

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Departamento de Biología.



TESIS DE DIPLOMA

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos
hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.
frente a hongos fitopatógenos de
Lycopersicum esculentum Mill.

Autor: Dianella Iglesias Rodríguez.

Tutor: MSc. Katia Ojito Ramos.

Santa Clara
2012

Resumen

Lycopersicum esculentum Mill. (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753)] (tomate) es una hortaliza altamente demandada a escala mundial por su alto contenido de vitaminas y minerales. Las enfermedades producidas por *Passalora fulva* y *Alternaria solani* constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo del tomate, cuyo control es básicamente mediante el uso de fungicidas sintéticos. La necesidad actual de agroquímicos ambientalmente seguros y más específicos en su actividad así como el desarrollo de una cultura agroecológica, ha motivado el avance de investigaciones orientadas a proporcionar estrategias de control, entre las cuales se encuentra el uso de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas. El género *Citrus* constituye una importante fuente de metabolitos secundarios entre los que se destacan compuestos fenólicos, con acentuada actividad antifúngica. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos alcohólicos de hojas de cinco especies de cítricos naturalizados en Cuba frente a *P. fulva* y *A. solani*. Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido, se caracterizaron fitoquímicamente y se cuantificó el contenido de fenoles totales. Para cada extracto se determinó la concentración mínima inhibitoria, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y la fracción química que inhibía el desarrollo de ambos hongos, además se determinó el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *P. fulva*. En todos los extractos se identificó la presencia de saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, aminas, quinonas, alcaloides y flavonoides y se cuantificaron concentraciones de fenoles totales superiores a 165 mg/mL de extracto. El extracto de *Citrus aurantiifolia* en metanol mostró la menor concentración mínima inhibitoria frente a *P. fulva* y frente a *A. solani* fueron los extractos de *C. aurantiifolia* y *C. reticulata* en etanol. Todos los extractos mostraron capacidad de inhibir el crecimiento micelial y la germinación de los conidios, siendo el extracto de *C. aurantiifolia* el más efectivo frente *P. fulva* y el de *C. latifolia* frente a *A. solani* (>95%). Las quinonas fueron los compuestos con mayor actividad frente a *P. fulva* y los flavonoles 3-glicosilados y flavonas frente a *A. solani*. El presente estudio demostró la potencialidad del uso de extractos de hojas de *Citrus* spp. para el control agroecológico de estos patógenos.

Palabras clave: actividad antifúngica, *Alternaria solani*, extractos vegetales, *Passalora fulva*.

Abstract

Lycopersicum esculentum Mill. (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753).] (tomato) it is a highly demanded vegetable worldwide scale for its high content of vitamins and minerals. The diseases produced by *Passalora fulva* and *Alternaria solani* are one of the main phytosanitary problems that affect the production of tomato, whose control is basically by the use of the synthetic fungicides. The growing demand for environmentally safe agricultural chemicals generated by alternative agricultural systems that promote sustainable and healthy production of food has stimulated the development of researches to provide control strategies, among them it is the use of plants as a source secondary metabolites with antifungal properties. The *Citrus* genus is considered an important source of secondary metabolites like phenolic compounds, with marked antifungal activity. The objective of this work was to determine the *in vitro* antifungal activity of leaves alcoholic extracts from five citrus species naturalized in Cuba alcoholic leaf extracts against *P. fulva* and *A. solani*. The extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction, they were phytochemically characterized and its was quantified the total content of phenols. For each extract, the minimum inhibitory concentration, percentage of mycelial growth inhibition and the fraction that inhibit development of these fungus; furthermore percentage conidia germination inhibition of *P. fulva* were determined. Into every extracts was identified the presence of saponines, phenols, tannins, aminoacids, amines, quinones and flavonoids and the concentrations of total phenols higher than 165 mg/ ml of extract were quantified. The in methanol extract from *Citrus aurantiifolia* showed the smaller minimum inhibitory concentration against *P. fulva* and against *A. solani* were *C. aurantiifolia* y *C. reticulata* in ethanol extract. In addition, every extract showed the capacity to inhibit the mycelial growth and conidia germination, being the extract of *C. aurantiifolia* the most effective against *P. fulva* and *C. latifolia* against *A. solani* (>95%). The quinones were the compounds with better activity against *P. fulva* and the flavonols 3-glyosides and the flavone were the compounds with better activity against *A. solani*. The actual study demonstrated the potentiality of the use of *Citrus* spp. leaves extracts for agro-ecological control of both *P. fulva* and *A. solani*.

Keywords: *Alternaria solani*, antifungal activity, *Passalora fulva*, plant extracts.

Índice

1. Introducción.....	7
2. Revisión Bibliográfica.....	10
2.1. Hongos como agentes causales de enfermedades en el tomate.....	10
2.1.1. <i>Passalora fulva</i>	13
Descripción morfológica.....	13
Mecanismos de patogenicidad y sintomatología.....	14
Estrategias de control fitosanitario.....	15
2.1.2. <i>Alternaria solani</i>	16
Descripción morfológica.....	17
Mecanismo de patogenicidad y sintomatología.....	17
Estrategias de control fitosanitario.....	18
2.2. Antecedentes del uso de extractos vegetales como productos antimicrobianos.....	19
2.2.1. Género <i>Citrus</i> como fuente de compuestos antimicrobianos.....	22
2.3. Técnicas empleadas para la determinación de la actividad antifúngica.....	24
2.3.1. Dilución en agar.....	25
Microdilución en agar.....	25
2.3.2. Difusión en agar.....	26
2.3.3. Examen bioautográfico.....	26
2.3.4. Sistemas automatizados.....	27
Colorimetría.....	27
Fotometría.....	27
Turbidimetría.....	28
3. Materiales y métodos.....	29
3.1. Obtención de extractos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	29
3.2. Caracterización de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	29
3.2.1. Caracterización fitoquímica.....	29
3.2.2. Cromatografía en placa delgada.....	29
3.2.3. Cuantificación del contenido de fenoles totales.....	30
3.3. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	30
3.3.1. Obtención de los aislados fúngicos.....	30

3.3.2. Determinación de la MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. frente a <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i>	31
3.3.3. Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	32
3.3.4. Cálculo del porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de <i>P. fulva</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	32
3.3.5. Identificación de la fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. que inhibe el crecimiento de <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i>	33
3.4. Procesamiento estadístico.....	34
4. Resultados.....	35
4.1. Obtención de extractos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	35
4.2. Caracterización de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	35
4.2.1. Caracterización fitoquímica.....	35
4.2.2. Cromatografía en placa delgada.....	36
4.2.3. Contenido de fenoles totales.....	39
4.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	40
4.3.1. Aislados fúngicos.....	40
4.3.2. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. frente a <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i>	41
4.3.3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	42
4.3.4. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de <i>P. fulva</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	46
4.3.5. Fracción química de los extractos que inhibe el crecimiento de <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i>	47
5. Discusión.....	50
5.1 Obtención de extractos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	50
5.2. Caracterización de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	51
5.2.1. Caracterización fitoquímica.....	51
5.2.2. Cromatografía en placa delgada.....	52
5.2.3. Contenido de fenoles totales.....	52
5.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	53
5.3.1. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp. frente a <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i>	53
5.3.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	55

5.3.3. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de <i>P. fulva</i> por los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus</i> spp.....	57
5.3.4. Fracción química de los extractos que inhibe el crecimiento de <i>P. fulva</i> y <i>A. solani</i>	57
6. Conclusiones.....	65
7. Recomendaciones.....	66
Bibliografía	
Anexos	

1. Introducción

El tomate es la hortaliza más cultivada en todo el mundo y la de mayor importe económico (Escalona *et al.*, 2009). Debido a su elevada demanda, el cultivo, producción y comercio de este vegetal aumenta continuamente. Su amplia aceptación y preferencia, se debe a sus cualidades gustativas, a la posibilidad de su amplio uso tanto en estado fresco como conservado, además a su alto contenido de vitaminas y minerales (Olimpia *et al.*, 2000).

La producción global de este cultivo alcanza elevados valores en zonas de climas templados, preferentemente en países del hemisferio norte, donde se localizan los principales exportadores (Umeh *et al.*, 2002). En las regiones del trópico este cultivo se ve afectado por condiciones climáticas (Florido *et al.*, 2009) y por la incidencia de plagas y enfermedades (Bernal *et al.*, 2003).

En Cuba, una alternativa para magnificar este cultivo, es el nuevo modelo de agricultura urbana, cuyo fin es el de extender los calendarios de cosecha de las hortalizas tradicionales, así como obtener producciones de hojas y frutos de buena calidad, libres de sustancias nocivas al hombre y que estén al alcance de la población (Vázquez *et al.*, 2005). No obstante, el tomate en estas condiciones es atacado por bacterias, nemátodos y hongos, siendo los hongos *Passalora fulva* Cook. y *Alternaria solani* Sor., causantes del moho foliar y el tizón temprano, respectivamente, los responsables de la pérdida de gran parte de su producción, debido a la gravedad de los síntomas foliares que provocan (Peteira *et al.*, 2002).

El control fitosanitario de estas enfermedades se realiza mayormente empleando fungicidas sintéticos como Capatafol, Silvacur, Mancozeb y Zineb (Mónaco *et al.*, 2001), que además de incrementar los costos de producción en forma significativa, causan severos problemas de contaminación ambiental, con los consecuentes daños a la salud humana. Por lo que resulta necesaria la búsqueda de alternativas menos costosas y de menor impacto ambiental, pero con efectividad, para el manejo de estas plagas.

Los extractos vegetales debido a sus propiedades antimicrobianas (Zarrin *et al.*, 2010) pueden desempeñar un rol fundamental en un sistema ecológico integrado para el control agrícola, o ser parte complementaria de la agricultura convencional, ya que las plantas constituyen una fuente potencial de productos químicos naturales, derivados del metabolismo secundario que puede ser explotada con éxito.

El género *Citrus* L. constituye una abundante fuente de metabolitos secundarios, entre los cuales se destacan los compuestos fenólicos, portadores de una amplia gama de actividades biológicas [antioxidantes (Anagnostopoulou *et al*, 2006), antimicrobianos (Tripoli *et al.*, 2007) y antiviral (Kostova, 2005)], beneficiosas para plantas y animales. Estos metabolitos, generalmente han sido extraídos a partir de la cáscara (flavelo y albedo), el hesperidio o el jugo de los frutos, siendo menos empleadas las hojas para este propósito. Los cítricos presentan una fructificación anual, sin embargo son especies perennifolias que se conservan frondosas durante todo el año, además, como parte de las estrategias de cultivo muchas veces las hojas son podadas, por lo que en esa ocasión constituyen un material de desecho que sería de gran utilidad para la obtención de un producto sustentable, con actividad antifúngica demostrada, empleando técnicas de extracción poco contaminantes para el ambiente.

Por lo anteriormente expuesto en este trabajo se trazaron como objetivos:

Objetivo general

- ✓ Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de cinco especies de cítricos naturalizados en Cuba frente a *Alternaria solani* y *Passalora fulva*.

Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar fitoquímicamente los extractos de hojas de cítricos.
- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria de extractos de hojas de cítricos frente a *P. fulva* y *A. solani*.
- ✓ Calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* y *A. solani* por los extractos de hojas de cítricos.
- ✓ Calcular el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *P. fulva* por los extractos de hojas de cítricos.
- ✓ Identificar la fracción química de los extractos de hojas de cítricos con actividad antifúngica.

2. Revisión Bibliográfica

2.1. Hongos como agentes causales de enfermedades en el tomate

El tomate, *Lycopersicum esculentum* Miller (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753)] (<http://www.ipni.org>) perteneciente a la familia Solanacea es originario de la región que comprende el Perú, Ecuador y Bolivia, en los Andes de Sudamérica (Peralta *et al.*, 2006). Su hábitat natural es una estrecha franja costera que se extiende desde el Ecuador (0° de latitud) hasta el norte de Chile (30° latitud sur) y entre el Pacífico y los Andes. Fue trasladado a América Central como maleza por los nativos y a otras regiones del mundo por los viajeros europeos (Peralta *et al.*, 2005).

El tomate es una de las hortalizas más difundida y de mayor valor económico en todo el mundo. Su cultivo se produce en diferentes zonas, con amplia variabilidad de condiciones de clima y suelo, aunque este se practica principalmente en climas secos, para consumir en forma de ensaladas o salsas (Umeh *et al.*, 2002). Su demanda aumenta continuamente y con ella su producción y comercio. El incremento anual de su producción en los últimos años se debe principalmente a un aumento en el rendimiento y no al aumento de la superficie cultivada (Cih- Azul *et al.*, 2011).

El valor nutricional de este vegetal se basa en su alto contenido de minerales como el calcio, hierro, fósforo, magnesio, potasio y sodio, vitaminas como ácido ascórbico, tiamina y riboflavina (Sarita, 1993), además de otros elementos indispensables para el desarrollo humano como licopeno y fibras vegetales (Pupo, 2010). Es considerado como un activador de las secreciones gástricas y un eficaz catalizador del proceso asimilativo. Esta especie resulta significativa para la alimentación humana, dada la posibilidad que tiene en forma de salsas, de acompañar a diversos cereales y tubérculos, que constituyen la dieta básica de varios países suramericanos (Depestre y Gómez, 1999).

La producción global de tomate para consumo fresco y procesado, se estima en 108 000 000 t, con un rendimiento promedio de 36 t/ha (Escalona *et al.*, 2009), siendo Asia el continente en el cual se produce más de la mitad del tomate del mundo (Asgedom *et al.*, 2010). Los principales productores se sitúan en el Hemisferio Norte, el cual genera prácticamente el 90% de la oferta mundial, donde se destacan países como China, Estados Unidos, Turquía, Italia, Egipto e India, los cuales conjuntamente han producido durante los últimos 10 años el 70% de la producción a escala global. En el caso del Hemisferio Sur, Brasil y Chile son los productores más importantes representando el 6,5%

y en Centroamérica el mayor productor es Guatemala, seguido por Honduras y Costa Rica (Escalona *et al.*, 2009).

Las exportaciones de esta hortaliza se han acrecentado con el decursar de los años. En el período comprendido entre 2002-2006 se refleja un incremento de un 12.6%. Entre sus principales exportadores se destacan: España, México, Bélgica y Canadá. En las importaciones sobresale Estados Unidos, Reino Unido y Francia (Asgedom *et al.*, 2010).

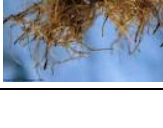
En el crecimiento económico y social de la agricultura cubana, este cultivo ocupa un sitio sobresaliente por su alto valor nutritivo así como por el hábito de su consumo (Mujica y Medina, 2008). De esta forma, el tomate se ha desarrollado en las ciudades y su periferia en los denominados “sistemas agrarios urbanos”, en los que se incluyen diferentes sistemas de cultivos como organopónicos, casas de cultivos y fincas diversificadas, siendo las provincias más productivas: Mayabeque, Artemisa, Pinar del Río y Villa Clara (Pupo, 2010).

