanos y ácidos fenólicos en las hojas de *S. indica* (Arenas *et al.*, 2009), compuestos que no se identificaron en las especies de cítricos utilizadas en este trabajo. Si se tiene en cuenta que algunos autores afirman que los terpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (Sati y Joshi, 2011), debido a que ocasionan impermeabilidad y ruptura de la membrana plasmática, además de vaciamiento del contenido celular del patógeno (Ribera, 2007), se explica este menor valor de la MIC.

La interpretación de los resultados de los estudios de determinación de MIC, con frecuencia resulta dificultosa debido al empleo de diferentes técnicas para la determinación de este parámetro. En este sentido, mediante microdilución en agar se han obtenido valores de MIC de 1000µg/mL con extractos de la cáscara de los frutos

de *C. sinensis*, *C. limon* y *C. reticulata* frente a *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., *Curvularia* sp. y *Colletotrichum* sp (Johann *et al.*, 2007) debido a la presencia en estas plantas de compuestos como flavonoides y cumarinas. Sin embargo, mediante difusión en agar con aceites esenciales de hojas de *C. aurantiifolia* var. Mexican, *C. aurantiifolia* var. Bearss y *C. aurantiifolia* var “Sans épines”, se han obtenido valores de MIC de 1,4, 1,5 y 1,5mg/mL respectivamente ante *Phaeoramularia angolensis* T. Carvalho & O. Mendes, dada la presencia en los extractos de aldehídos, compuestos monoterpenoides hidrocarbonados (citral y limoneno), hidrocarburo de monoterpeno y monoterpenoides oxigenados (acetato de nerilo y acetato geranil). (Dongmo *et al.*, 2009). Cuando se emplearon aceites esenciales extraídos de la cáscara de *Citrus reticulata* mediante dilución en agar se han obtenido valores de MIC de 0.2mg/100ml frente a *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani* y *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, a consecuencia del elevado contenido de compuestos aromáticos como limoneno y geranial en el extracto (Chutia *et al.*, 2009).

En el presente estudio con extractos de *C. aurantium* var. *sinensis* en etanol, *C. aurantium* var. *sinensis* y *C. aurantiifolia* en metanol se obtuvieron valores de MIC frente a *S. solani*, inferiores a las de los estudios consultados, esto pudo deberse a que en el presente trabajo los extractos fueron evaluados mediante la técnica de microdilución en agar. Si se tiene en cuenta que en la microdilución se emplea un medio de cultivo líquido, la difusión de los componentes que tendrá lugar en el mismo será mayor que la que tendrá lugar en el medio de cultivo semisólido empleado en la dilución o difusión (Hadacek y Greger, 2000).

5.2.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *S. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

La evaluación *in vitro* de la inhibición del crecimiento micelial de un hongo, constituye un método eficaz por su rapidez y veracidad en la medición de algún producto con actividad biológica, que pueda ser empleado para tratar patologías que afectan especies vegetales o animales (Rondón *et al.*, 2006).

Frente a *S. solani* se han probado extractos butanólicos y acuosos de hojas y tallos de *E. macroclada*, con los que se obtuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores al 43% (Al-Mughrabi, 2003), este resultado puede deberse a la presencia en este género de compuestos diterpenoides y esteroides. Además, con las especies *A. farnesiana*, *P. hysterothorus* y *P. carlinensis* se alcanzaron valores de inhibición superiores al 80%, resultado que es atribuido a la presencia en estas plantas de flavonoides, fenoles, taninos, aminoácidos y saponinas (Rodríguez *et al.*, 2000).

Al emplear otras especies vegetales se han obtenido porcentajes de inhibición del crecimiento micelial inferiores al 50%, tal es el caso de los extractos etanólicos de *Achillea tominotosa*, *Convolvulus siculus*, *Artemisia arborescens* y *Anthemis nobilis* con porcentajes de inhibición micelial de 44, 33, 32 y 30 respectivamente (Khalil *et al.*, 2005). Así como los extractos de *Olea europea* con los que se alcanzaron porcentajes de inhibición de 10,1% pese a la presencia en el biopreparado de cumarinas, flavonoides y ácido ferúlico (Al-Mughrabi *et al.*, 2001).

Los extractos de hojas de *C. aurantium* y *C. reticulata* en metanol empleados en este trabajo inhibieron totalmente el crecimiento micelial de *S. solani*. Este resultado es semejante al alcanzado con aceites esenciales extraídos de partes aéreas de *Plectranthus cylindraceus* Hoechst (Marwah *et al.*, 2007) y de *Cuminum cyminum* L. y *Pimpinella anisum* L. Los autores atribuyen la actividad antifúngica de estos extractos a la existencia en estas plantas de terpenos como el carvacrol y α -terpenoleno (El-Said y Goder, 2014), lo cual coincide con los resultados del presente trabajo porque anteriormente fueron hallados en los extractos de *C. reticulata* en ambos solventes compuestos terpenoides (Iglesias, 2012) que pudieran ser activos frente a *S. solani*.

En el género *Citrus* se han realizado otros estudios de cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, donde los aceites esenciales de *C. aurantiifolia* var. *Mexican*, *C. aurantiifolia* var. *Bearss* y *C. aurantiifolia* var. *Sans épines* inhibieron totalmente el crecimiento de *Phaeoramularia angolensis* (Dongmo *et al.*, 2009), al igual que los aceites extraídos de *C. sinensis* que fueron probados frente a *Aspergillus niger* Tiegh. (Sharma y Tripathi, 2008). En ambos estudios la actividad antifúngica se encuentra relacionada a las concentraciones de limoneno y neral en los aceites esenciales de estas especies, sin embargo en los extractos de *C. aurantiifolia* y *C. sinensis* empleados en el presente trabajo, no se hallaron terpenos.

Además, con extractos de cáscaras de *C. sinensis*, *C. aurantiifolia* y *C. reticulata* se obtuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* de 83%, 71% y 68% respectivamente, debido a la presencia de compuestos bioactivos como alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos (Okwu *et al.*, 2007), similar al presente estudio, donde en extractos con estas especies se obtuvieron elevadas concentraciones de estos metabolitos. De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que los extractos de hojas de cítricos son potencialmente curativos para infecciones provocadas por *S. solani*.

Las diferencias entre los resultados de la MIC y el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial pueden deberse al empleo de diversas técnicas para el cálculo de estos parámetros, teniendo en cuenta que la difusión de los metabolitos varía entre un medio de cultivo líquido y uno semisólido (Hadacek y Greger, 2000). Además, al variar

las concentraciones de fenoles totales cambiaron las proporciones de cada uno de los componentes con actividad antifúngica de los extractos.

5.2.3. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de *S. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

El estudio *in vitro* de la inhibición de la germinación de conidios, permite comprobar que un producto puede ser aplicado como un antimicrobiano de carácter preventivo, que detenga la formación de nuevos microorganismos a partir de otro ya existente (Deepak *et al.*, 2007).

Frente a *S. solani* la inhibición de la germinación de conidios se encuentra poco estudiada *in vitro*. De esta forma, solo se ha encontrado un estudio referido a la utilización de aceites esenciales de *Plectranthus cylindraceus* Hochst. ex Benth. que a una concentración de $125\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ logró inhibir hasta un 70% la germinación de conidios, a consecuencia de la presencia en sus hojas de carvacrol y α -terpenoleno (Marwah *et al.*, 2007). En el presente estudio, todos los extractos a excepción de *C. aurantiifolia* en metanol, *C. aurantiifolia* en agua y *C. aurantium* var. *sinensis* en metanol, se obtuvieron porcentajes de inhibición de la germinación de conidios superiores aunque su fitoquímica no reveló esta clase de compuestos químicos, lo que evidencia la potencialidad preventiva de los extractos de hojas de cítricos frente a *S. solani*.

La inhibición de la germinación de conidios se ha estudiado también con extractos acuosos de *C. limon* frente a *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb) Vuill, obteniéndose valores de inhibición de 100% (Bautista *et al.*, 2000), relacionados a la presencia de flavonoides y cumarinas en los extractos (Johann *et al.*, 2007). Además, se han empleado extractos acuosos de hojas de *C. limon* y *C. sinensis* frente a *A. niger*, *Fusarium* spp., *Pyricularia oryzae* Cavara, *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebr, *Penicillium digitatum*, *P. italicum* Wehmer y *Cochliobolus miyabeanus* Dreschler (Deepak *et al.*, 2007), obteniéndose un 100% de inhibición de la germinación de conidios.

Los autores atribuyen la actividad antifúngica de estos extractos a las elevadas concentraciones de fitoalexinas, capaces de inhibir la germinación conidial (Deepak *et al.*, 2007). Sin embargo, en el presente trabajo la inhibición de la germinación conidial pudo deberse principalmente a la presencia de compuestos fenólicos que son capaces de causar inflamación en las puntas de las hifas, distorsión de las células y arrugamientos de la superficie hifal (Okwu *et al.*, 2007).

De modo similar, extractos obtenidos de *C. grandis* inhiben la germinación de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds debido a la presencia de altas concentraciones de compuestos fenólicos como: flavonoides, flavonas y glucósidos de flavona, metabolitos secundarios que poseen la capacidad de formar alcoholes y ésteres que inhiben el crecimiento de las hifas e impiden la germinación de esporas, además de ser inhibidores enzimáticos que afectan la respiración celular de los hongos (Gaviria *et al.*, 2013). Lo anteriormente expuesto explica la actividad antifúngica de los extractos de *Citrus* spp. en los cuales se determinó la presencia de estos metabolitos.

5.2.4 Fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. que inhibe el crecimiento de *S. solani*

Los componentes del metabolismo secundario de las especies vegetales han sido investigados con frecuencia, dada su aplicabilidad como productos antifúngicos activos. Mediante estos estudios se intenta demostrar qué metabolitos específicamente son capaces de inhibir el desarrollo de patógenos vegetales y su modo de acción. En este trabajo se evidencia la actividad antifúngica de antraquinonas, cumarinas, flavonoides, saponinas, entre otros compuestos no identificados frente a *S. solani* (Tabla IV)

Las quinonas basan su actividad antimicrobiana en su capacidad de formar complejos irreversibles con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de membranas microbiales, produciendo de esta forma la inactividad de las proteínas. Su blanco más probable lo constituyen las adhesinas expuestas en la superficie de las membranas y los polipéptidos presentes en la paredes celulares (Domingo y López, 2003).

Se ha estudiado que las naftoquinonas (tectoquinona, 2-hydroxymethylantraquinona, 3'-OHdeoxyisolapachol (2-[(1E)-3-hydroxy-3-methylbut-1-enyl] naftoquinona) extraídas de la corteza de *Tectona grandis* L. muestran actividad antifúngica frente a *A. niger* (Sumthong *et al.*, 2000). Similarmente, las antraquinonas presentes en el extracto de *Cassia tora* L. son activas frente a *Botrytis cinerea*, *Erysiphe graminis* DC., *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* Roberge ex Desm., *Pyricularia grisea* (Sacc.) Sacc. y *R. solani* (Abad *et al.*, 2007).

Estos metabolitos secundarios cuando son producidos sintéticamente también poseen actividad antimicrobiana, tal es el caso de la 5,8-dihidroxi-1,4-naftaquinona y 5-acetamido-8-hidroxi-1,4-naftaquinona activa frente a *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* y *Aeromonas hydrophila* (Riffel *et al.*, 2002).

La actividad antimicrobiana de las cumarinas es posible a consecuencia de la interacción que tiene lugar entre la región hidrofílica de su estructura y el lado polar de las membranas microbiales. De esta forma, el anillo benceno de estos compuestos y su cadena alifática, irrumpen en la estructura de mosaico fluido de la membrana provocando el colapso celular (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Además, son capaces de actuar como antioxidantes, inhibidores de enzimas y precursores de sustancias tóxicas así como queladores de metales (Kostova, 2005).

La 5-methylcumarina presente en extractos metanólicos de partes aéreas de *Mutisia friesiana* Cabrera, posee actividad antifúngica ante *Cladosporium cucumerinum* Ellis y Arthur (Abad *et al.*, 2007) al igual que es capaz de potenciar la actividad antifúngica de aceites esenciales provenientes de hojas de *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh frente al patógeno de raíces *Coriolum versicolor* Quéil (Wang *et al.*, 2005). Esta clase de metabolito a elevadas concentraciones también retarda la germinación de esporas de *A. niger* (Adesina, 2005). Además, producidas de modo sintético las cumarinas ecooletina, umbelliferon, xanthotoxina y herniarina tienen un marcado efecto fungicida frente a *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. (Ojala *et al.*, 2000).

Los flavonoides alteran las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de las membranas microbianas, interfiriendo con su fluidez, además de provocar la fusión de orgánulos citoplasmáticos y formar complejos con la pared de las células microbianas y las proteínas solubles en el citoplasma, alterando la función de estas estructuras (Iglesias, 2012). Además, actúan como potentes inhibidores enzimáticos, debido a las interacciones que se producen entre el residuo de azúcar de su anillo aromático y el centro activo de las proteínas (Santacoloma y Granados, 2012).

La actividad de estos compuestos ha sido determinada en extractos en cloroformo de hoja de *Tridax procumbens* L., los cuales inhiben el crecimiento de *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, *R. solani* y *Pyricularia oryzae* Cavara (Acharya y Srivastava, 2010). Similarmente, han sido encontrados en extractos metanólicos de la corteza del tallo de *Careya arborea* Roxb y probados frente a *A. solani* (Sambath *et al.*, 2006) así como en extractos metanólicos de las semillas de *Phaleria macrocarpa* Scheff y probados frente a *A. niger* (Hendra *et al.*, 2011).

De modo similar, las flavonas encontradas en extractos en hexano de cáscaras del fruto de *C. sinensis*, *C. limón* y *C. reticulata* se han empleado como control biológico frente a *Penicillium digitatum*, *Curvularia* sp. y *Colletotrichum* sp. (Johan *et al.*, 2007). Además, la flavona O-glicosilada naringina, extraídas de las hojas de *Barringtonia racemosa* L., actúa inhibiendo el crecimiento de *Fusarium* spp. y *Rhizopus* spp. (Hussin *et al.*, 2010). y las flavonas 3, 4, 5, 7-tetracetil-quercetina extraída de *Adina cordifolia* (Roxb.) Brandis exhibe actividad antifúngica frente a *Aspergillus fumigatus*

Fresen. (Arif *et al.*, 2011) y la polimetoxiflavona tangeretina del fruto de *C. aurantium* actúa ante *P. digitatum* (Lattanzio *et al.*, 2006).