En las últimas décadas, el cultivo de tomate, ocupa un lugar primordial en la economía cubana por constituir un renglón de interés para la industria conservera. De esta forma, se ha convertido en una de las hortalizas de mayor importancia en Cuba, con un alto volumen de producción, que alcanza las 200 000 t en una superficie de 28 000 ha. No obstante, su rendimiento promedio se encuentran entre los más bajos de Centroamérica (Pupo, 2008), debido a que este vegetal es atacado frecuentemente por patógenos que afectan gran parte de su superficie, quedando inservibles para el consumo.

El tomate es atacado frecuentemente por patógenos bacterianos, fúngicos y especies de nemátodos, siendo los hongos los que causan las enfermedades más destructivas. Estos atacan hojas, raíces y frutos, al encontrar condiciones edafoclimáticas favorables para el desarrollo de su ciclo de vida (Damicone y Brandenberger, 1993), (Tabla I).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (1993), el tomate también presenta problemas de post cosecha, ya que el fruto consta de períodos cortos de conservación y en esta etapa es afectado por microorganismos como hongos y bacterias, los cuales penetran por las heridas que se presentan a causa del proceso de maduración, desencadenado por el etileno (Gonzalez y Laguna, 2004).

Tabla I. Patologías, signos y síntomas de origen fúngico en tomate.

Patología		Agente causal	Síntomas distintivos
Marchitez		<i>Fusarium oxysporum</i> Schlee.	Clorosis en hojas inferiores y caída de peciolo en las superiores.
Tizón Temprano		<i>Alternaria solani</i> Sor.	Círculos necróticos en hojas inferiores.
Viruela		<i>Septoria lycopersici</i> Speg.	Clorosis circular con centro gris y borde negro.
Lunar gris		<i>Stemphyllium solani</i> Sacc.	Lunar gris rodeado por un aro clorótico.
Tizón tardío		<i>Phytophthora infestans</i> Mont.	Doblamiento hacia abajo del peciolo de las hojas infectadas.
Moho foliar		<i>Passalora fulva</i> Cook.	Manchas pálidas o ligeramente amarillas en el lado adaxial de las hojas.
Tizón sureño		<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	Podredumbre blanca en la base del tallo.
Antracnosis		<i>Colletotrichum phomoides</i> Sacc.	Manchas circulares, acuosas y hundidas en frutos.
Putrefacción		<i>Rhizoctonia solani</i> Khün.	Podredumbre circular oscura o clara en frutos.
Raíz corchosa		<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> Schneid y Gerlach.	Raíces carmelitas y de aspecto corchoso.

En la actualidad, un problema cardinal del cultivo de tomate en casas de cultivo protegido, son los daños provocados por *P. fulva* y *A. solani*, que en Cuba ocasionan graves pérdidas, al afectar el 30 y 20% de la producción respectivamente (Guerrero *et al.*, 2008). Estas patologías afectan gran parte de la superficie foliar, provocando una gran

desfoliación y atizonamiento del follaje, por lo cual la hoja queda inutilizada para realizar la fotosíntesis, lo que se traduce en un descenso en los rendimientos y la calidad del fruto.

2.1.1. *Passalora fulva*

El género *Passalora* fue descrito en el 2003 por Braun *et al.* Desde su aparición fue clasificado por Cooke en 1883 como *Cladosporium fulvum*, por Cif en 1954 como *Fulvia fulva* (Cook) y como *Mycovellosiella fulva* (Cook) por Arx en 1983. Su reciente disposición taxonómica en el género anamorfo *Passalora*, se debe a la filogenia de su ADN y las cicatrices distintivas de sus hifas conidiales, típicas de *Passalora*, características que lo diferencian con *Cladosporium* spp. que incluye telomorfos en *Davidiellaceae* (Thomma *et al.*, 2005).

P. fulva es un microorganismo biotrófico que crece en los espacios intercelulares de las hojas (Beltrán *et al.*, 2006), produciendo la cladosporiosis, enfermedad conocida como moho foliar en el tomate y mancha filamentosa en la pendejera (*Solanum torvum* Sw.). Es un hongo asexual, muy heterogéneo, que se encuentra agrupado en las siguientes categorías taxonómicas (Thomma *et al.*, 2005).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Capnodiales

Familia: *Mycosphaerellaceae*

Género: *Passalora*

Descripción morfológica

Las colonias de *P. fulva* sobre sustrato natural, son efusas, pilosas, velludas o flocosas, gris pardas oliváceas o negras. El micelio superficial está bien desarrollado, inmerso en el sustrato. Las hifas son septadas, ramificadas, oliváceas, pálidas, pardas o pardas oscuras, con pared celular compuesta principalmente por los polisacáridos glucano y quitina. Las células conidiogénicas son hologénicas, simpodiales o determinadas, multilocales o unilocales, integradas o discretas (<http://www.mycobank.org>).

Mecanismos de patogenicidad y sintomatología

El hongo infecta principalmente las hojas, donde se observan, por el lado adaxial, pequeñas manchas pálidas o ligeramente amarillas, las cuales, al crecer, se tornan de color café en el centro (Rivas y Thomas, 2005). Sin embargo, se pueden observar ocasionalmente afectaciones en el tallo, capullos, peciolo y frutos del cultivo (Jones *et al.*, 1997).

P. fulva posee un ciclo de vida que se caracteriza por la producción de conidióforos libres, oscuros y ramificados, con una o dos células de forma ovoide, cilíndricas o irregulares y en cadena. La enfermedad puede manifestarse en forma epifítica y después de la floración, el resto de la planta es muy susceptible al ataque de este hongo (Deacon, 2006).

Los conidios de *P. fulva* son diseminados por el aire o el agua. Al ser depositados en la parte abaxial de la hoja, germinan y forman hifas delgadas de penetración, que crecen aleatoriamente sobre la superficie. Después de tres días aproximadamente una de las ramificaciones laterales de la hifa, se introduce en la hoja del tomate hasta localizar una abertura estomática. En consecuencia, el diámetro de la hifa se puede duplicar, y crece de manera continua por la cavidad subestomática hacia el interior del espacio intercelular, entre las células del mesófilo, mediante la formación de estructuras largas y ramificadas de la hifa (Thomma *et al.*, 2005).

El crecimiento fúngico parece estar orientado hacia los tejidos vasculares, probablemente en respuesta a los gradientes de glucosa que se establecen alrededor del floema (van den Ackerveken *et al.*, 1994 y Wubben *et al.*, 1994). El taponamiento del estoma afecta severamente la respiración de la planta, provocando la marchitez de las hojas, defoliación parcial y hasta la muerte del hospedante en casos severos de la enfermedad (Jones *et al.*, 1997).

Durante estas etapas de la infección es posible observar deposiciones de calosa en las paredes de las células del mesófilo. Sin embargo, se han descrito diversos cambios ultraestructurales, como la disposición paralela del retículo endoplasmático con respecto a la membrana plasmática, donde ocurre el contacto con el hongo y la aparición de cuerpos lipídicos en el citoplasma que contienen inclusiones cristalinas (Lazarovits y Higgins, 1976). En lesiones avanzadas, las células del mesófilo muestran señales degenerativas de sus organelos (mitocondrias y cloroplastos), y en ocasiones es posible observar la

liberación del contenido citoplasmático, relacionado con el daño de la membrana citoplasmática o el tonoplasto (Thomma *et al.*, 2005).

Los síntomas iniciales de la cladosporosis se producen en la primera semana luego del inicio de la enfermedad, como manchas difusas de colores amarillentos o verde claro en la zona superior de la hoja, que posteriormente van aumentando de tamaño y tornándose distintivamente amarillas. Esta apariencia es la consecuencia de la muerte celular del parénquima de empalizada (Butler y Jones, 1949).

El mecanismo de infección de *P. fulva*, radica en la capacidad del hongo para secretar proteínas extracelulares o intracelulares que son reconocidas solo por algunas plantas (Laugé *et al.*, 1998). Se ha planteado que estas proteínas son muy importantes en el establecimiento de la enfermedad y todas han sido reconocidas por algunos genotipos de tomate a lo largo de su evolución (Thomma *et al.*, 2005).

Este patógeno se conserva viable 10 meses sobre los vegetales, le favorecen temperaturas del orden de 25 °C y humedades relativas superiores al 80% (Torres, 2008).

Estrategias de control fitosanitario

El control de esta enfermedad, se practica a través de diversos métodos como mejoras en las prácticas de cultivos, que incluyen la siembra de semillas libres del patógeno, airear al máximo los invernaderos para reducir la humedad relativa del aire y el deshojado de la base de las plantas (Castellanos *et al.*, 2005). También, se ha trabajado en la creación de variedades genéticamente resistentes y el uso de fungicidas químicos de forma preventiva y curativa, además de saneamientos. De modo similar, se ponen en práctica estrategias de control biológico basadas en procesos de micoparasitismo (Santamarina *et al.*, 2002).

Control químico

El control químico se realiza mediante la aplicación eficiente y oportuna de fungicidas, entre los que sobresalen: Clorotalonil (HELM en Argentina) cuyo principio activo es Metil-N-fenilacetil; SCORE® 250 (Syngenta S.A, Usine de Monthey, Suiza) con principio activo Difeconazol; el Capatafol (Grupo Pujol San José, Costa Rica) derivado de las Ftalimidas, Captan (FMC Corporation, Estados Unidos) con principio activo de N triclorometilo ciclohex-4 en 1,2-dicarboximida, Triadimefon (Renewable Chemicals Bangkok ,Thailand), pulverizaciones con Oxiclورو de Cobre y Mancozeb (Dow AgroSciences Colombia S.A) cuyo principio activo es zinc con etileno bis ditiocarbamato de manganeso (Alvarez y Delgadillo, 2004).

Control biológico

El control biológico se basa en el empleo de hongos antagonistas, a partir del estudio de su efectividad y de su mecanismo de acción, así como de factores esenciales para su utilización como biocontroladores y el desarrollo de una estrategia en la implantación de una agricultura sostenible. Es así como se utilizan hongos antagonistas y micoparásitos, tales como cepas fúngicas del género *Trichoderma*, lo cual constituye una alternativa que podría sustituir el control químico sintético, que además de su elevado costo económico, trae como consecuencias el desarrollo de resistencia por parte del fitopatógeno, problemas de contaminación y toxicidad (Torres, 2008).

En contraste, no existen investigaciones publicadas que demuestren el empleo por parte de los agricultores de un producto de origen vegetal en el tratamiento de esta enfermedad, alternativa que resultaría conveniente para lograr un control más específico.

2.1.2. *Alternaria solani*

Este hongo haploide fue descrito por Sorauer en 1896. Es un patógeno que ataca al tomate y a *Solanum melongena* L. produciendo la enfermedad conocida como tizón temprano, y a *Capsicum annum* L. produciendo manchas foliares. Según Lourenço *et al.*, (2009) es agrupado en las siguientes categorías taxonómicas:

Reino: *Fungi*

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales (Simmons, 2007)

Familia: *Pleosporales* (Simmons, 2007)

Género: *Alternaria*

Especie: *Alternaria solani*

Descripción morfológica

A. solani es un hongo mitospórico, lo cual indica que sus esporas son producidas solamente por división nuclear mitótica. Produce conidios en varias formas, pero nunca por división del citoplasma en el esporangio (Deacon, 2006). Presenta un micelio ramificado y septado, los conidióforos son cortos y oscuros y se pueden presentar individuales o agrupados. Los conidios son muriformes, de color marrón oscuro y presentan una prolongación filiforme, hialina, a menudo bifurcada (Pupo, 2010).

Mecanismo de patogenicidad y sintomatología

Los conidios germinan e ingresan directamente a las hojas del vegetal a través de la epidermis. La infección se inicia en las hojas del tercio inferior de la planta y ocurre a partir de los 45 días luego de iniciado el cultivo. En el campo, sin embargo, a veces se presenta solo en la etapa de senescencia (Weingartner, 1981).

Los síntomas aparecen en hojas, tallos y frutos provocando en plantas jóvenes, una pudrición del cuello y en plantas desarrolladas, las hojas afectadas aparecen con manchas circulares o angulosas de color café oscuro a negro, que pueden coalescer y dañar toda la hoja (Agrios, 2005).

Las especies de *Alternaria* son hongos foliares que causan una destrucción relativamente lenta del tejido, a través de la reducción de su potencial fotosintético que conlleva a la formación de lesiones necróticas. El hongo reside en el centro de la lesión que se rodea por un halo clorótico, un síntoma que normalmente se observa en el proceso de la infección por microorganismos necrotróficos (Thomma, 2003). Esta zona se crea por la difusión de metabolitos del hongo tales como toxinas (Agarwal *et al.*, 1997). Las alternariosis generalmente no afectan el transporte de agua o nutrientes a lo largo de la planta, porque actúa no específicamente sobre las raíces y los vasos conductores (Rotem, 1994).

Alternaria spp. puede sobrevivir como micelio o esporas en restos de plantas durante un tiempo considerable, o como una infección latente en las semillas (Rotem, 1994). Si está latente en la semilla, el hongo puede atacar la planta una vez que la semilla haya germinado. En otros casos, una vez que las esporas se producen, estas son diseminadas, principalmente por el viento, en la superficie de las plantas donde puede ocurrir la infección. Típicamente, aquellos tejidos debilitados, debido a la senescencia o heridas, son más susceptibles a la infección de *Alternaria* que los tejidos saludables (Thomma, 2003).

Las esporas de *A. solani* germinan en las hojas resistentes, resultando en la producción de un tubo germinativo el cual penetra la epidermis directamente. El hongo invade las células epidérmicas durante las etapas iniciales de la enfermedad, creciendo exclusivamente en los espacios intercelulares de manera biotrófica, lo cual sugiere que la infección por *A. solani* es asistida por la producción de la toxina hospedante no específica; ácido alternárico (Lawrence *et al.*, 1996).

Se ha descrito que las toxinas hospedante no específicas que produce *A. solani* como el ácido alternárico, zinniol, antraquinonas, solanapironas A, B y C y alternasol A son las principales responsables de la acción fitotóxica, al causar un desensamblaje del complejo de Golgi, inhibir las secreciones, la síntesis proteica e interferir con la permeabilidad de las membranas. En general, este tipo de toxinas tiene un moderado efecto fitotóxico y actúan intensificando los síntomas de la enfermedad (Thoma, 2003).

El tizón temprano reduce el área fotosintética y en casos extremos puede conducir a la total defoliación de la planta. Existen especies de papas silvestres como *Solanum chacoense* que pueden manifestar resistencia al patógeno; pero el tomate se manifiesta susceptible, no ocurriendo así con algunas especies de solanáceas silvestres como *Solanum habrochaites*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum peruvianum* y *Solanum chilense*, que han sido identificadas como valiosas fuentes de resistencia para los programas de mejoramiento genético (Leiva-Mora *et al.*, 2006).