Las saponinas forman de complejos con esteroides y proteínas de las membranas celulares lo que le confiere a la misma su actividad antimicrobiana, estas interacciones producen grandes poros que alteran su permeabilidad con la consecuente lisis celular (incluyendo la muerte celular programada) (Díaz, 2009).

La saponina α -tomatina presente en las hojas y frutos de *L. esculentum* posee actividad antifúngica ante *Alternaria solani* (Mert-Turk, 2006), de igual forma sucede con la actividad de extractos de *Yucca schidigera* Ortgies relacionado a la presencia de saponinas esteroidales espirostanol y furostanol glucósido contenidas en sus frutos (Chapagain *et al.*, 2007). Las saponinas triterpénicas le confiere a las hojas de *Labisa pumila* Benth actividad antifúngica frente a *Fusarium* spp y en *Dhreslera gramínea* L. permiten la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus nodosus* Namys (Karimi *et al.*, 2011). Así mismo, las saponinas encontradas en raíces de *Medicago hybrid* reducen notablemente el crecimiento micelial de *B. cinerea* y *Botrytis tulipae* Lind.

En este estudio, mediante el método bioautográfico se encontraron además otros compuestos no identificados que mostraron marcada actividad frente a *S. solani*. En la bibliografía consultada, se hace alusión a la presencia de otra clase de compuestos metabólicos con actividad antifúngica y antimicrobiana, tal es el caso de los terpenos y las lactonas, los cuales afectan la permeabilidad de las membranas y son capaces de penetrar al interior de la célula, y actuar recíprocamente con los sitios intracelulares críticos (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Así como los aceites esenciales (Prabuseenivasan *et al.*, 2010) que provocan en las hifas de los hongos una disminución de su diámetro, seguido de una precipitación de biomoléculas en la pared celular, desorganización de la membrana plasmática mitocondrial, pérdidas de Ca^{2+} , K^+ y Mg^+ por parte del micelio y disminución del contenido de lípidos (Bejarano y Centeno 2009). Además, causan la inhibición de la respiración celular y alteran la permeabilidad de la membrana (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

De esta forma, se ha determinado la actividad antifúngica de triterpenoides hallados en extractos de hojas de *Cassia fistula* L. frente *C. albicans* y *Aspergillus* spp. (Panda *et al.*, 2010 y Qin *et al.*, 2010). Además, los sesquiterpenos 5 y 7-hidroxicalameneno, drimenol, drimenal, viridifloral y gimnomitrol extraídos de *Bazzania trilobata* L. S.F. Gray son activofrente a *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum* Ellis & Arthur, *Phytophthora infestans*, *Pyricularia oryzae* y *Septoria tritici* Desm. (Abad *et al.*, 2007). De modo similar, se ha determinado la actividad antifúngica de lactonas encontradas en extractos etanólicos del epicarpio de *Citrus aurantiifolia* frente a *Botrytis cinerea* y *Monilia fructicola* L.R. Batra (Duarte y Ramírez, 2013).

Además, se ha evaluado el efecto de aceites esenciales empleando especies como: *C. limón* frente a *Aspergillus flavus* Link, *Fusarium* spp. y *A. niger*, (Bejarano y Centeno 2009) así como aceites extraídos de *C. aurantium* frente a *A. niger* (Sharma y Tripathi, 2008) y *Geotrichum candidum* Link (Verma *et al.*, 2011). Los autores atribuyen las propiedades de estas sustancias a la presencia de D-limoneno, linalol o citral, a diferentes concentraciones (Alma *et al.*, 2004) así como a la presencia de otros compuestos fenólicos en su constitución (Veldhuizen *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, los resultados demuestran la potencialidad antifúngica presente en extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas de cítricos naturalizados en Cuba, frente a *S. solani*, lo que establece una alternativa viable para su empleo como una estrategia de manejo agroecológico de este patógeno.

6. Conclusiones

1. Se determinaron como condiciones de extracción de fenoles totales a partir de hojas de *C. aurantium*, *C. aurantium* subf. *sinensis*, *C. reticulata*, *C. aurantiifolia* y *C. latifolia*, tiempos de ultrasonido de 20min y no rotoevaporación.
2. Los extractos de hojas de cítricos evaluados, excepto el de *C. aurantium* en etanol, mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *S. solani* de 100%.
3. Los extractos de hojas de cítricos evaluados excepto el de *C. aurantiifolia* en metanol, se consideraron promisorios siendo los extractos de *C. reticulata* en metanol y *C. aurantium* en metanol los que mostraron mayores porcentajes de inhibición (100%).
4. Las antraquinonas fueron los compuestos químicos del extracto que con mayor frecuencia mostraron actividad antifúngica.

7. Recomendaciones

- ✚ Realizar el experimentos *in vivo* con los extractos con mejores resultados en el control de *Stemphyllium solani* en condiciones *in vitro*.
- ✚ Caracterizar por técnicas de mayor resolución y especificidad los extractos de hojas de *Citrus* spp con actividad antifúngica frente a *S. solani*.
- ✚ Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de las fracciones puras de los compuestos identificados con actividad antifúngica.

Referencias Bibliográficas

- Abad, M. J., M. Ansuategui y P. Bermejo (2007): Active antifungal substances from natural sources. **ARKIVOC**. 116-145.
- Acharya, S. y R. Srivastava (2010): Antifungal property of *Tridax procumbens* L. against three phytopathogenic fungi. **Arch Pharm Sci & Res**. 2: 258-263.
- Adesina, S. K. (2005): The Nigerian Zanthoxylum; chemical and biological values. **Afr. J. Trad. CAM**. 2: 282-301.
- Agrios, G.N (2005): **Plant Pathology. Academic Prey**. 5 th edition. Estados Unidos, 952 pp.
- Agudelo, A. A., N. Ceballos y F. Orozo (2011): Caracterización morfológica del tomate tipo cereza (*Solanum lycopersicum* Linnaeus). **Agron**. 19: 44–53.
- Ajila, C.M., S. Brar, M. Verma, R. Tyagi, S. Godbout y J. Valéro (2011): Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. **Crit. Rev. Biotechnol**. 31: 227-249.
- Alkhail, A. A. (2005): Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. **Pak J. Biol Sci**. 8: 413-417.
- Alma, M. H., S. Nitz, H. Kollmannsberger, M. Digrak, F. Efe y N. Yilmaz (2004): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). **J Agric Food Chem**. 52: 3911-3915.
- Al-Mughrabi, K. I. (2003): Antimicrobial activity of extracts from leaves, stems and flowers of *Euphorbia macroclada* against plant pathogenic fungi. **Phytopathol. Mediterr**. 42: 245–250.
- Al-Mughrabi, K. I., T. Aburjai, G. Anfoka y W. Shahrour (2001): Antifungal activity of olive cake extracts. **Phytopathol. Mediterr**. 40: 240–244.
- Al-Rahmah A. N., A. Mostafa, A. Abdel-Megeed, S. Yakout y S. Hussein (2013): Fungicidal activities of certain methanolic plant extracts against tomato phytopathogenic fungi. **Afr. J. Microbiol. Res**. 7: 517-524.
- Álvarez, R. Z. y F. Delgadillo (2004): Enfermedades del tomate y chile Bell. **Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción**. 69-99.
- Amadi, J.E., S. Salami y C. Eze (2010): Antifungal properties and phytochemical screening of extracts of African Basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Agric. Biol. J. N. Am**. 1: 163-166.
- Arenas, R. C., E. Pachón, G. Méndez-Callejas y A. Guzmán (2009): Estudio del efecto inhibitorio de extractos de *Salvia scutellarioides* sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina. **Universitas Scientiarum**. 14: 141-150.