A. solani tiene la capacidad de crecer en una amplia gama de temperaturas (4-36 °C), y puede afectar el tomate y la papa tanto bajo condiciones de humedad, como de sequía (Vloutoglou y Kalogerakis, 2000), aunque responde a las lluvias fuertes, produciendo lanzamiento de conidióforos, lo cual demuestra la importancia de esta variable ambiental, de igual forma decrece su liberación a humedades relativas de 30-50% (Gottwald *et al.*, 1997).

Estrategias de control fitosanitario

El control de esta enfermedad, se practica a través de diversos métodos culturales cuyo fundamento radica en eliminar o quemar todos los residuos de plantas infectadas, el empleo de semillas sanas y el uso de fungicidas sintéticos que está siendo sustituido por el control biológico, basado en el uso de extractos vegetales.

Control químico.

La alternariosis es controlada a través de aspersiones con fungicidas en forma preventiva, tal es el caso de Maneb (Dow AgroSciences Colombia S.A) cuyo principio activo es Sales de Zn + formaldehído, Zineb (SYNGENTA AGRO, S.A) con principio activo Zinebzetilen-bis-dico-carbamato de Zn, Captafol (Grupo Pujol San José, Costa Rica), y Daconil (SYNGENTA CROP PROTECTION S.A) con principio activo clortalonil + carbendazepina. Las aplicaciones deben iniciarse antes de la fructificación con un intervalo de siete a diez días. Otra alternativa es la rotación de cultivos por un período de tres años, lo cual reduciría la cantidad de inóculo. Resulta conveniente también eliminar los residuos de cosecha (Sarita, 1993; Álvarez y Delgadillo, 2004).

Control biológico

Como estrategia de control biológico frente a este patógeno, existen investigaciones que estudian extractos vegetales que se oponen al desarrollo de *A. solani*. Entre ellos se destacan extractos metanólicos de corteza de *Careya arborea* Roxb. (Sambath *et al.*, 2006) y aceites esenciales de *Satureja montana* L. De modo similar, se han probado extractos ricos en saponinas obtenidos a partir de mesocarpos del fruto de *Balanites aegyptiaca* L., corteza de *Quillja saponaria* L. y *Yucca schidigera* Ortgies. (Chapagain, 2007), además de extracto de corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Nees. en acetona, éter de petróleo y etanol (Mishra *et al.*, 2009) y ácidos fenólicos obtenidos a partir de *Acorus calamus* L. y *Tinospora cordifolia* Willd. Pupo *et al.*, (2011) evaluó el potencial antifúngico de extractos de once plantas naturalizadas en Cuba frente a *A.solani*, a partir de flores de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray y *Tagetes erecta* L. hojas y flores de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Lippia dulcis* Trev. y *Lantana camara* L. planta completa de *Cleome gynandra* L. y *Cleome viscosa* L. y hojas de *Coleus amboinicus* Lour, *Polyscias guilfoylei* (L.) Bailey, *Lepianthes peltata* (L.) Raf., *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt y *Tradescantia spathacea* Sw. Sin embargo, no existe un producto de origen natural que se produzca comercialmente, para tratar las afectaciones producidas por la alternariosis.

2.2. Antecedentes del uso de extractos vegetales como productos antimicrobianos

Los agroquímicos sintéticos, al ser moléculas simples, generalmente presentan el problema de ser poco específicos en su actividad, razón por la cual no discriminan entre la especie patógena que se desea eliminar u otra beneficiosa. Además, su

biodegradabilidad puede ser baja, lo que provoca contaminación ambiental alta. Sin embargo, los que se obtienen a partir de extractos naturales son siempre biodegradables y poseen una mayor especificidad, debido a que suelen poseer estructuras químicas que intervienen en procesos metabólicos más específicos, un ejemplo son los relacionados con la permeabilización de membranas celulares (Cotoras *et al.*, 2004). Es por ello que a partir de la última década del siglo XX y hasta la actualidad, se han incrementado el uso de metabolitos de origen vegetal para el control de hongos fitopatógenos como se muestra en la Tabla II (Wilson *et al.*, 1997, Doughari y Nuya, 2008 y Adewusi y Afolayan, 2009).

Tabla II. Extractos de origen vegetal empleados en el control de hongos fitopatógenos.

Extractos Vegetales	Actividad frente a:	Referencia
Aceite esencial de <i>Cymbopogon martini</i> Sta.	<i>Helminthosporium oryzae</i> Breda de Haan.	Wilson <i>et al.</i> (1997)
Aceites esenciales de <i>Satureja montana</i> L.	<i>Fusarium poae</i> Peck., <i>Fusarium equiseti</i> Sacc., <i>Fusarium graminearum</i> Sch., <i>Fusarium culmorum</i> Sacc., <i>A. solani</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Phytophthora cryptogea</i> Peth y Laff.	Fraternale <i>et al.</i> (2007)
Aceites esenciales de <i>Cymbopogon nardus</i> L.	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Helminthosporium sp.</i> y <i>Rhizopus sp.</i>	Sánchez-García <i>et al.</i> (2007)
Aceites esenciales de <i>Citrus lemon</i> L., <i>Citrus reticulata</i> , <i>Citrus paradisi</i> L. y <i>Citrus sinensis</i> .	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> y <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx.	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
Aceites esenciales de <i>Chenopodium ambrosioides</i> Han. y <i>Lavandula officinalis</i> Chaix.	<i>A. flavus</i>	Reddy <i>et al.</i> (2010)
Extractos acuosos de hojas de <i>Eucalyptus rostrata</i> Cav., hojas y frutos de <i>C. amnum</i> y el bulbo de <i>Allium cepa</i> L.	<i>A. solani</i> y <i>Saprolegnia parasitica</i> Coker.	Khallil, (2001)
Extractos acuosos de <i>Clematis gouriana</i> Roxb., <i>Evolvulus alsinoides</i> Wall., <i>Mimusops elengi</i> Bojer., <i>Parthenium hysterophorus</i> L., <i>Piper nigrum</i> Wall. y <i>Tagetes erecta</i> L.	<i>Sclerotinia graminicola</i> Sacc.	Deepak <i>et al.</i> (2007)

Tabla II. continuación.

Extractos Vegetales	Actividad frente a:	Referencia
Extractos acuosos de <i>Cymbopogon proximus</i> Stapf., <i>Laurus nobilis</i> Cav., <i>Persea americana</i> Mill. y <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	<i>Alternaria alternata</i> Fr Keissl. y <i>F. oxysporum</i> .	Fawzi et al. (2009)
Extractos acuosos de <i>Tridax procumbens</i> L.	<i>H. oryzae</i> , <i>R. solani</i> y <i>Thanatephorus cucumeris</i> Donk.	Acharya y Srivastava, (2010)
Extractos acuosos, etanólicos y en acetona de <i>Ocimum gratissimum</i> L.	<i>Aspergillus repens</i> Corda Sacc., <i>Curvularia lunata</i> Wakker. y <i>F. moniliforme</i> J. Sheld.	Amadi et al. (2010)
Extractos acuosos y metanólicos de <i>Syzygium jambolanum</i> Lam.	<i>Aspergillus flavus</i> Link. y <i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	Chandrasekaran y Venkatesalu, (2004)
Extractos acuosos, metanólicos y en éter de petróleo de <i>Deterium microcarpum</i> L.	<i>T. mentagrophytes</i> y <i>Penicillium digitatum</i> Pers Sacc.	Doughari y Nuya, (2008)
Extractos acuosos y de éter petróleo de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	<i>A. solani</i> , <i>Helminthosporium solani</i> y <i>A. niger</i>	Ghosh et al. (2008).
Extractos de diclorometano de <i>Blumea gariiepina</i> D.C.	<i>Cladosporium cucumerinum</i> Ellis y Arthur.	Abad et al. (2007)
Extractos etanólicos de <i>Ruta graveolens</i> L. y <i>Artemisia absinthium</i> L.	<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds.	Ferreira et al. (2009)
Extractos etanólicos de <i>Cassia alata</i> L.	<i>T. mentagrophyte</i>	Nantachit, (2009).
Extractos en éter de petróleo y diclorometano de <i>Nepeta cataria</i> L. y <i>Phytolacca dodecandra</i> L.	<i>A. fumigatus</i> Fresen.	Nostro et al. (2000).
Extractos metanólicos de <i>Polygonum persicaria</i> Wall., <i>Rumex hastatus</i> Link ex Meisn., <i>Rumex dentatus</i> Wall., <i>Rumex nepalensis</i> Spreng. y <i>Rheum australe</i> D. Don.	<i>F. solani</i> Mart Sacc.	Hussain et al. (2010)
Extractos de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill., <i>Eucalyptus maculata</i> Hook. y <i>Eucalyptus viminalis</i> Hook.	<i>T. mentagrophytes</i> Blanch.	Takahashi et al. (2004)

Entre los extractos vegetales más evaluados por los investigadores están los de *Allium sativum* L (ajo) que poseen actividad frente a *Botrytis cinérea* Pers (Wilson *et al.*, 1997), *Fusarium solani* Mart, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Pythium ultimum* Trow. var. *ultimum* y *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc y Magnus (Bianchi, 1997) y los de *Equisetum arvense* L. los cuales resultados efectivos en el control de hongos fitopatógenos (Stauffer *et al.*, 2000).

De modo similar han sido recomendados productos como el Triact 70%, obtenido de *Azadirachta indica* A (árbol del neem) que tiene acción fungicida contra *Alternaria*, *Phytophthora* y *Botritis* sp (Stadnick y Talamini, 2004).

La investigación sobre la actividad antimicrobiana de los componentes de las plantas, constituye en la actualidad un elemento clave para implementar una agricultura ecológica exitosa. Es por ello, que se han realizado los estudios citados con anterioridad, que emplean extractos vegetales acuosos e hidroalcohólicos para demostrar la actividad de compuestos de plantas contra agentes microbianos.

2.2.1. Género *Citrus* como fuente de compuestos antimicrobianos

El género *Citrus* pertenece a la familia *Rutaceae* que se halla representado por 160 géneros y unas 1800 especies, que se caracterizan por presentar un porte de árbol o arbusto, hojas alternas con el peciolo alado, flores hermafroditas y frutos en hesperidio (Gantner *et al.*, 2008).

En especies de esta familia como *Citrus aurantium* L. (naranja agrio), *Citrus aurantium* L. subf. *sinensis* L. M. Hiroe (naranja dulce), *Citrus reticulata* Blanco. (mandarina) y *Citrus aurantiifolia* Christm. Swingle (limón criollo) *Citrus latifolia* Tanaka ex Yu. Tanaka (lima persa), que constan de gran valor comercial, se ha comprobado la presencia de varios tipos de polifenoles y aceites aromáticos esteroideos (en cavidades lisígenas, en el parénquima y pericarpo) (Murphy, 1999) lo cual las convierte en portadoras de un amplio espectro de actividades biológicas.

Los cítricos como la mayoría de las especies vegetales sintetizan metabolitos antimicrobianos que inhiben las infecciones por hongos o bacterias, ya sea como parte de su programa normal de crecimiento y desarrollo, o en respuesta al ataque de agentes externos y otras condiciones de estrés. Muchos de estos compuestos han sido caracterizados químicamente, y su importancia, tanto en la prevención como control de enfermedades fúngicas y bacterianas, ha sido demostrada (Ribera, 2007).

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente representados en el género *Citrus*, cuya actividad antimicrobiana se debe, a la estrecha relación estructura-función que poseen. Un ejemplo lo constituye la actividad antiviral que presentan frente al agente causal de la poliomielitis, lo cual está asociado a componentes no glicosilados en su estructura y a la hidroxilación de la posición 3 del anillo fenólico (Cushnie y Lamb, 2005). El accionar de estos metabolitos como antimicrobianos, en especial de la quercetina, tiene lugar frente a bacterias como *Bacillus cereus* y *Salmonella enteritidis* (Arima et al., 2002) y en el caso de la neohesperidina contra bacterias Gram negativas. De un modo similar, las flavononas muestran actividad frente a patógenos oportunistas como *Candida albicans* Ver. y particularmente la naringina y neohesperidina contra *A. flavus* (Cushnie y Lamb, 2005). Otras flavonas aisladas de cítricos producen modificaciones en las hifas del agente fúngico *P. digitatum* (Salas et al., 2011).

La presencia de alcaloides como nitidina y glicobismina en los cítricos, son los causantes de su actividad contra *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, y *P. ovale*, agentes causales de la malaria (Schwikkard y Heerden, 2002). En *C. aurantifolia* estos compuestos presentan actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* (Ashok kumar et al., 2011) y en *C. sinensis* frente a *E. coli* y *Serratia marcescens* (Báez et al., 1999).

Los aceites esenciales de *C. aurantium* reducen la formación de anfilotoxinas en hongos como *A. flavus* (Reddy et al., 2010) y los de *C. paradisi* presentan actividad frente a *Pseudomona aeruginosa* (Báez et al., 1999). Similarmente, los aceites hallados en el epicarpo de *C. sinensis* inhiben el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* y *F. oxysporum* (Abad et al., 2007), además de poseer actividad frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* (Ashok kumar et al., 2010). Los aceites de *C. aurantifolia*, actúan frente a *Shigella flexnerii* y *Vibrio cholerae* (Rahman et al., 2011).

Los terpenos presentes en los aceites esenciales de *C. aurantiifolia*, *C. reticulata*, *C. paradisi* y *C. sinensis*, actúan frente a *A. niger*, *A. flavus* y *P. verrucosum* (Viuda-Martos et al., 2008) mientras que las coumarinas halladas en los frutos de *C. grandis* Osbeck poseen actividad antiviral frente al virus de inmunodeficiencia humana y bactericidas contra *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. enteritidis* y *E. coli* (Saif y Suganuma, 2006). Las cumarinas de *C. aurantifolia* actúan frente a *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Micrococcus aureus* (Dhanavade et al., 2011).

El ácido ascórbico de *C. paradisi* tiene un marcado efecto antifúngico contra *C. maltosa* Komag y antibacteriano en el caso de *Cryptococcus neoformans*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *B. cereus* (Akroum *et al.*, 2009).

Los carotenoides extraídos de la pulpa de los frutos maduros de *C. grandis* exhiben actividad antimicrobiana frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* Thom., *Rhizopus oryzae* y *Saccharomyce scerevisiae* (Tao *et al.*, 2010). En contraste, las saponinas encontradas en las hojas de *C. sinensis* actúan frente a *Salmonella typhi*, *Salmonella para typhi* A y *Salmonella para typhi* B, agentes causales de la fiebre tifoidea (Ashok kumar *et al.*, 2011) y los taninos y demás compuestos fenólicos de *C. aurantifolia* y *C. sinensis* son potentes bactericidas frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, y *P. aeruginosa* (Penecilla y Magno, 2011).