- Arif, T., T. Mandal y R. Dabur (2011): Natural products: Antifungal agents derived from plants. **Natural Products in Medicinal Chemistry**. 37: 283-311.
- Asgedom, S., P. Struik, E. Heuvelink y W. Araia (2011): Opportunities and constraints of tomato production in Eritrea. **Afr J Agric. Res** 6: 956-967.
- Ashok kumar, K, M. Narayani, A. Subanthini y M. Jayakumar (2011): Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels -Utilization of Fruit Waste. **International Journal of Engineering Science and Technology**. 3: 5414-5421.
- Aslam, A., F. Naz, M. Arshad, R. Qureshi y C. Rauf (2010): *In vitro* antifungal activity of selected medicinal plant diffusates against *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. **Pak. J. Bot.** 42: 2911-2919.
- Avellaneda, I. O. (2013): Evaluación de la actividad inhibitoria de la α - glucosidasa (α -GLC) *in vitro* por extractos vegetales. [Tesis de diploma]. Universidad tecnológica de Pereira.
- B. de Faz, A. (1985): **Control de plagas y enfermedades en los cultivos**. Ministerio de Educacion Superior. Cuba. 622 pp.
- Babalola D. A., Y. Makinde, B. Omonona y M. Oyekanmi (2010): Determinants of post harvest losses in tomato production: a case study of Imeko – Afon local government area of Ogun state, **Journal of Life and Physical Science**. 3: 14–18.
- Bautista, S., M. Hernández, J. Díaz y C. Cano (2000): Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of „ciruela” fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. **Postharvest Biology and Technology**. 20: 99-106.
- Behdani, M., M. Pooyan y S. Abbasi (2012): Evaluation of Antifungal Activity of some medicinal plants essential oils against *Botrytis cinerea*, causal agent of postharvest apple rot, *in vitro*. **Intl J Agri Crop Sci**. 4: 1012-1016.
- Bejarano, R.J., y S. Centeno (2009): Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. **R.S. V. M.** 29: 57-63.
- Benites, J. V., R. Díaz, J. López, S. Gajardo, F. Kusch Fuschlocher y M. Rojas (2011): Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. **BIOFARBO**. 19: 1 – 7.
- Benkeblia, N. (2004): Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 37: 263–268.

- Bernal A., I. Gato, M. Díaz, L. Herrera y B. Martínez (2006): Empleo de cepas de bacterias antagonistas en el control de *Stemphylium solani* Webber en tomate bajo cultivo protegido. **Centro Agrícola**. 33: 37-40.
- Calvo, M.A., E. Arosemena, C. Shiva y C. Adelantado (2011): Antimicrobial activity of plant natural extracts and essential oils. **Formatex 2011**. 1179-1185.
- Camara, M.P., N. O'Neill y P. van Berkum (2002): Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**. 94: 660–672.
- Cedeño, L., C. Carrero, R. Ruíz, G. Fermín, H. Pino y K. Quintero (2011): Primer reporte de *Stemphylium solani* en Lisiantus. **Fitopatol. Venez.** 24: 38-41.
- Centurión, S. B., A. Aquino y G. Bozzano (2013): Extractos vegetales para el control alternativo del damping-off causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate. **Investig. Agrar.** 15: 23-29.
- Chapagain, B.P., Z. Wiesman y T. Srór: (2007). *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. **I. Crops and Products**. 26:109-115.
- Chaparro, A. P. (2010): Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. **[Tesis de diploma]**. Bogotá, Colombia.
- Chutia, M., P. Deka, M. Pathak, T. Sarma y P. Boruah (2009): Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT- Food Sci Technol**. 42: 777–780.
- Corpeño, B. (2004): Manual de cultivo de tomate, Colonia Escalon San Salvador. **Fintrac IDA**. 1-31.
- Cotoras, M., C. Folch y L. Mendoza (2004): Characterization of the Antifungal Activity on *Botrytis cinerea* of the Natural Diterpenoids Kaurenoic Acid and 3-Hydroxy-kaurenoic Acid. **Agric. Food Chem**. 52: 2821-2826.
- Cushnie, T. y A. Lamb (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 26: 343-356.
- Damicone, J. O. y L. Brandenberger (1993): Common Diseases of Tomatoes. Part I. Diseases Caused by Fungibe. **Oklahoma Cooperative Extension Service. EPP-7625**: 1-6.
- Dawar, H., S. Abbas, M. Tariq y M. J. Zaki (2008): *In vitro* fungicidal activity of spices against root infecting fungi. **Pak. J. Bot**. 40: 433-438.
- Deepak, S. A., G. Oros, S. Sathyanarayana, H. Shekar y S. Sashikanth (2007): Antisporulant Activity of Watery Extracts of Plants against *Sclerospora*

- graminícola* Causing Downy Mildew Disease of Pearl Millet. **Am. J. Agril. & Biol. Sci.** 2: 36-42.
- Díaz, A., F. Hernández, R. Belmares, G. Gallegos, R. Rodríguez y C. Aguilar (2013): Efecto de extractos de *Larrea tridentata* y *Flourensia cernua* en el desarrollo de plantas de tomate inoculadas con *Phytophthora capsici*. **Agraria**. 10: 49-58.
- Díaz, L.N. (2009): Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. **Revista de Estudios Transdisciplinarios**. 1: 32-55.
- Domingo, D. y M. López (2003): Plantas con acción antimicrobiana. **Rev. Esp. Quimoterap.** 16: 385-393.
- Domingos, J. (2011): **Análisis de la variabilidad en las especies del subgénero *Eulycopersicon* más relacionadas con el tomate cultivado**. Editorial Universitat Politècnica de València, Valencia, España, 157 pp.
- Dongmo, P. M., L. Tatsadjieu, E. Tchinda, J. Kuate y P. Amvam y C. Menut (2009): Essential oils of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and their antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis*. **Afr. J. Agric. Res.** 4: 354-358.
- Duarte, Y. A. y M. Ramírez (2013): Acción antifúngica del extracto etanólico y sus fracciones de polaridad creciente del epicarpio de lima (*Citrus aurantifolia* swingle) aplicada a *Botrytis cinerea* y *Monilia fructícula* causantes de la podredumbre gris en la uva (*Vitis vinifera*), y la podredumbre morena en el durazno (*Prunus serotina* Ehrh). **Nova scientia**. 1: 53-59.
- Džamić, A., M. Soković, M. Ristić, S. Grujić, J. Vukojević, y P. Marin (2008): Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (Lamiaceae) essential oil. **Arch. Biol. Sci., Belgrade**. 60: 233-237.
- El-Said, A. H. y E. Goder (2014): Antifungal Activities of *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* Essential Oils. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.** 3: 937-944.
- Esperet, M. M., A. Periche, A. Heredia y M. Castelló (2012): Aplicación de ultrasonido o energía de microondas a la extracción de compuestos antioxidantes en infusiones en hojas de *Estevia*. **[Tesis de diploma]**. España. Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera.
- Falleh, H., R. Ksouri, M. Lucchessi, Ch. Abdelly y C. Magné (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. **Trop J Pharm Res.** 11: 243-249.