Las investigaciones publicadas sobre las propiedades antimicrobianas de productos naturales obtenidos a partir del género *Citrus*, se enmarcan principalmente en extractos obtenidos de frutos; dígase cáscara (flavelo y albedo) y jugo, siendo muy pocos los trabajos que avistan las propiedades de las hojas. Debido a la presencia de un considerable número de fenoles y derivados en las hojas de cítricos (Herrera, 2011), resultaría oportuno el estudio de extractos obtenidos a partir de este órgano, lo cual ofrecería la opción de no afectar la producción de los frutos. Esta alternativa basada en el empleo de las hojas, constituiría una ventaja comercial y económica para Cuba, además de minimizar los daños totales al cultivo.

2.3. Técnicas empleadas para la determinación de la actividad antifúngica

El estudio de la actividad antifúngica que porta diversos componentes resulta ineludible para tratar las micosis que afectan a plantas y animales. Con este fin se han empleado ensayos experimentales tales como: difusión y dilución en agar, exámenes bioautográficos, biluminiscencia, respirometría, microcalorimetría, y técnicas automatizadas como la colorimetría, turbidimetría, espectrofotometría y anticuerpos fluorescentes. El propósito de estos procedimientos es calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC), menor concentración capaz de inhibir visiblemente el crecimiento antimicrobiano, luego de un periodo de incubación (Touré *et al.*, 2010), la cual ofrece la posibilidad de comprobar cuan potente y efectivo es el producto en estudio.

Los resultados de la aplicación de estas técnicas no están influenciados solamente por el método seleccionado, sino también por los microorganismos y metabolitos empleados. Dichos ensayos constituyen una vía rápida, reproducible y de bajo costo para medir un variado número de extractos y fracciones, cuyos componentes antimicrobianos resultan de gran aplicación en cultivos agrícolas y hortícolas (Klančnik *et al.*, 2010).

2.3.1. Dilución en agar

El método de dilución fue descrito por Rideal y Walker en 1905 y estandarizado para evaluar crecimiento micelial de fragmentos fúngicos por Espinel-Ingroff *et al.*, (1995), permite determinar la MIC de forma visual y describir los efectos de componentes naturales o sintéticos sobre las hifas de un hongo (Benson, 1998). El mismo puede ser empleado para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antifúngico frente a un determinado cultivo. Esta metodología tiene su basamento en la preparación de placas de Petri con agar, a las cuales se les agrega el compuesto a evaluar en distintas concentraciones (Amadi *et al.*, 2010). Luego se inoculan en cada una de las placas con una suspensión del microorganismo en estudio. Las muestras se evalúan después de un período de incubación y se determina la MIC del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Adewusi y Afolayan, 2009 y Salas *et al.*, 2011).

El ensayo depende enteramente de los compuestos presentes en el medio de cultivo y de que sus concentraciones sean homogéneas. Resulta ventajoso su empleo, debido a que aporta datos acerca de la MIC (Hadacek y Greger, 2000).

Microdilución en agar

La microdilución en agar es una alternativa del método de dilución estandarizada por Wilson *et al.* (1997). Este ensayo se basa en la aplicación de un fungicida mediante diluciones seriadas a una microplaca que en cada pocillo es inoculada con el microorganismo de interés. Las muestras son evaluadas tras un periodo de incubación, empleando una solución reveladora que interviene en reacciones de oxidación-reducción. Sus ventajas radica en que se realiza un análisis rápido de la actividad de los fungicidas y se pueden evaluar gran cantidad de diluciones con empleo de poca cantidad de reactivos (Wilson *et al.*, 1997).

2.3.2. Difusión en agar

La difusión en agar es una técnica estandarizada por Bauer en 1966 (Hadacek y Greger, 2000). El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobiano en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se forma así un gradiente de concentración del antimicrobiano, y la sensibilidad del microorganismo está indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, la capacidad de difusión del antimicrobiano en ese medio, la temperatura, la velocidad de crecimiento y duplicación del microorganismo, el tamaño y fase de crecimiento del inóculo (Doughari, 2006, Sánchez-García *et al.*, 2007 y Al-Bayati, 2009).

La difusión es un método atractivo debido a su gran simplicidad y de bajo costo económico. Su desventaja radica en que es imposible medir la cantidad de antimicrobiano que difunde en el medio de agar. Esta técnica no permite discriminar qué compuestos de los aplicados al medio, es el que posee la actividad antimicrobiana y no es recomendada para evaluar microorganismos de lento crecimiento (Klančnik *et al.*, 2010).

El ensayo de difusión posee como desventaja sobre el de dilución que resulta menos económico en lo referido a tiempo y recursos. En la dilución, la concentración de los componentes del medio puede ser definida y se muestra la comparación más exacta para evaluar la MIC (Hadacek y Greger, 2000). Es más confiable la dilución que la difusión en agar, debido a que brinda la posibilidad de realizar una rápida determinación antimicrobiana. En contraste, se requiere de grandes cantidades de muestras para su aplicación (Klančnik *et al.*, 2010).

2.3.3. Examen bioautográfico

El examen bioautográfico descrito por Slusarenko en 1998 es un método muy versátil para detectar productos naturales que posean actividad antifúngica (Ahmad y Beg, 2001). El mismo consiste en la corrida cromatográfica en placa delgada (TLC) del producto a evaluar, al que posteriormente se le asperja o se le aplica una solución del microorganismo y una sustancia reveladora que indica a partir de la coloración las zonas de inhibición. Si este procedimiento se realiza en gel de poliacrilamida, permite detectar proteínas antifúngicas (Sartoratto *et al.*, 2004 y Mahlo *et al.*, 2010).

La aplicación de este ensayo resulta muy ventajosa porque se pueden separar compuestos de las mezclas con la consecuente identificación de componentes antifúngicos activos en TLC, además de que se emplean pequeñas cantidades de muestra (Runyoro *et al.*, 2006). De igual forma resulta desventajoso el hecho de que la probabilidad de descomposición de algún compuesto durante el ensayo es muy elevada, (Hadacek y Greger, 2000).

2.3.4. Sistemas automatizados

Los sistemas automatizados constituyen un conjunto de técnicas como colorimetría, turbidimetría, fluorimetría, que acortan el tiempo de medición de la actividad antifúngica en valores considerables. Son capaces de mejorar la sensibilidad analítica de los métodos, es decir, detectan el desarrollo microbiano en una suspensión, con y sin antimicrobianos, antes que la turbidez pueda ser detectada. La principal ventaja de estos sistemas es la rapidez con que los resultados están disponibles. La implementación de todo sistema automatizado confiere una mejor estandarización y reproducibilidad de los resultados. Otra ventaja significativa es que disminuyen los errores post-analíticos. El principal inconveniente de estos sistemas es el alto costo en insumos, que requieren método de respaldo si falla el equipo y en ocasiones los resultados discrepan con los métodos de referencia (García, 2002).

Colorimetría

Los ensayos colorimétricos descritos por Kongkathip *et al.* en 2003 constituyen una alternativa aceptable para determinar cuantitativamente la actividad antimicrobiana de un extracto (García, 2002). En el mismo se determinan concentraciones de microorganismos a través de la aplicación de una sustancia reveladora, que pueda ser procesada por un equipo automático. A través de esta técnica se obtienen resultados que pueden ser fácilmente comparados, pero el costo es muy elevado debido al uso de indicadores de color (Klančnik *et al.*, 2010).

Fotometría

El método fotométrico se basa en la determinación de la presencia cualitativa de un analito mediante el estudio de la dispersión que forma el disolvente. Este fue adaptado para medir actividad antifúngica por Janh *et al.* (1995). (Hadacek y Greger, 2000). En el caso particular de los antifúngicos, se realiza empleando un indicador óxido-reductor, que indica la señal fluorescente responsable de un cambio metabólico en un componente del

microorganismo analizado. La elección del método depende de la concentración de la suspensión.

Turbidimetría

La turbidimetría es un método adaptado por Janh en 1995 para medir actividad antifúngica. Cuando la concentración de partículas en suspensión se mide mediante este procedimiento, la suspensión se pone en una cubeta similar, en forma, a un tubo de ensayo que permite realizar las medidas de las energía incidentes y transmitidas. La fuente de radiación más frecuentemente usada es la lámpara de wolframio, pero pueden utilizarse otras fuentes de radiación visible. Este ensayo tiene la desventaja de que el crecimiento del cultivo fúngico puede dispersarse en muchos micelios y los componentes empleados pueden sufrir descomposición durante la lectura turbidimétrica (Hadacek y Greger, 2000)

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. Entre los ensayos de medición de la actividad antifúngica antes mencionados, sin tener en cuenta las técnicas automatizadas, el más exacto para determinar la MIC resulta el método de microdilución en agar, si bien para la determinación de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, sería más ventajoso el de dilución en agar, que aunque para su realización requiere del empleo de mayores cantidades de reactivos, brinda esta información de forma visual. El equipamiento necesario para su realización es poco costoso y resulta el más estricto para obtener un resultado cuantitativo, que permitirá conocer con exactitud la medida de la inhibición del crecimiento.

3. Materiales y Métodos

3.1. Obtención de extractos de hojas de *Citrus* spp.

La colecta de hojas de *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. reticulata*, *C. aurantiifolia* y *C. latifolia* se realizó en áreas del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, se identificaron taxonómicamente y una muestra de cada especie se depositó en el herbario de dicha institución (O. Méndez No. 9882, 9878, 9884, 9885, 9883 (ULV). El material colectado se lavó con agua destilada y se secó en una estufa a 60 °C durante 12 h. Posteriormente, se trituró en un molino de cinco pulgadas (Chrisly & Norris, Chelmesford, Reino Unido).

A 2 g del material vegetal pulverizado se le adicionó 20 mL de metanol o etanol 70% y posteriormente se sometieron a ultrasonido (Ultrasonic Cell Crusher, Scientz-III, China) durante 20 min a una temperatura de muestra de 60 °C, finalmente se filtró al vacío (Water Circulating Multi Purpose Vacuum Pump SHB-III, Liuyi, China).

3.2. Caracterización de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

3.2.1. Caracterización fitoquímica

Se realizó la caracterización fitoquímica según el método descrito por Schabra *et al.* (1984); se determinó la presencia de saponinas, fenoles, taninos, flavonoides, aminoácidos, aminos, cumarinas volátiles, alcaloides, triterpenos, esteroides y azúcares reductores. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.2. Cromatografía en placa delgada

En el análisis cromatográfico se empleó como fase estacionaria placas del sílica gel 60 F254, (Merck, Alemania) y tres sistemas de fase móvil diferentes: n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5) [BAA] para separar saponinas y compuestos fenólicos, n-propanol-acetato de etilo-agua (40:40:30) [PAA] para separar quinonas y compuestos fenólicos y acetato de etilo-metanol-agua (40:5,4:4) [AMA] para separar alcaloides y compuestos fenólicos (Mahlo *et al.*, 2010).

Se aplicaron 10 µL de los extractos crudos en forma de manchas circulares sobre uno de los extremos del cromatograma, manteniendo una distancia de 0,5 cm entre las bandas.

La detección de compuestos fenólicos y quinonas se realizó bajo luz ultravioleta 365 nm (Transilluminator, Liuyi, China). Para la detección de saponinas se empleó una solución

de vainillina 5% en ácido sulfúrico (Mahlo *et al.*, 2010) y para alcaloides el reactivo de Dragendorff (Nostro *et al.*, 2000). Las detecciones se realizaron por duplicado.

Se calculó la movilidad relativa de cada compuesto (R_f) midiendo el desplazamiento de cada mancha en el cromatograma, respecto al frente del solvente.

3.2.3. Cuantificación del contenido de fenoles totales

Se realizó según el método descrito por Tuberoso *et al.* (2009) con modificaciones. A 1 mL de extracto se le adicionaron 80 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y se dejó reposar durante 5 min. Luego, se añadieron 800 μ L de Na_2CO_3 7%, se completó hasta 2 mL con agua destilada, se agitó fuertemente y se dejó reposar durante 90 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China) a una longitud de onda de 750 nm. El contenido de fenoles totales se determinó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando ácido gálico como patrón y se expresó en mg de ácido gálico/mL de extracto. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

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

3.3.1. Obtención de los aislados fúngicos

Los aislados de *P. fulva* y *A. solani* fueron suministrados por el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba. Se transfirieron a placa de Petri (9 x 9 cm) con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), durante siete días para *A. solani* y durante 21 días para *P. fulva*.

Para comprobar el cumplimiento de los postulados de Koch, se transfirió un disco de micelio de 0,6 cm de diámetro, cultivado en PDA a medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). El inóculo crecido en constante movimiento en una Zaranda (Gerhardt, Alemania) durante 72 h, a 120 r/min y 27 °C, fue macerado en un homogenizador Ultra-Turrax T 25, (JANKE y KUNKEL, DLA-Labortechnik) y se ajustó a una concentración de 5×10^5 propágulos/mL en cámara de Newbawer.

Se inocularon los tres folíolos terminales de la cuarta y quinta hojas verdaderas de plantas de tomate, variedad Hazera, de 55 días de edad. Los folíolos se seleccionaron con características similares, se lavaron con abundante agua corriente y después con agua

estéril, se les colocó un algodón en el extremo del peciolo para evitar la desecación y se colocaron en una placa de Petri estéril.

La inoculación se realizó por la zona adaxial de las hojas con *A. solani* y abaxial con *P. fulva* empleando un pincel estéril. Los hongos se incubaron a 25 °C durante siete días con fotoperíodo natural y humedad relativa del 85%. Al séptimo día de incubación, se observaron en las hojas síntomas de las afectaciones del tizón temprano y signos provocados por el moho foliar.

Los hongos se aislaron por el método agar-agua (Myco-ual, 2004). Las hojas se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en papel de filtro estéril para eliminar el exceso de humedad. Los aislamientos se realizaron transfiriendo conidios de las manchas esporuladas con *P. fulva* o el fragmento de hoja portador de la lesión típica de *A. solani* a placas de Petri (9 x 9 cm), que contenían una mezcla de agar-agua 2% con clorafenicol 0,1 mg/L. Después de cinco días de incubación a 27 °C, se comprobó la presencia de conidios y micelio de *P. fulva* y micelio de *A. solani*. La identificación de los aislados de ambos hongos se realizó en el laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Posteriormente, los hongos fueron transferidos a medio de cultivo PDA.

3.3.2. Determinación de la MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *P. fulva* y *A. solani*

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los extractos hidroalcohólicos de cítricos se determinó empleando el método de microdilución en agar descrito por Wilson *et al.* (1997). En cada ensayo se realizaron tres repeticiones y el experimento se repitió una vez.

En una placa de 96 pocillos, se colocaron en cada pocillo 100 µL de medio de cultivo PDB. Se añadió 100 µL del extracto a una concentración de fenoles totales de 40 mg de ácido gálico/mL de extracto al primer pocillo de cada fila y a partir de éste se realizaron diluciones seriadas hasta 0,0195 mg/mL empleando 100 µL. Posteriormente, se agregó 100 µL de una suspensión de 5×10^5 propágulos/mL de *P. fulva* o *A. solani*, a cada pocillo según corresponda.

Como control positivo se empleó 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. En todos los ensayos se colocaron controles de esterilidad que contenían el medio de cultivo PDB sin el microorganismo.

Como indicador de desarrollo del hongo se añadió a cada pocillo 40 µL de una solución de p-iodonitrotetrazolio violeta (INT) a 0,2 mg/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.

Las placas se incubaron a 27 °C durante siete días con 100% de humedad relativa, en oscuridad y la MIC se definió como la menor concentración del extracto que inhibió el desarrollo del hongo.

3.3.3. Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* y *A. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Se determinó el efecto de los extractos en el crecimiento radial de micelio empleando el método de dilución en agar (Guerrero-Rodríguez, 2007). En cada ensayo se realizaron tres repeticiones y el experimento se repitió una vez.

Los extractos fueron evaluados a 20 mg de ácido gálico/mL de extracto de fenoles totales. Como control positivo se empleó el fungicida Silvacur 0,1% y como controles negativos el solvente diluido en agua a la misma proporción de dilución del extracto.

El medio de cultivo, con o sin extractos, se vertió en placas de Petri (9 x 9 cm). Después de su solidificación, en el centro de cada placa se colocó un disco de 0.6 cm de diámetro de micelio de un cultivo de siete días de *A. solani* o de 21 días de *P. fulva*. Las placas de Petri con el inóculo se incubaron a una temperatura de 27 °C durante siete y 21 días para *A. solani* y *P. fulva* respectivamente. El diámetro del micelio después de las 72 h, se midió diariamente. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial por los extractos, se calculó empleando 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%.

3.3.4. Cálculo del porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de *P. fulva* 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 (Kumaresan *et al.*, 2005). Los extractos vegetales fueron ensayados por triplicado en cada determinación, estas fueron repetidas una vez. Como control positivo se

empleó el fungicida Silvacur 0,1% y como controles negativos el solvente diluido en agua a la misma proporción de dilución del extracto y agua destilada estéril.

En el ensayo se emplearon portaobjetos excavados a los que se aplicó una gota de las suspensión conidial de *P. fulva* a una concentración de 5×10^5 conidios/mL. La suspensión se obtuvo a partir de la agitación de un disco de micelio de 0,6 cm de diámetro, en agua destilada estéril o en los extractos vegetales a una concentración de 20 mg de ácido gálico/mL de extracto de fenoles totales. Las muestras se incubaron durante 24 h a una temperatura de 27 °C. Se evaluaron al microscopio óptico tres campos por cada gota, en los que se contaron al azar 100 conidios y se determinó el número de esporas germinadas (cuando el tubo germinativo fue igual o superior en longitud al conidio). El porcentaje de inhibición de la germinación de conidios por los extractos, se calculó 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%.

3.3.5. Identificación de la fracción química de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. que inhibe el crecimiento de *P. fulva* y *A. solani*

Se determinó según el método bioautográfico descrito por Mahlo *et al.* (2010) con modificaciones.

Los cromatogramas obtenidos como se describió en el acápite 3.2.2 se dejaron secar a 25 °C durante cinco días hasta que el solvente remanente fuera eliminado. Posteriormente, se les asperjó una suspensión de *A. solani* y *P. fulva*, a una concentración de 5×10^5 propágulos/mL, obtenidos a partir de un cultivo crecido en PDB durante 72 h. Los cromatogramas se incubaron dentro de una placa de Petri en oscuridad a 27 °C y 100% de humedad relativa durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se asperjaron con una solución de 2 mg/ml de INT, y se incubaron durante 24 h en las condiciones descritas. 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.

3.4. Procesamiento estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico PASW *Statistics*, versión 18, verificándose los supuestos de normalidad Shapiro 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. Obtención de extractos de hojas de *Citrus* spp.

Se obtuvieron cinco extractos en etanol 70%: naranjo agrio (NA-et), naranjo dulce (ND-et), limón criollo (LMN-et), lima persa (LMA-et), mandarina (MAN-et) y cinco en metanol 70%: naranjo agrio (NA-met), naranjo dulce (ND-met), limón criollo (LMN-met), lima persa (LMA-met) y mandarina (MAN-met).

4.2. Caracterización de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

4.2.1. Caracterización fitoquímica

En todos los extractos obtenidos a partir de hojas de cítricos se identificaron quinonas, aminoácidos, taninos, fenoles y flavonoides, siendo los aminoácidos y aminos los de mayor presencia (Tabla III). Solo el extracto de mandarina mostró presencia de esteroides y triterpenos en ambos solventes de extracción. Las lactonas y cumarinas no se presentaron en ningún extracto etanólico, mientras que en los metanólicos, excepto en la lima persa, se encontraron en todos.

Tabla III. Compuestos químicos identificados mediante caracterización fitoquímica en extractos de hojas de naranjo agrio (NA); naranjo dulce (ND); limón criollo (LMN); mandarina (MAN) y lima persa (LMA).

Compuesto Químico	Extractos de hojas de <i>Citrus</i> spp.									
	Etanol 70%					Metanol 70%				
	NA	ND	LMN	MAN	LMA	NA	ND	LMN	MAN	LMA
Saponinas	+++	+++	++	+++	+++	-	++	++	-	+++
Taninos y fenoles	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
Aminoácidos y aminos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Lactonas y Cumarinas	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Alcaloides	+++	-	+++	+++	+++	++	-	-	-	+++
Esteroides y triterpenos	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-
Azúcares reductores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Flavonoides: Flavonas, Flavonoles, Flavanonas	+	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+++
Dihidroflavonoles	+++	+++	-	+	++	+++	+++	-	+++	+++

(+, ++, +++) Presencia relativa del compuesto químico. (-) No presencia del compuesto químico.

4.2.2. Cromatografía en placa delgada

Con el objetivo de separar los compuestos químicos detectados en el análisis fitoquímico a los extractos de hojas de cítricos, se realizó una cromatografía en placa delgada en diferentes sistemas de solventes, según el compuesto químico (Figura 1 y Tabla IV).

En los sistemas de fase móvil AMA y PAA en todos los extractos se identificaron flavonoles 3-glicosilados y flavonas (rojos), flavonoles 3,5-metoxilados y cumarinas (azul) (Figura 1A y E). Sin embargo, en el sistema BAA, estos compuestos fueron hallados solo en los extractos de LMN-et, MAN-et y LMN-met (Figura 1C). Cabe señalar, que en el análisis fitoquímico las cumarinas solamente se encontraron en los extractos de NA-met, ND-met, LMN-met y MAN-met.

La presencia de quinonas (amarillo) fue determinada en todos los extractos (Figura 1E). De modo similar, los alcaloides (rojo) fueron identificados en todos los extractos (Figura 1B), en contraste con el análisis fitoquímico donde solo se identificaron en los extractos de ND-et, ND-met, LMN-met y MAN-met.

Las saponinas (amarillo) solo se determinaron en los extractos de LMN en ambos solventes (Figura 1D), sin embargo, en la caracterización fitoquímica se encontraron en todos los extractos a excepción de NA-met y MAN-met.

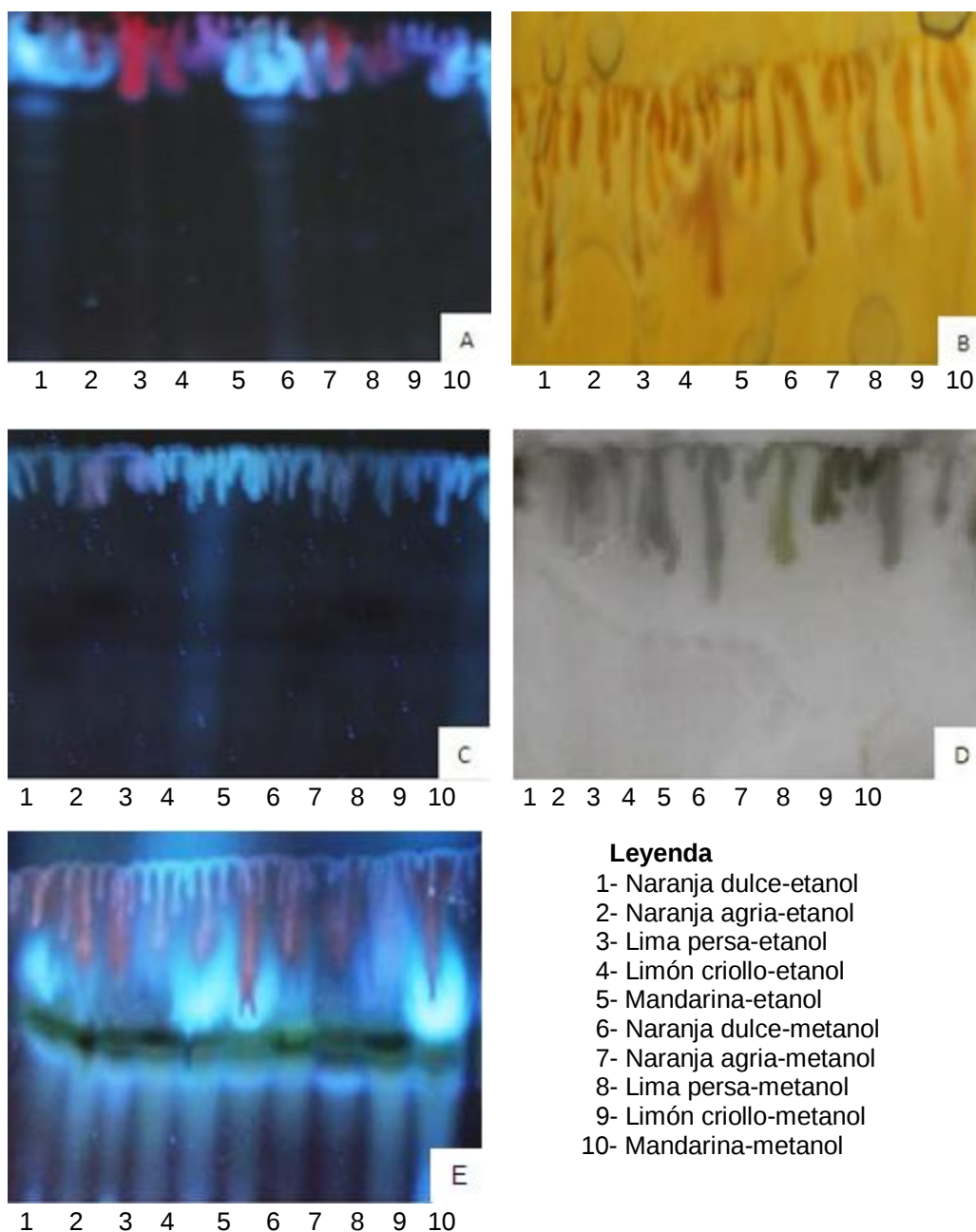


Figura 1. Identificación de compuestos químicos constituyentes de los extractos de hojas de cítricos mediante TLC desarrolladas con diferentes sistemas de solventes. (A) metanol-acetato de estilo-agua [AMA] evaluado a 365 nm. (B) AMA evaluado con tratamiento químico (Reactivo de Dragendorff). (C) butanol-acido acético-agua [BAA] evaluado a 365 nm. (D) BAA evaluado con tratamiento químico (vainillina-acido sulfúrico). (E) propanol-acetato de etilo-agua [PAA] evaluados a 365 nm.

La identificación de los compuestos químicos, así como su valor de R_f para cada extracto se muestran en la tabla IV. Los extractos de LMN en ambos solventes fueron los que mostraron más clases y variedad de compuestos químicos.

Tabla IV. Compuestos químicos identificados en extractos de hojas de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN); en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met) por cromatografía en placa delgada (sílica gel 60 F254; n-propanol-acetato de etilo-agua [PAA], metanol-acetato de etilo-agua [MAA] y n-butanol-ácido acético-agua [BAA].

Extracto	Sistema de fase móvil	R _f del compuesto	Compuesto identificado
ND-et	PAA	0,93	Flavonoles 3-glicosilados y Flavonas
		0,64-0,74	Quinonas
	AMA	0,81-0,96	Flavonoles 3,5-metoxilado y cumarina
		0,82	Alcaloides
NA-et	PAA	0,87	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,58-0,72	Quinonas
	AMA	0,95-0,98	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,82-0,88	Alcaloides
LMA-et	PAA	0,85	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,88	Alcaloides
		0,72	Quinonas
LMN-et	PAA	0,90	Flavonoles 3,5-metoxilado y cumarinas.
		0,73	Quinonas
		0,90	Flavonoides sin OH en posición 5
	AMA	0,95	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,86	Alcalóides
	BAA	0,90	Saponinas
		0,80	Flavonoles 3-glicosilados
MAN-et	PAA	0,83-0,89	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,76	Quinonas
	AMA	0,95	Flavonoles 3,5-metoxilado y cumarinas.
		0,87	Alcaloides
	BAA	0,77	Flavonoles 3,5-metoxilado y cumarinas
ND-met	PAA	0,89	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,72-0,76	Quinonas
	AMA	0,82-0,95	Flavonoles 3,5-metoxilado y cumarinas.
		0,86	Alcaloides
NA-met	PAA	0,90	Flavonoides 3,5-metoxilado y cumarinas
		0,76	Quinonas
	AMA	0,88-0,95	Flavonoles 3-glicosilados
		0,82-0,88	Alcaloides

Tabla IV. continuación

Extracto	Sistema de fase móvil	R _f del compuesto	Compuesto identificado
LMA-met	PAA	0,85	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,76	Quinonas
	AMA	0,92	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
		0,88	Alcaloides
LMN-met	PAA	0,82	Flavonoles 3,5-metoxilado y cumarinas
		0,76	Quinonas
	AMA	0,90	Flavonoides 3,5-metoxilados y cumarinas
		0,87	Alcalóides
	BAA	0,93	Saponinas
		0,75	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas
MAN-met	PAA	0,80	Flavonoides 3,5- metoxilados y cumarinas
		0,76	Quinonas
	AMA	0,92	Flavonoles 3,5-metoxilado y cumarinas.
		0,89	Alcaloides

4.2.3. Contenido de fenoles totales

En todos los extractos, se obtuvieron concentraciones de fenoles totales superiores a los 165 mg de ácido gálico/mL de extracto, como se muestra en la tabla V. El extracto que mostró la mayor concentración de fenoles totales fue el de NA-met, mientras que el de MAN-et mostró la menor concentración.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de fenoles totales según el solvente de extracción utilizado, exceptuando los extractos de ND-et y ND-met, donde el extracto metanólico mostró el mayor valor.