- Farooq, M. A., U. Iqbal, Sh. Iqbal, R. Afzal y A. Rasool (2010): *In vitro* evaluation of different plant extracts on mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* the cause of root rot of sugar beet. **Mycopath.** 8: 81-84.
- Florido, M., M. Álvarez, R. Lara, D. Plana, A. Caballero, R. Florido, T. Shagarodsky y C. Moya (2008): Análisis de la variabilidad morfoagronómica en la colección de tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservada *Ex Situ* en Cuba. **Cultivos tropicales.** 29: 43-48.
- Formighieri, O. A., J. Stangarlin, C. Meinerz, G. Franzener y K. Schwan (2010): Evaluation of the potential of the medicinal plant *Adiantum capillus-veneris* (L.) for the control of phytopathogens. **Arquivos do Instituto Biológico.** 77: 487-496.
- García, D.E. (2004): Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. **Pastos y Forrajes.** 27: 1-12.
- García, P. (2002): Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad *in vitro*. **Rev. Chil. Infect.** 19: 96-100.
- Gaviria, V. H., L. Patiño y A. Saldarriaga (2013): Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. **Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.** 14: 67-75.
- Gómez, O. y A. Casanova (2000): **Mejora genética y manejo del Cultivo del Tomate para la producción en el Caribe.** Editorial Instituto de Investigaciones "Liliana Dimitrova", La Habana, Cuba, 159pp.
- Gonzales, D. H. (2013): Modo de acción de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun y Crous 2003 y *Alternaria solani* Sor., hongos fitopatógenos de *Lycopersicum esculentum* Mill. **[Tesis de diploma]**. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas".
- Gorinsteina, S., Z. Zachwiejab, E. Katricha, E. Pawelzick, R. Haruenkitd, S. Trakhtenberge, O. Martin (2004): Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 37: 337-343.
- Guerrero, E. R., S. Solís, F.D. Hernández, A. Flores, V. Sandoval y D. Jasso (2007): Actividad Biológica *in vitro* de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr: Fr.) Keissl, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr) Sacc., Ciudad de obregón. **Revista Mexicana de Fitopatología.** 25: 48-53.
- Guevara, Y. V., Y. Ruisánchez, A. Hernández y S. J. Rodríguez (2013): Evaluación del biofertilizante Nitrofix en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sobre

- un suelo ferralítico rojo típico. **ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar.** 47: 3-7.
- Hadacek, F. y H. Greger (2000): Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem anal.** 11: 137-147.
- Hadian, S. (2012): Antifungal activity of some plant extracts against some plant pathogenic fungi in Iran. **Asian J. Exp. Biol. Sci.** 3: 714-718.
- Haggag, W. M. y H. Mohamed (2007): Biotechnological aspects of microorganism used in plant biological control. **World J. Agric. Sci.** 3: 771-776.
- Haouala, R., S. Hawala, A. El-ayeb, R. Khanfir y N. Boughanmi (2008): Aqueous and organic extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. inhibit the mycelia growth of fungi. **J. Environ. Sci.** 20:1453–1457.
- Hashmat, I., H. Azad y A. Ahmed (2012): Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - A Nature's Drugstore: An overview, Bangalore. **I. Res. J. Biological Sci.** 1: 76-79.
- Hassanein, N. M., M. Abou, K. Youssef y D. Mahmoud (2008): Efficacy of Leaf Extracts of Neem (*Azadirachta indica*) and Chinaberry (*Melia azedrach*) Against Early Blight and Wilt Diseases of Tomato. **Aust. J. Basic & Appl. Sci.** 2: 763-772.
- Hendra, R., S. Ahmad, A. Sukari, M. Yunus y E. Oskoueian (2011): Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. **Int. J. Mol. Sci.** 12: 3422-3431.
- Herrera, Y. (2011): Actividad antioxidante in vitro y toxicidad frente a *Artemia salina* de extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos. **[Tesis de Diploma]**. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas".
- Huamaní, M. y J. Ruiz (2005): Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida Albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. **[Tesis de diploma]**. Lima, Perú.
- Hussin, N.M., R. Muse, S. Ahmad, J. Ramli, M. Mahmood, M. Sulaiman, M. Shukor, M. Rahman y K. Aziz (2010): Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (*Lecythidaceae*). **Afr. J. Biotechnol.** 8: 2835-2842.
- Iannacone, J. y Y. Murrugarra (2002): Efecto del nim y rotenone en las poblaciones de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: *Gelechiidae*) en dos especies de áfido (Homoptera: *Aphididae*) en el cultivo del tomate en Ica. **Folia Entomológica Mexica.** 41: 119-128.
- Ianovici, N., M. Dumbrava, M. Filimon y A. Sinitean (2011): A comparative aeromycological study of the incidence of allergenic spores in outdoor environment, Timisoara. **Analele Universitații din Oradea - Fascicula Biologie.** 88-98 pp.

- Iglesias, D. R. (2012): Actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a hongos fitopatógenos de *Lycopersicum esculentum* Mill. **[Tesis de diploma]**. Santa Clara: Universidad Central “Marta Abreu de Las Villas”.
- Inderbitzin, P., Y. Mehta y M. Berbee (2009): *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade. **Mycologia**. 101: 329–339.
- Javed, S., A. Shahid, M Saleem, A. Umeera, R. Ahmad y S. Mushtaq (2012): Nutritional, phytochemical potential and pharmacological evaluation of *Nigella Sativa* (Kalonji) and *Trachyspermum Ammi* (Ajwain). **J. Med. Plants Res.** 6: 768-775.
- Johann, S., V. Lopes de Oliveira, M. Pizzolatti, J. Schripsema, R. Braz, A. Branco y A. Smânia (2007): Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 102: 681-685.
- Joji, L. R., R. Devi, B. Jose y S. Gopu (2012): Evaluation of Antibacterial & Antioxidant Activities of The Leaf Essential Oil & Leaf Extracts of *Citrus Aurantifolia*. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**. 2: 346-354.
- Karimi, E. H, Z. Jaafar y S. Ahmad (2011): Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of Leaf, Stem and Root from Different Varieties of *Labisa pumila* Benth. **Mol**. 16: 4438-4450.
- Keskin-Šašić, I., A. Topčagić, L. Klepo, Mb. Salihović, J. Toromanović, A. Ajanović y E. Velispahić (2012): Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Fruit Juices. **Glasnik hemicara i tehnologa Bosne i Hercegovine**. 39: 25-28.
- Khalil, A. B., B. Dabaneh y G. Anfoka (2005): Antifungal activity of medicinal plants from Jordan enviroment, Jordan. **Plant Pathol. J.** 4: 130-132.
- Khallil, A. R. (2001): Phyt fungitoxic Properties in the Aqueous Extracts of Some Plants. **Pak J. Biol Sci.** 4: 392-394.
- Klančnik, A., S. Piskernik, B. Jeršek y S. Smole (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **J. Microbiol. Methods**. 81: 121-126.
- Kostova, I. (2005): Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. **Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents**. 5: 29-46.
- Krishna, K. P. y B. McSpadden (2006): Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**. 1-25.
- Kumar, S. B. (2012): Evaluation of Plant Extracts as Antifungal Agents Against *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., Haryana. **World J. Agric. Sci.** 8: 385-388.

- Kumaresan, K., M. Subramanian, S. Vaithiyathan, N. Sevagaperumal, C. Gopal y G. Dilantha (2005): Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. 38: 69-76.
- Kurze, S., H. Bahl, R. Dahl y G. Berg (2001): Biological control of fungal Strawberry diseases. **Plant Disease**, 85: 529-534.
- Landero, N. V., D. Nieto, D. Téliz, R. Alatorre, M. Orozco, C. Ortiz (2013): Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. **Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.** 4: 47-62.
- Larrea, J. P. (2012): Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimenticio. **[Tesis de maestría]**. Universidad Pública de Navarra.
- Lattanzio, V., V. Lattanzio y A. Cardinali (2006): Role of phenolics in the resistance mechanisms of plant against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry**. 1: 23-67.
- Leiva, M., N. Veitía y Y. Alvarado (2006): Protocolo para la diferenciación de genotipos de papa mediante la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solana* Sor. en cantero y campo. **Biotecnología Vegetal**. 6: 45 – 49.
- Li, B. B., B. Smith y Md. M. Hossain (2006): Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. **Separation and Purification Technology**. 48: 182–188.
- Macua, I. J., I. Lahoz, S. Calvillo y J. M. Bozal (2012): Variedades de tomate para industria. **INTIA: Cultivos Hortícolas**. 19-30.
- Mahlo, S.M., L. McGaw y J. Eloff (2010): Antifungal activity of leaf extracts from South African trees. **Crop Prot.** 29: 1529-1533.
- Manejo de Enfermedades (<http://www.adama.com>).
- Marwah, R.G., M. Fatope1, M. Deadman, J. Ochei y S. Al-Saidi (2007): Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus*, Muscat, Sultanate of Oman. **Journal of Applied Microbiology**. 103: 1220–1226.
- Mayea, S., L. Herrera y C. M. Andreu (1983): **Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba**. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, 238-273 pp.
- Mehta, R. Y., A. Mehta y Y. Rosato (2002): ERIC and REP-PCR Banding Patterns and Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer of rDNA of *Stemphylium solani* Isolates from Cotton. **Current Microbiology**. 44: 323–328.

- Mert-Turk, F. (2006): Saponins versus plant fungal pathogens. **Journal of Cell and molecular Biology**. 5: 13-17.
- Minz, S., C. Samuel y S. Tripathi (2012): The Effect of Plant Extracts on the Growth of Wilt Causing Fungi *Fusarium oxysporum*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**. 4: 13-16.
- Mishra, A. K., A. Mishra, H. Kehri, B. Sharma y A. Pandey (2009): Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds, India. **BioMed Central**. 8: 1-7.
- Mosquera, D. M., M. Carrillo, R. Gutiérrez, R. Diaz, M. Hernández, J. Fernández (2013): Microwave technology applied to natural ingredient extraction from Amazonian fruits. **Foods**. 1: 1-8.
- Moya, C., Álvarez, M., Plana, D. Florido, M. y C. Lawrence (2005): Evaluación y selección de nuevas líneas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) con altos rendimientos y frutos de alta calidad, **Cultivos Tropicales**. 26: 39-43.
- Mujica, M.V., M. Granito y N. Soto (2009): Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L. **Interciencia**. 34: 650-654.
- Ngurah, D. S. y K. Khalimi (2009): Efficacy of plant extract formulations to suppress stem rot disease on vanilla seedlings. **J. ISSAAS**. 15: 34-41.
- Ochoa, M.J. y M. Carravedo (1990): **Catálogo de Semillas de Tomates Autóctonos**. Editorial Diputación General de Aragón, Departamento de Agricultura y Medio Ambiente, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Dirección General de Tecnología Agraria, Zaragoza, España, 108pp.
- Ojala, T., S. Remes, P. Haansuu, H. Vuorela, R. Hiltunena, K. Haahtela y P. Vuorela (2000): Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **J. Ethnopharmacol**. 73: 299-305.
- Okwu, D. E., A. Awurum y J. Okoronkwo (2007): Phytochemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of extract from citrus plant against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*). **African Crop Science Conference Proceedings**. 8: 1755-1758.
- Onaran, A. y M. Yılar (2012): Antifungal activity of *Trachystemon orientalis* L. aqueous extracts against plant pathogens. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. 10: 287-291.
- Panda, S. K., S. Brahma y S. Dutta (2010): Selective antifungal action of crude extracts of *Cassia fistula* L.: A preliminary study on *Candida* and *Aspergillus* species. **Mal. J. Microbiol**. 6: 62-68.

- Pérez, V. C., L. Cervantes, M. Gutiérrez y C. Del-Toro-Sánchez (2013): Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. **Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud**. 15: 18-22.
- Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar y S. Ignacimuthu (2010): *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6: 1-8.
- Pupo Y. B., Herrera L., Vargas B., Y. Marrero, R. Arévalo y C. Jiménez (2009): Efecto del extracto crudo de hojas de *Tagetes erecta* L. en el control de cuatro hongos patógenos de hortalizas en condiciones “*in vitro*”. **Centro Agrícola**. 36: 77-81.
- Pupo, Y (2008): Selección en condiciones *in Vitro* de extractos vegetales promisorios para el control de *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout y *Alternaria porri* Ell. y Cif. **[Tesis maestría]**. Bayamo: Universidad de Granma.
- Qin, B., J. Eagles, F. Mellon, P. Mylona, L. Peña, A. Osbourn (2010): High throughput screening of mutants of oat that are defective in triterpene synthesis. **Phytochemistry**. 71: 1245–1252.
- Ramírez, Y. P. (2013): Actividad antifúngica *in vivo* de extractos de *Citrus reticulata* Blanco y *Citrus aurantiifolia* (Christm.)Swingle frente a *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous. **[Tesis de diploma]**. Santa Clara: Universidad Central “Marta Abreu de Las Villas”.
- Razzaghi, M. A., A. Allameh, T. Al-Tiraihi y M. Shams (2005): Studies on the Mode of Action of Neem (*Azadirachta indica*) Leaf and Seed Extracts on Morphology and Aflatoxin Production Ability of *Aspergillus parasiticus*. **Proc. WOCMAP III**. 123-127.
- Rey, M. A. (2008): Comparación de las características operativas de la prueba E-Test con la prueba Dilución en Agar para determinar susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. Revisión Sistemática. **[Tesis de diploma]**. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ribera, A. (2007): Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de las especies Quillaja saponaria Mol. Cultivada *in vitro* en *Botrytis cinerea* Pers. **[Tesis doctoral]**. Temuco: Universidad de la frontera.
- Riffel, A., L. F. Medina, V. Stefani, R. Santos, D. Bizani y A. Brandelli (2002): *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35: 8-11.
- Robles, A. C. (2011): Evaluación de microorganismos antagonistas y sustancias naturales en el control de enfermedades foliares en tomate. **[Tesis maestría]**. Santa Clara: Universidad Central “Marta Abreu de Las Villas”.