Tabla V. Concentración de fenoles totales en extractos de hojas de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN); en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met). Letras distintas indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

Extracto	Concentración de fenoles totales mg de ácido gálico/mL de extracto ($\bar{X} \pm SD$)
ND-et	$177,34 \pm 2,40^c$
NA-et	$304,68 \pm 18,19^a$
LMA-et	$191,14 \pm 6,24^{bc}$
LMN-et	$243,93 \pm 26,41^{ab}$
MAN-et	$165,96 \pm 10,47^c$
ND-met	$246,30 \pm 21,10^{ab}$
NA-met	$385,60 \pm 62,79^a$
LMA-met	$184,86 \pm 14,03^{bc}$
LMN-met	$185,72 \pm 13,43^{bc}$
MAN-met	$195,31 \pm 20,27^{bc}$

4.3. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *P. fulva* y *A. solani*

4.3.1. Aislados fúngicos

En las hojas de tomate inoculadas con los cultivos de ambos hongos, se observaron a los siete días los signos y síntomas típicos de sus lesiones (Figura 2). *P. fulva* en la zona abaxial de las hojas, provocó zonas cubiertas con un moho verde olivo, que luego de comenzada la esporulación se tornó carmelita. En el caso de *A. solani* por la zona adaxial, se observaron manchas circulares o angulosas de color negro, rodeadas por un halo clorótico.



Figura 2. Signos de *P. fulva* y síntomas de *A. solani* observados en las hojas de tomate a los siete días de inoculadas.

Después de la transferencia de ambos hongos a medio de cultivo PDA, *A. solani* ocupó el 75 % y *P. fulva* el 50 % de la placa de Petri (9 x 9 cm), a los siete y 21 días de incubación respectivamente, en las condiciones descritas en el acápite 3.3.1.

4.3.2. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *P. fulva* y *A. solani*

Con el objetivo de determinar la concentración de fenoles totales a la cual los extractos de hojas de cítricos inhiben la actividad de los hongos *P. fulva* y *A. solani*, se realizó un ensayo de determinación de la MIC.

Todos los extractos mostraron actividad antifúngica a concentraciones menores o iguales que 40 mg/mL de fenoles totales como se muestra en la tabla VI. El extracto de LMN-met mostró la menor MIC frente a *P. fulva*, resultando ser, en este caso, el de mayor actividad fungicida. Frente a *A. solani* los extractos con mayor actividad fungicida fueron el de LMN-et y MAN-et mostrando la menor MIC.

Tabla VI. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN); en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met) frente a *A. solani* y *P. fulva*.

Extracto/control positivo	MIC (mg de fenoles totales/mL de extracto)	
	<i>Passalora fulva</i>	<i>Alternaria solani</i>
Silvacur	< 0,04	< 0,04
ND-et	20	20
NA-et	10	20
LMA-et	40	20
LMN-et	40	5
MAN-et	20	5
ND-met	10	20
NA-met	10	20
LMA-met	20	20
LMN-met	5	20
MAN-met	10	10

Teniendo en cuenta estos resultados, se empleó para los demás ensayos de determinación de actividad antifúngica la MIC de 20 mg/mL.

4.3.3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* y *A. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Todos los extractos de hojas de cítricos afectaron significativamente la cinética de crecimiento de *P. fulva*, con excepción del extracto de MAN-et a los 21 días de incubación (Figura 3). Cuando se empleó el extracto de ND-et la cinética de crecimiento de *P. fulva* fue similar a la obtenida cuando se empleó el Silvaur.

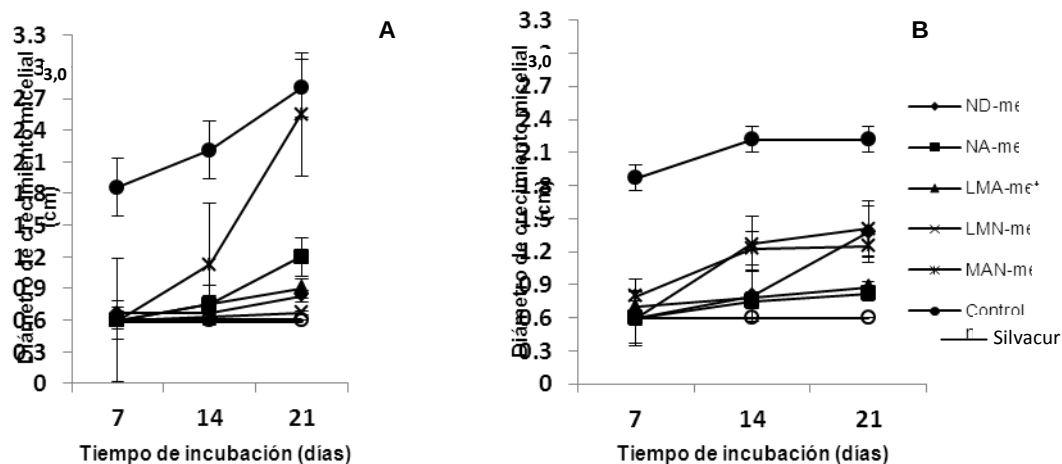


Figura 3. Cinética de crecimiento de *P. fulva* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, Agar Papa Dextrosa con Silvaur y Agar Papa Dextrosa con extractos de hojas de cítricos. (A) Naranja dulce (ND); naranja agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN) en etanol 70%; (B) Naranja dulce (ND); naranja agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN) en metanol 70%.

Los extractos evaluados, con excepción del extracto MAN-et, presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* superiores al 50%, por lo que se consideraron promisorios (Figura 4).

Los extractos NA-et, LMN-et y MAN-met mostraron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, a pesar de presentar MIC de 10, 40 y 10 mg/mL, respectivamente.

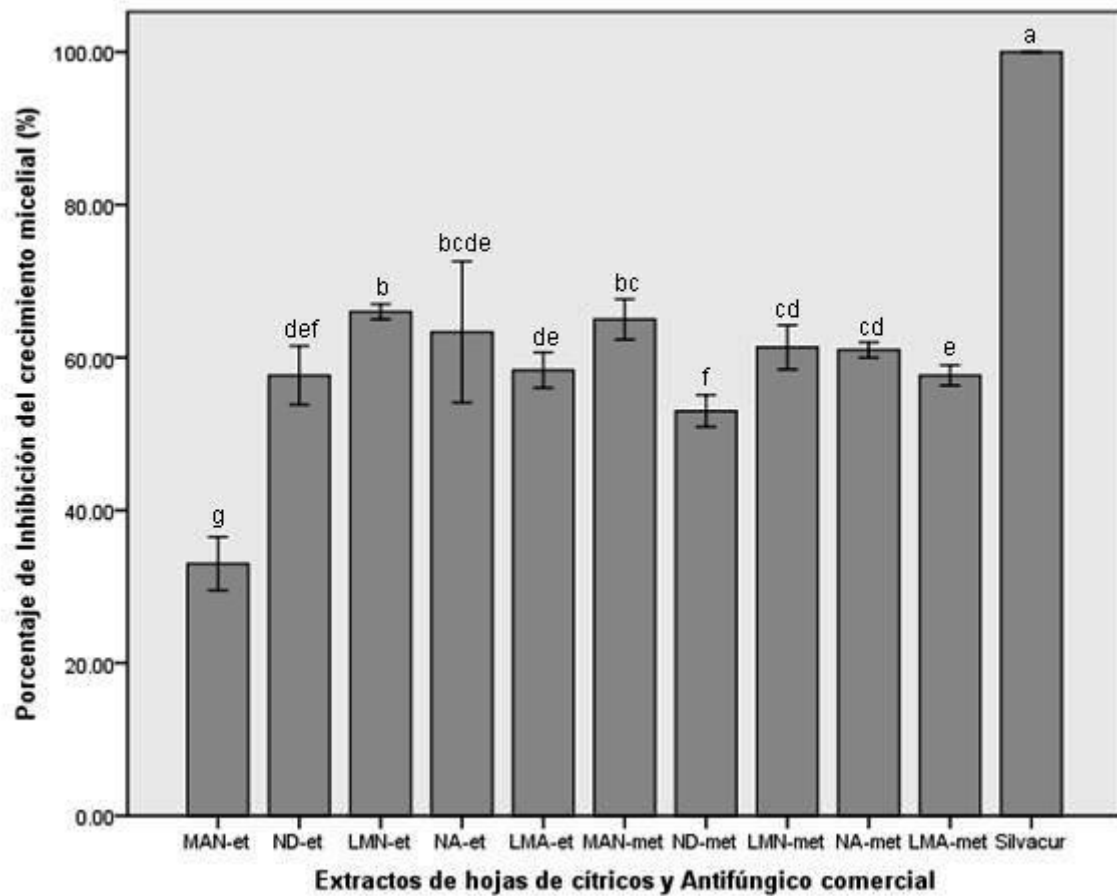
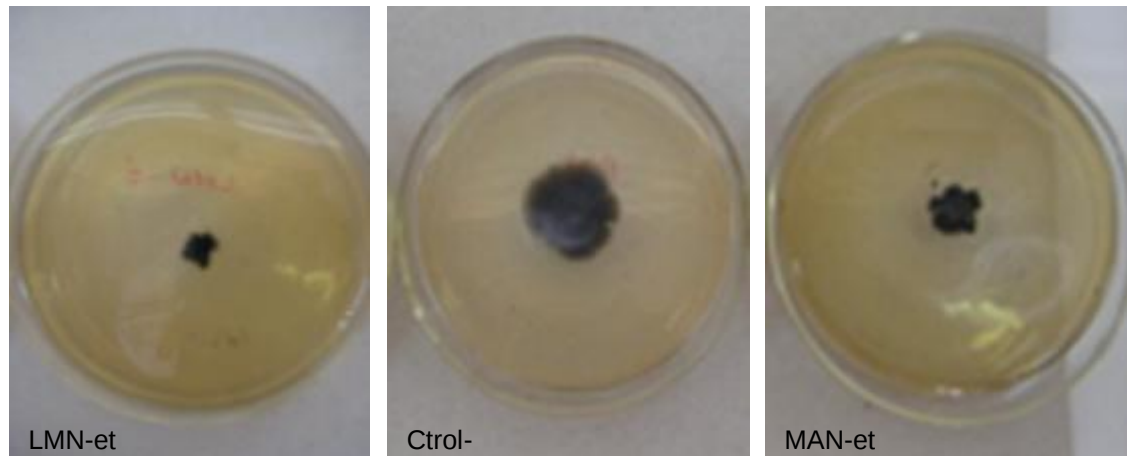


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *P. fulva* por extractos de hojas de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN); en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met), a los 21 días de incubación. Cada barra representa la 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 el caso de *A. solani*, todos los extractos de hojas de cítricos afectaron significativamente la cinética de crecimiento de sus colonias (Figura 5). Los extractos de NA-et y LMA-et afectaron de modo similar al Silvaur la cinética de crecimiento de este hongo.

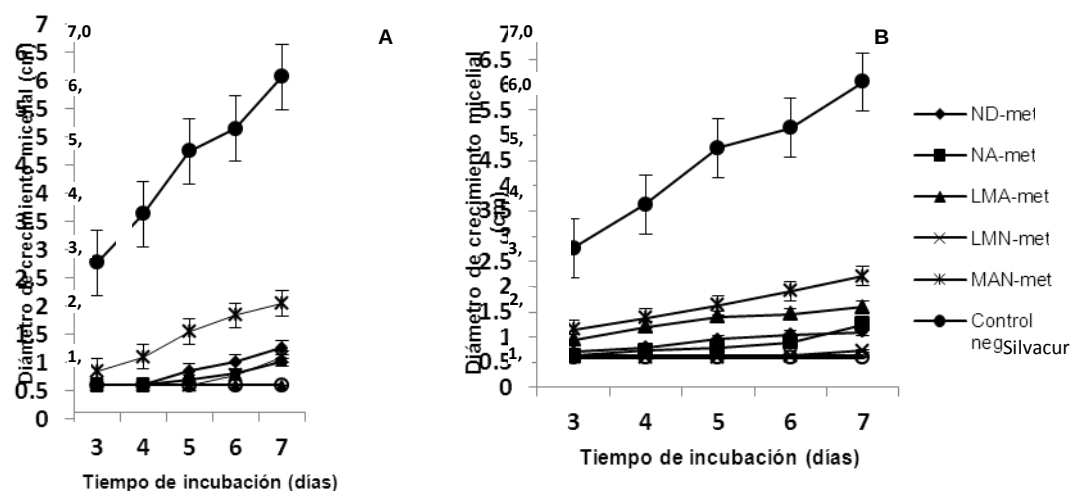


Figura 5. Cinética de crecimiento de *A. solani* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, Agar Papa Dextrosa con Silvaur y Agar Papa Dextrosa con extractos de hojas de cítricos. (A) Naranja dulce (ND); naranja agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN) en etanol 70%; (B) Naranja dulce (ND); naranja agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN) en metanol 70%.

Todos los extractos evaluados se consideraron promisorios en la inhibición del crecimiento micelial de *A. solani*, pues mostraron valores de inhibición superiores al 50% (Figura 6). El extracto LMA-et mostró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial teniendo resultados similares al Silvaur, a pesar de presentar una MIC de 20 mg/mL.