- Rodríguez, A. T., D. Morales y M. Ramírez (2000): Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos, La Habana, Cuba. **Cultivos Tropicales**. 21: 79-82.
- Rondón, O., N. Sanabrá y A. Rondón (2006): Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. **Agronomía Trop**. 56: 219-235.
- Rongai, D., F. Milano y E. Sciò (2012): Inhibitory Effect of Plant Extracts on Conidial Germination of the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. **American Journal of Plant Sciences**. 3: 1693-1698.
- Runyoro, D. K., M. Matee, O. Ngassapa, C. Joseph y Z. Mbwambo (2006): Screening of Tanzanian medicinal plants for anticandidal activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6: 1-10.
- Saeed M. A., A. Hussain, T. Abbas y R. Karim (2012): Assessment of production practices of small scale farm holders of tomato in Bagrote Valley, CKNP region of Gilgit-Baltistan, Gilgit-Baltistan. **Acta agriculturae Slovenica**. 99: 191-199.
- Safaie, N., M. Amini, M. Salmani y M. Shams (2012): Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. **Trakia Journal of Sciences**. 10: 1-8.
- Sambath. K.R., S. Thangavel, S. Rajagopal, S. Palanavel, N. Ramalingam, G. Malaya y K. Upal (2006): Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Careya arborea* Roxb. Stem Bark. **Journal of Pharmacology & Therapeutics**. 5: 35-41.
- Santacoloma, L. V. y J. Granados (2012): Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. **UNAD**. 53-62.
- Sarita, V (1993): Cultivo de tomate de mesa. **Boletín Técnico No.19**. Fundación de Desarrollo Agropecuario.
- Sati, S. C. y S. Joshi (2011) Aspects of antifungal potencial of Ethnobotanically known medicinal plant. **Research Journal of Medical Plant**.
- Schwartz, H. F. y D. Gent (2007): Eggplant, Pepper, and Tomato Gray Leaf Spot. **High Plains IPM Guide a cooperative effort of the University of Wyoming, University of Nebraska, Colorado State and University and Montana State University**.
- Sen, A. y A. Batra (2012): Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extractsvof medicinal plant: *Melia azedarach* L. **Int J Curr Pharm Res**. 4: 67-73.

- Sharma, N. y A. Tripathi (2006): Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**. 163: 337-344.
- Shrivastava A., G. Rizvi y M. Singh (2011): Antifungal activity of some wild medicinal Plants against growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Zingiber officinales* Rosc., India. **IJPI's Journal of Pharmacognosy and Herbal Formulations**. : 25-27.
- Simmons, E. G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. **Micología**. 59: 67-92.
- Singh, S., R. Srivastava, y S. Choudhary (2010): Antifungal and HPLC analysis of the crude extracts of *Acorus calamus*, *Tinospora cordifolia* and *Celestrus paniculatus*. **Journal of Agricultural Technology**. 6: 149-158.
- Siripornvisal, S., W. Rungprom y S. Sawatdikarn (2009): Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). **Asian Journal of Food and Agro-Industry**. 230-233.
- Soylu, E. M., H. Yigitbas, F. Tok, S. Soyly, S. Kurt, O. Baysal y A. Kaya (2005): Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**. 112: 229–239.
- Spooner, D. M., I. Peralta y S. Knapp (2005): Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**. 54: 43-61.
- Subudhi, E., S. Ghosh y S. Nayak (2008): Atimicrobial assay of *Stevia rabaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens, Bhubaneswar. **International Journal of Integrative Biology**. 2: 27-31.
- Sumthong, P., R. Romero y R. Verpoorte (2000): Solation and elucidation of quinones in *Tectona grandis*. **Division of Pharmacognosy**, Section of Metabolomics, Institute of Biology, Leiden University.
- Tapia, B. C. (2013): La industria de la pasta de tomate. **ODEPA Ministerio de Agricultura**. 1-8.
- Tapwal, A. N., S. Garg, N. Gautam y R. Kumar (2011): *In Vitro* Antifungal Potency of Plant Extracts Against Five Phytopathogens. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 54: 1093-1098.
- Tello, J. C. y A. Lacasa (1988): La podredumbre del cuello y de la raíz, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. **Bol. Sam. Veg. Plagas**. 14: 307-312.

- Ting, W., Ch. Zhi, M. Azam, M. Qing y H. Ling (2011): The inhibitive effects of garlic bulb crude extract on *Fulvia fulva* of tomato. **Pak. J. Bot.** 43: 2575-2580.
- Toledo, M. A., E. Tamayo, S. Espinosa, J. Diéguez y P. Verdecia (2012): Evaluación y selección de variedades de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) en dos localidades de la provincia Granma. **Revista Granma Ciencia.** 16: 1-10.
- Torres, A. P. y J. Guinand (2013): Efecto de la ingesta de dietas con tomate (*Lycopersicum esculentum*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn) en los lípidos sanguíneos de ratas, Caracas-Venezuela. **Rev Chil Nutr.** 40: 376-382.
- Touré, A., C. Bahi, I. Bagré, J. N'Guessan, A. Djaman y A. Coulibaly (2010): *In vitro* Antifungal Activity of the Soap Formulation of the Hexane Leaf Extract of *Morinda morindoides* (*Morinda*; *Rubiaceae*). **Trop. J. Pharm. Res.** 9: 237-241.
- Trenholme, G. M., R. Kaplan, P. Karakusis, T. Stine, J. Fuhrer, W. Landau y S. Levin (1989): Clinical Impact of Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacterial Blood Culture Isolates. **J. Clin. Microbiol.** 27: 1342-1345.
- Tuberoso, C.I., P. Montorob, S. Piacenteb, G. Coronac, M. Deianac, M.A. Dessìc, C. Pizzab.y P. Cabrasa (2009): Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 50: 440-448.
- Vasudeva, N. y T. Sharma (2012): Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Citrus limettioides* Tanaka. **Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research.** 1-7.
- Vázquez, L.L., E. Fernández, J. Lauzardo, T. García, J. Alfonso y R. Ramírez (2005): Manejo agroecológico de plagas en fincas de la agricultura urbana. **Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.** Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana.
- Veitía, V., Y. Alvarado, L. García, I. Bermúdez, M. Leiva (2008): Aplicación de la selección *in vitro* en el mejoramiento genético de la papa para la resistencia al Tizón temprano. **Biotecnología Vegetal.** 8: 3-14.
- Veldhuizen, E. J., L. Van Bokhoven, C. Zweijtzer, S. Burt y H. Haagsman (2006): Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. **J. Agric. Food Chem.** 54: 1874-1879.
- Verma, R. K., L. Chaurasia y M. Kumar (2011): Antifungal activity of essential oils against selected building fungi. **Indian J. Nat. Prod. Resour.** 2: 448-451.

- Viuda-Martos, M., Y. Ruiz, J. Fernández y J. Pérez (2008): Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**. 19: 1130-1138.
- Wang, S.Y., P. Chen y S. Chang (2005): Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresour. Technol.** 96: 813–818.
- Weber, G. F., S. Hawkins y D. Kelbert (1932): Gray leafspot a new disease of tomatoes, Florida. Estados Unidos. Technical Bulletin 249. **Bulletins will be sent free upon application to the Agricultural Experiment Station Gainesville, Florida.** Universidad de Florida.
- Wilson, C. L., J. Solar, A. Ghaouth, y M. Wisniewski (1997): Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**. 81: 204-210.
- Yanar, Y., A. Gökce, I. Kadioglu, H. Cam y M. Whalon (2011): *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 8291-8295.
- Ya-Qin, M., Ch. Jian-Chu, L. Dong-Hong, Y. Xing-Qian (2009): Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**. 16: 57–62.

Anexos

Anexo 1: Compuestos químicos y R_f identificados en extractos de hojas de *C. aurantium* var. *sinensis*, *C. aurantium*, *C. latifolia*, *C. aurantifolia* y *C. reticulata* en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-ac) con actividad antifúngica frente a *S. solani*.

Extracto	Sistema de fase móvil	R_f del compuesto	Compuesto identificado	Actividad antifúngica		
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -et	BAW	0,14-0,39	Saponinas	+		
		0,9-1	Flavo 3,5 metoxilado y cumarinas	+		
		0,3-0,7 0,68-0,1		+		
	APA	0,44-0,53 0,66-0,75	Antraquinonas	+		
				+		
		AMA	0,13-0,3 0,31-0,47 0,6-0,7	Antraquinonas	+	
					+	
	<i>C. aurantium</i> -et	BAW	0,14-0,21 0,21-0,32 0,61-0,75 0,85-0,93 0,93-1	Saponinas	+	
					+	
					+	
				+		
				+		
APA		0,16-0,25 0,28-0,44 0,47-0,53	Antraquinonas	+		
				+		
				+		
AMA		0,07-0,47 0,5-0,6 0,6-0,7 0,87-0,9	Antraquinonas	+		
				+		
<i>C. latifolia</i> -et	BAW	0,18-0,57 0,64-0,82 0,89-0,96 1	Saponinas	+		
				+		
				+		
				+		
	APA	0,16-0,19 0,38-0,44 0,78-0,88 0,91-0,94		+		
				+		
		AMA	0,1-0,13 0,13-0,27 0,31-0,47 0,53-0,67 0,9-0,93		+	
					+	
		<i>C. aurantifolia</i> -et	BAW	0,11-0,36 0,43-0,57 0,64-0,86 0,89-0,96 1	Antraquinonas	+
						+
				+		
				+		
				+		
APA	0,13-0,16 0,16-0,25 0,31-0,38 0,47-0,53			+		
				+		
				+		
				+		
				+		

Extracto	Sistema de fase móvil	R _f del compuesto	Compuesto identificado	Actividad antifúngica
		0,56-0,88		+
		0,91-0,97		+
<i>C. aurantifolia</i> -et	AMA	0,07-0,13		+
		0,13-0,17		+
		0,27-0,33		+
<i>C. aurantifolia</i> -et		0,47-0,53		+
<i>C. reticulata</i> -et	BAW	0,87-0,93		+
		0,11-0,36	Saponinas	+
		0,43-0,54		+
		0,57-0,64		+
		0,71-0,82		+
		0,86-1	Flavo 3,5 metoxilado y cumarinas	+
		1-1,4		+
	APA	0,09-0,47	Antraquinonas	+
		0,56-0,69		+
	AMA	0,1-0,27	Antraquinonas	+
		0,27-0,4		+
		0,47-0,53		+
		0,60-0,67		+
		0,73-0,83		+
		0,87-0,93		+
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -met	BAW	0,14-0,32	Saponinas	+
		0,42-0,46		+
		0,5-0,68		+
		0,71-1	Flavo 3,5 metoxilado y cumarinas	+
	APA	0,13-0,5	Antraquinonas	+
		0,72-0,97		+
		0,38-0,56		+
		0,63-0,69		+
		0,75-0,81		+
		0,84-0,91		+
	AMA	0,13-0,27		+
		0,27-0,43		+
		0,5-0,53		+
		0,53-0,73		+
<i>C. aurantium</i> -met	BAW	0,07-0,89	Saponinas	+
	APA	0,38-0,56		+
		0,63-0,69		+
		0,75-0,81		+
		0,84-0,91		+
	AMA	0,07-0,67		+
		0,73-0,87	Antraquinonas	+
<i>C. latifolia</i> -met	BAW	0,07-0,18		+
		0,21-0,25		+
		0,36-0,43		+
		0,64-0,82		+
	APA	0,16-0,25	Antraquinonas	+
		0,28-0,34		+
		0,88-0,91		+
	AMA	0,13-0,2		+
		0,27-0,33		+
		0,53-0,60		+
		0,73-0,87		+
<i>C. aurantifolia</i> -met	BAW	0,07-0,39	Saponinas	+
		0,43-0,46		+

Extracto	Sistema de fase móvil	R _f del compuesto	Compuesto identificado	Actividad antifúngica
		0,5-0,57		+
		0,68-0,71		+
<i>C. aurantifolia</i> -met		0,75-0,86		+
	APA	0,93-1	Saponinas	+
		0,25-0,38	Antraquinonas	+
<i>C. aurantifolia</i> -met		0,31-0,44		+
		0,44-0,5		+
		0,84		+
	AMA	0,13-0,23		+
		0,27-0,33		+
		0,47-0,53		+
		0,57-0,67		+
		0,73-0,8		+
		0,87-0,93	Antraquinonas	+
<i>C. reticulata</i> -met	BAW	0,07-0,29	Saponinas	+
		0,57-0,75		+
		0,79-0,93	Flavo 3,5 metoxilado y cumarinas	+
	APA	0,13-0,44	Antraquinonas	+
		0,5-0,3		+
		0,69-0,81		+
		0,94		+
	AMA	0,1-0,23		+
		0,27-0,47		+
		0,5-0,67		+
		0,73-0,8		+
<i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i> -ac	BAW	0,21-0,5		+
		0,57-0,64		+
		0,93-0,96		+
	APA	0,06-0,28	Antraquinonas	+
		0,31-0,38		+
		0,44-0,53		+
		0,56-0,69		+
		0,84-0,94		+
	AMA	0,07-0,31	Antraquinonas	+
		0,37-0,67		+
		0,73-0,93		+
<i>C. aurantium</i> -ac	BAW	0,14-0,25		+
		0,29-0,46		+
		0,54-0,68		+
		0,76-0,89		+
	APA	0,13-0,5	Antraquinonas	+
		0,59-0,69		+
	AMA	0,13-0,31		+
		0,31-0,47		+
		0,47-0,67		+
		0,73-0,87	Antraquinonas	+
<i>C. latifolia</i> -ac	BAW	0,18-0,25	Antraquinonas	+
		0,39-0,43		+
		0,82-0,86		+
	APA	0,09-0,19		+
		0,19-0,28		+
		0,38-0,44		+
		0,5-0,56		+
		0,62-0,75		+
		0,88-0,94		+
	AMA	0,13-0,23		+

Extracto	Sistema de fase móvil	R _f del compuesto	Compuesto identificado	Actividad antifúngica	
		0,24-0,4		+	
		0,47- 0,77		+	
<i>C. latifolia-ac</i>	BAW	0,87-0,93	Antraquinonas	+	
<i>C. aurantifolia-ac</i>		0,11-0,18	Antraquinonas	+	
		0,21-0,29	Antraquinonas	+	
<i>C. aurantifolia-ac</i>	APA	0,43-0,54		+	
		0,71-0,86		+	
		0,89-0,93		+	
		0,09-0,13		+	
		0,25-0,44	Antraquinonas	+	
		0,5-0,56		+	
	AMA	0,63-0,66		+	
		0,13-0,23		+	
		0,24-0,4		+	
	BAW	0,47- 0,77		+	
<i>C. reticulata-ac</i>			0,87-0,93	Antraquinonas	+
			0,07-0,18		+
			0,22-0,31	Antraquinonas	+
			0,63-0,72		+
		0,88-0,94		+	
	AMA	0,07-0,4		+	
		0,4-0,73		+	
		0,87-0,93		+	