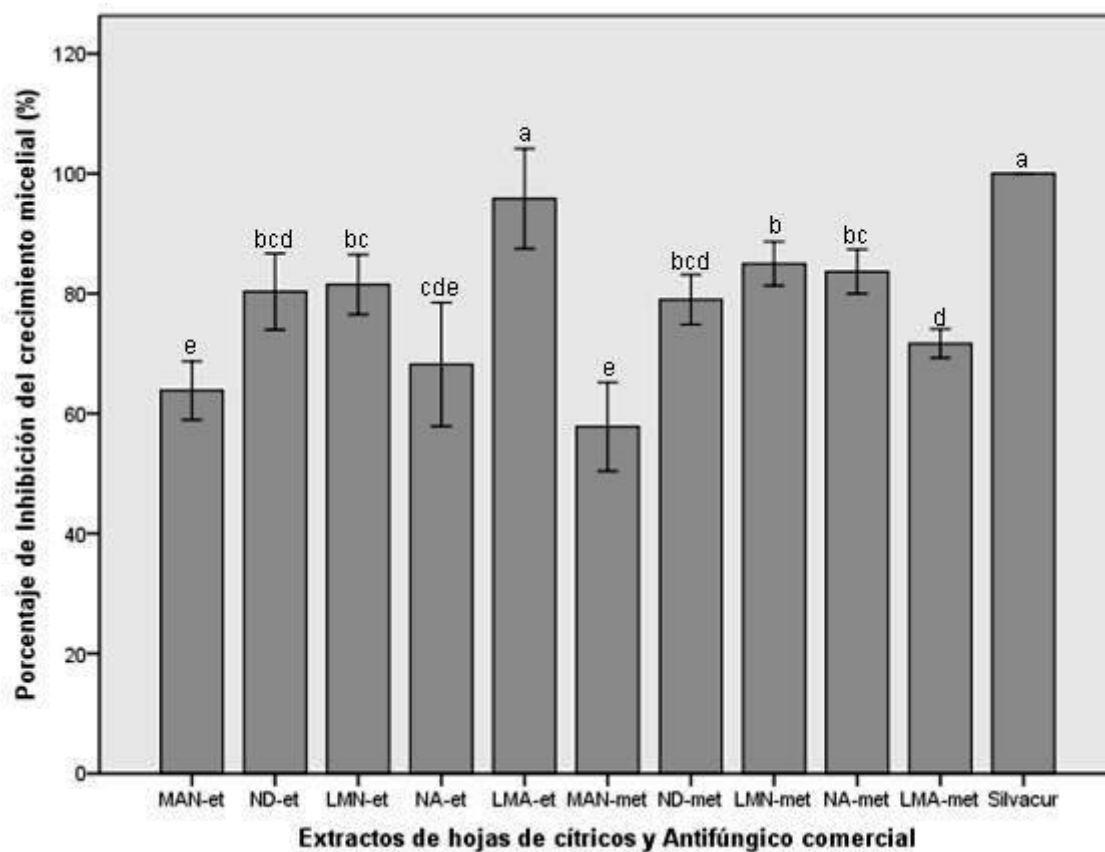
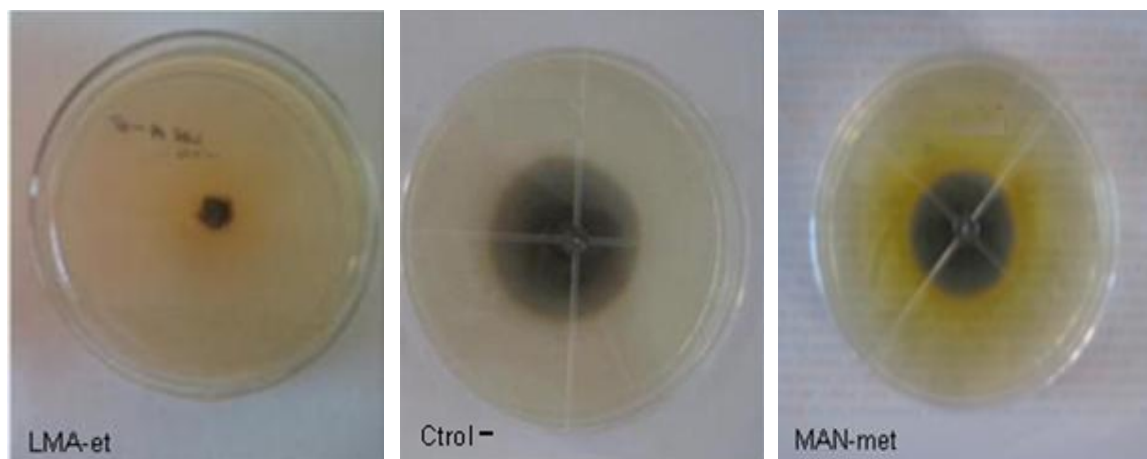


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *A. solani* por extractos de hojas de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN); en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met), calculado al séptimo día de incubación. Cada barra 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).

4.3.4. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de *P. fulva* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

Todos los extractos se consideraron promisorios para la inhibición de la germinación de conidios de *P. fulva*, pues mostraron valores de inhibición superiores al 50% (Figura 7). Los extractos que mostraron mayor porcentaje de inhibición de la germinación de conidios fueron LMN-et, ND-met y LMA-met, coincidiendo el extracto de LMN-et con el que mostró la mayor inhibición del crecimiento micelial.



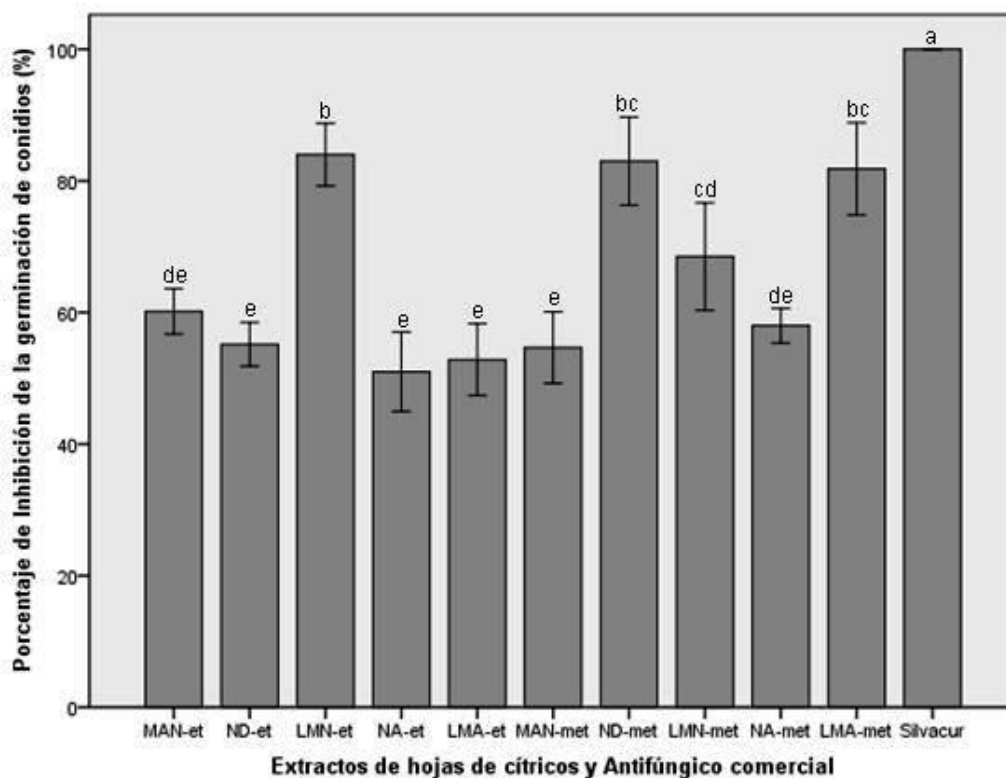
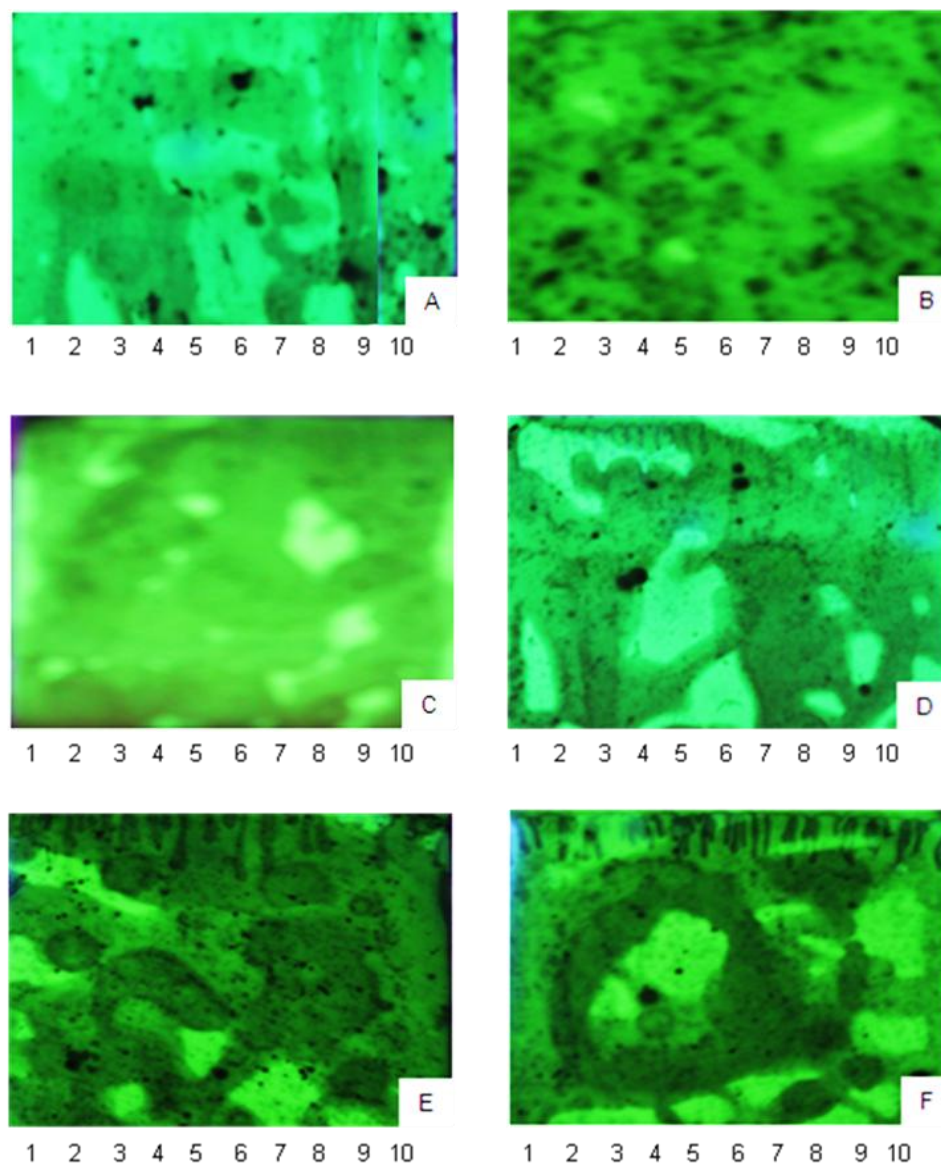


Figura 7. Porcentaje de inhibición de la germinación de conidios *in vitro* de *P. fulva* por extractos de hojas de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN); en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met), calculado las 24 horas de incubación. Cada barra 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).

4.3.5. Fracción química de los extractos que inhibe el crecimiento de *P. fulva* y *A. solani*

Para determinar los compuestos bioactivos de los diferentes extractos frente a *P. fulva* y *A. solani*, se realizó el método bioautobiográfico. Todos los extractos evaluados mostraron zonas de inhibición de la actividad de ambos hongos (Figura 8).



Leyenda

1- Naranja dulce-etanol
5- Mandarina-etanol
9- Limón criollo-metanol

2- Naranja agria-etanol
6- Naranja dulce-metanol
10- Mandarina-metanol

3- Lima persa-etanol
7- Naranja agria-metanol

4- Limón criollo-etanol
8- Lima persa-metanol

Figura 8. Bioautogramas asperjados con *P. fulva* (A, B y C) y *A. solani* (D, E y F) desarrollados con diferentes sistemas de solventes. (A y D) propanol-acetato de etilo-agua, (B y E) metanol-acetato de etilo-agua, (C y F) butanol-acido acético-agua.

En todos los extractos de hojas de cítricos se calcularon valores de Rf 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 VII se muestran los compuestos químicos, de cada extracto, con actividad antifúngica frente a *P. fulva* y *A. solani*.

Tabla VII. Compuestos químicos identificados en extractos de hojas de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA); lima persa (LMA), limón criollo (LMN); mandarina (MAN); en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met) con actividad antifúngica frente a *P. fulva* y *A. solani*.

Extracto	Compuestos	Actividad antifúngica	
		<i>P. fulva</i>	<i>A. solani</i>
ND-et	Quinonas	+	+
	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	-
	Alcaloides	-	+
	Flavonoides 3,5-metoxilados y cumarinas	-	+
	Otros	+	+
NA-et	Quinonas	-	+
	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	-	+
	Alcaloides	+	+
	Otros	+	+
LMA-et	Quinonas	+	-
	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
	Alcaloides	-	+
	Otros	+	+
LMN-et	Quinonas	-	+
	Flavonoides 3,5-metoxilados y cumarinas	-	+
	Flavonoides sin OH en posición 5	+	-
	Alcaloides	-	+
	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	-
	Otros	+	+
MAN-et	Quinonas	+	+
	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
	Flavonoides 3,5-metoxilados y cumarinas	-	+
	Otros	+	+
ND-met	Quinonas	+	-
	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
	Otros	+	+

Tabla VII. continuación

Extracto	Compuestos	Actividad antifúngica	
		<i>P. fulva</i>	<i>A. solani</i>

Extracto	Compuestos	Actividad antifúngica	
		<i>P. fulva</i>	<i>A. solani</i>
NA-met	Quinonas	+	-
	Flavonoides 3,5-metoxilados y cumarinas	+	+
	Otros	+	+
LMA-met	Quinonas	+	-
	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
	Otros	+	+
LMN-met	Quinonas	+	-
	Flavonoides 3,5-metoxilados y cumarinas	+	+
	Saponinas	-	+
	Otros	+	+
MAN-met	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	-	+
	Quinonas	+	-
	Otros	+	+

De los compuestos identificados por TLC, las quinonas fueron los compuestos con mayor actividad frente a *P. fulva* mientras que, los flavonoles 3-glicosilados y flavonas fueron los compuestos más activos frente a *A. solani*. Los extractos LMA-et, LMN-et, MAN-et y NA-met mostraron la mayor cantidad de compuestos antifúngicos frente a *P. fulva*. Sin embargo, los extractos etanólicos de ND, NA, LMA y LMN poseen un mayor número de componentes antifúngicos contra *A. solani*. Los extractos etanólicos mostraron mayor cantidad de compuestos químicos con actividad antifúngica.

5. Discusión

5.1. Obtención de extractos de hojas de *Citrus* spp.

El género *Citrus* se encuentra representado en regiones del trópico por especies como: naranjos agrios y dulce, limón, lima persa, mandarina y toronja. Las plantas correspondientes a este género son ampliamente estudiadas tanto por el valor nutritivo de sus frutos, como por sus propiedades biológicas entre las que se encuentran antioxidantes (Johann *et al*, 2007), anticarcinogénicas (Pan *et al*, 2008), antiinflamatorias (Fernández-López *et al*, 2005), osteogénicas, antialérgicas (Belajová y Suhaj, 2004), vasculares (Kamran *et al*, 2010) y antitumorales, además de ser potentes inhibidores enzimáticos (Cushnie y Lamb, 2005) y responsables de prevenir desórdenes neurodegenerativos (Guimarães *et al*, 2010), también poseen propiedades antimicrobianas y antivirales (Del Río *et al.*, 2004). Estas propiedades se deben a la presencia de metabolitos secundarios entre los que se destacan alcaloides (Saonere, 2011), aceites esenciales (Álvarez y Ramón-Laca, 2005) y compuestos fenólicos como los flavonoides (Sun *et al.*, 2010) y las cumarinas (Kostova, 2005).

Tradicionalmente, la extracción de compuestos bioactivos a partir de material vegetal se realiza empleando mezclas de solventes orgánicos, y depende, mayormente, de la elección correcta de los solventes y del uso de calor y/o la agitación para aumentar la solubilidad de los compuestos deseados y mejorar la transferencia total (Zhang *et al.* 2009). Usualmente, estas técnicas requieren tiempos largos de extracción (más de 12 h) con riesgo de degradación termal para la mayor parte de los fitoconstituyentes (Luque de Castro y García-Ayuso 1998). Por este motivo ha sido una necesidad el desarrollo de métodos de extracción rápidos y de alto rendimiento, con un consumo reducido de solvente, debido además, a la preocupación creciente de la prevención de la contaminación ambiental. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de extracción incluyendo la extracción asistida por microonda, extracción por fluido supercrítico, la extracción por alta presión hidrostática y extracción asistida por ultrasonido (Ajila *et al.* 2011). De todas estas, la extracción por ultrasonido es la más empleada (Ignat *et al.* 2011) En contraste con las extracciones convencionales, debido al ultrasonido, los compuestos de la planta difunden a través de las membranas celulares, y el proceso de cavitación causa la hinchazón de las células, con la consecuente ruptura de las paredes y membranas celulares, en un período de tiempo más corto (Ma *et al.*, 2008 y Muhammad *et al.*, 2010). En este estudio se empleó el método de extracción asistido por ultrasonido

satisfactoriamente, lo que se corresponde con la obtención de extractos con concentraciones de metabolitos secundarios, sin pérdida de la actividad biológica de interés, sin el empleo de solventes orgánicos y tiempos de extracción de 20 min.

5.2. Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

5.2.1. Caracterización fitoquímica

Los estudios fitoquímicos de extractos vegetales permiten determinar de modo cualitativo los compuestos químicos presentes en la planta.

En el género *Citrus* estos estudios se han realizado mayormente en extractos de jugo, corteza o esperidio de los frutos (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Fueron hallados saponinas, taninos, ácidos aromáticos y flavonoides en extractos metanólicos de corteza de fruto de *Citrus limón* L. obtenidos mediante el método de percolación, (Sivakumar y Venkataraman, 2010) y en extractos etanólicos del fruto de *C. aurantiaum* y *C. sinensis* obtenidos mediante un procedimiento de extracción con solvente asistida por soxhlet y agitaciones secuenciales, se encontraron alcaloides, flavonoides glicosilados, taninos, terpenos y saponinas (Ashok kumar *et al.*, 2011). Similarmente, estudios fitoquímicos del fruto de *C. limón* y *C. sinensis* empleando otros solventes orgánicos como acetona, éter de petróleo y etilacetato, y como método de extracción batidos secuenciales, revelaron flavonoides y taninos en todos los solventes y alcaloides y saponinas solo en los dos últimos (Penecilla y Magno, 2011).

Es común en los extractos evaluados de todos los trabajos anteriormente citados la presencia de saponinas, taninos, alcaloides y flavonoides, lo que se corresponde con los resultados de esta investigación (Tabla III). Las diferencias apreciadas, pueden deberse a los diferentes órganos de la planta, al uso de diferentes solventes orgánicos y al empleo de las diferentes técnicas de extracción en la preparación de los extractos.

Resultados similares fueron descritos por Uchechi y Oghenerobo, (2010) para extractos de hojas de cítricos, solamente, en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *C. sinensis* obtenidos mediante un procedimiento de maceración y batidos secuenciales, donde encontraron taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroides y triterpenos. En los extractos etanólicos y metanólicos de *C. sinensis* evaluados en este trabajo se encontraron todos estos metabolitos con excepción de alcaloides y triterpenos, lo cual puede deberse al uso de diferentes técnicas de extracción.

5.2.2. Cromatografía en placa delgada

Mediante el análisis por TLC, se corroboraron los resultados del análisis fitoquímico, con el empleo de tres sistemas de fases móviles diferentes. Existió diferencia en la identificación de saponinas, que solo se visualizaron para el extracto de LMN en ambos solventes (Figura 1 y Tabla IV). Esto puede deberse a que las concentraciones en las que se encuentra este compuesto en el resto de los extractos, están por debajo del índice de detección de esta técnica (Fried y Sherma, 1999).

5.2.3. Contenido de fenoles totales

La cuantificación del contenido de metabolitos bioactivos presentes en las plantas, constituye una herramienta eficaz para realizar ensayos *in vitro*, orientados a determinar actividades biológicas (Mujica *et al.*, 2009). Específicamente en la cuantificación de fenoles totales, uno de los ensayos fotométricos más universales, es el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu desarrollado por Swain y Hills en 1959, basado en la reducción del ácido fosfomolibdico hasta óxidos azules de molibdeno (Ajila *et al.*, 2011). La elevada aplicabilidad de esta técnica consiste en que las lecturas mediante el desarrollo de color, requieren menor complejidad de instrumentos y son más accesibles (García, 2004). Sin embargo, existen diferencias en los resultados analíticos, que radican en el empleo de patrones y unidades de medidas diferentes [1 $\mu\text{mol/g}$ ácido gálico equivalente a 1 g de peso seco (Gorinstein *et al.*, 2004), 1 mg ácido tánico /100 g (Abd El-aal y Halaweish, 2010) 1 mg de ácido gálico equivalente a 100 mL del jugo (Fadlinizal *et al.*, 2009), 1 mg de ácido gálico equivalente a 1 mL del extracto (Stanojević *et al.*, 2009)].

La cuantificación de fenoles totales realizada a extractos de cítricos obtenidos a partir de los frutos de estas plantas, principalmente de la especie *C. sinensis* ha mostrado concentraciones de 109 mg/100 g de su jugo (Zvaigzne *et al.*, 2009), 275.8 mg de ácido gálico/100 g de peso seco en extractos etanólicos del jugo (Kamran *et al.*, 2010) y 559.3-591.8 mg ácido tánico /100 g de hesperidio, en extractos etanólicos del fruto (Abd El-aal y Halaweish, 2010). Los extractos evaluados en el presente trabajo se obtuvieron a una concentración de 0,1 gramo de material vegetal por mL de solvente, en la Tabla V se muestran los resultados de la cuantificación de fenoles totales expresados en mg de ácido gálico/mL de extractos, los extractos etanólicos y metanólicos de hojas de *C. sinensis* mostraron valores de 177,34 y 246,30, por lo que modularmente son superiores a los referidos con anterioridad.

Del mismo modo ocurre con *C. aurantiifolia* y *C. reticulata* var. Clementine (Ghasemi *et al.*, 2009) cuyos extractos de fruto han mostrado valores de 101.5 mg/ 100 g de jugo (Zvaigzne *et al.*, 2009) y 66.5-396.8 mg ácido gálico/ g de extracto del hesperidio del fruto (Ghasemi *et al.*, 2009) respectivamente. Lo anterior demuestra que es posible emplear las hojas de plantas del género *Citrus* para obtener fenoles totales, metabolitos bioactivos de estas plantas.

5.3. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *P. fulva* y *A. solani*

Las necesidades actuales del uso de fungicidas ambientalmente seguros y más específicos en su actividad, así como el desarrollo de una cultura agroecológica, han motivado el avance de investigaciones orientadas a proporcionar estrategias de control sostenibles y seguras, entre las cuales se encuentra, el uso de extractos de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas. Entre las especies vegetales evaluadas ocupan un lugar significativo las pertenecientes al género *Citrus*, de las cuales se han determinado actividades como las de *C. sinensis* frente a *Aspergillus niger* (Sharma y Tripathi, 2006) y la de *Citrus limettoides* Tanaka ante *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarium* (Vasudeva y Sharma, 2012).

5.3.1. MIC de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a *P. fulva* y *A. solani*

La menor concentración a la cual un producto puede inhibir el crecimiento de un microorganismo, ha sido ampliamente determinada en trabajos que involucran extractos de plantas frente a agentes microbianos. 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. La comparación de los resultados de MIC de diferentes extractos vegetales entre los diferentes estudios es limitada por el uso de diversas metodologías y definiciones de este parámetro (Klančnik *et al.*, 2010).

Frente a *P. fulva* se han efectuado varios estudios de determinación de la MIC de extractos vegetales, entre los que se encuentran los realizados mediante microdilución en agar con los aceites esenciales de flores de *Salvia sclarea* L. (Džamić *et al.*, 2008) y *Mentha longifolia* L. (Džamić *et al.*, 2010) que mostraron valores de MIC de 2.5 µl/ml, los

cuales resultaron inferiores a los obtenidos con los extractos de hojas de cítricos probados en este trabajo frente a *P. fulva*. Los autores atribuyen estos resultados a las elevadas concentraciones de los metabolitos acetato de linalil (éster) y linalool (terpeno), presentes en los aceites esenciales de las flores de las especies evaluadas, los cuales no fueron encontrados en los extractos de hojas de cítricos del presente estudio.

La MIC establecida en el presente trabajo para *A. solani* resultó inferior a las determinadas por el método de dilución en agar con extractos metanólicos de hojas y tallos de *Trigonella foenum-graecum* L. (60 ug/ml.) cuya actividad se debe a la presencia de alcaloides y taninos (Haouala *et al.*, 2008) y a la de extractos etanólicos de semillas de *Voacanga africana* Stapf ex Scott-Elliot (100g/mL), activos debido a la presencia de alcaloides, antraquinonas y taninos (Duru y Onyedineke, 2010). Solamente la determinada por microdilución en extractos metanólicos de semillas y flores de *Salvia sclarea* L., hojas de *Salvia officinalis* L. y *Lippia alba* Mill resultó menor (1.25 -25 µg mL⁻¹) (Díaz *et al.*, 2011) que la de extractos de hojas de cítricos establecida en nuestro trabajo para este hongo. Esta diferencia puede deberse a que las semillas, flores y hojas de *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis* y *Lippia alba*, contienen aminoácidos y péptidos bioactivos (Díaz *et al.*, 2011), que no fueron hallados en los extractos de hojas de cítricos evaluados en este trabajo.

Las diferencias existentes entre los resultados consultados y el presente estudio pueden deberse al empleo de diferentes técnicas de determinación de la MIC. Teniendo 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 (Hadacek y Greger, 2000). Además, para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana las sales de tetrazolio son empeladas en el método de microdilución para incrementar la detección del crecimiento del microorganismo. Los resultados son fácilmente identificados por el cambio de color, la reducción ocurre debido a la función de este compuesto como aceptor artificial de electrones de la respiración, por lo que resulta, para este fin, una técnica factible (Klančnik *et al.*, 2010).

Para el género *Citrus*, los ensayos de determinación de la MIC se han realizado mayormente en extractos obtenidos a partir de frutos y hesperidio de los frutos, frente a varios microorganismos. En extractos etanólicos y acuosos del fruto de *C. lemon* evaluados por Dilución en agar se han establecido MIC de 1,25 -5,0 w/v frente a *E. coli*,

debido al elevado contenido de glicósidos, saponinas, tanninos y alcaloides que presentan estas plantas (Sule *et al.*, 2009) y en extractos de *C. lemon* en metanol y acetona frente a *Salmonella typhimurium* y en etanol ante *Micrococcus aureus* empleando la misma técnica, la MIC fue 1:20, a consecuencia del contenido de tetrazeno (terpeno) y cumarinas hallados en sus frutos (Dhanavade, 2011). Además por Dilución en agar, se han determinando MIC de 100 mg/ mL en extractos etanólicos y acuosos de hojas de *C. sinensis*, probados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, los cuales deben su actividad a la presencia de fitoconstituyentes como los flavonoides (Uchechi y Oghenerobo, 2010). Estos valores resultan mayores a los determinados en este estudio, lo que confirma que los extractos de de hojas de cítricos evaluados son activos frente a *A. solani* y *P. fulva*. Solo en aceites esenciales del hesperidio del fruto de *C. limettioides* evaluados por Microdilución frente a *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* se determinó una MIC en el rango de 6,25-25 μ L/mL, inferior a la establecida en nuestro estudio (Vasudeva y Sharma, 2012). Los autores atribuyen este resultado a la presencia de monoterpenos hidrocarbonados como el dl-limoneno y el β -mirceno en los aceites esenciales de esta planta que no se encuentran en los extractos hidroalcohólicos de hojas de cítricos.

5.3.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* y *A. solani* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

La evaluación *in vitro* de la inhibición del crecimiento micelial de un hongo, constituye una vía rápida para determinar la eficacia de un producto antimicrobiano en particular, que pueda ser empleado con carácter curativo, para tratar patologías que afectan especies vegetales o animales (Rondón *et al.*, 2006).

Frente a *P. fulva* el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial obtenido por los extractos LMN-et, NA-et y MAN-met evaluados en este trabajo, fue superior al mostrado por extractos acuosos de *Artemisia camphorata* Vill (53,42%) los cuales deben su actividad a la presencia en las hojas del compuesto terpenoide linalol (Itako *et al.*, 2009). Sin embargo empleando extractos etanólicos de hojas de *Tagetes erecta* L., la inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* fue superior (71%) debido a la presencia de componentes fungicidas en sus aceites esenciales (Pupo, 2009).

La inhibición del crecimiento micelial de *A. solani* mostrada por el extracto de LMA-et, evaluado en el presente estudio, resulta superior a las determinadas con extractos etanólicos de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc (72%), cuya actividad se debe a la

presencia de alcaloides (Bernal *et al.*, 2005), con extractos del fruto de *Yucca schidigera* (76%) activos a consecuencia del alto contenido de saponinas (Chapagain *et al.*, 2007), con extractos metanólicos de raíces de *Rumex nepalensis* Spreng (45%) y de rizomas de *Rheum australe* D. Don (50 %) (Hussain *et al.*, 2010) y con extractos metanólicos de *Lauris nobilis* L (79%) y *Salvia officinalis* Pall (76%) que deben su actividad a la presencia de fenoles y flavonoides, especialmente ácidos α y β , prenilflavonoides y proantocianidinas (Yanar *et al.*, 2011).

De acuerdo a estos resultados se puede inferir que los extractos de hojas de cítricos son potencialmente curativos para infecciones provocadas por *A. solani* y *P. fulva*.

En la literatura consultada solamente se encontraron dos estudios sobre la actividad antifúngica de extractos del género *Citrus*, en los cuales se evaluaron extractos de hojas de *C. paradisi* en cloroformo frente al patógeno de humanos, *Candida albicans*, determinándose que la actividad antifúngica de esta planta, se encuentra asociada a la presencia de taninos y aminoácidos (Sharma y Sharma, 2010) y extractos de hojas de *C. reticulata* frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, relacionándose su efecto antifúngico con la presencia de resinas en sus aceites esenciales. (Pacheco *et al.*, 2006). En estos trabajos la inhibición del crecimiento micelial resultó inferior a la determinada con los extractos de hojas de los cítricos evaluados frente a *P. fulva* y *A. solani*. Sin embargo, al evaluar el aceite esencial extraído de *C. reticulata* frente a *A. alternata*, *R. solani* y *Curvularia lunata*, los porcentajes de inhibición resultaron mayores que los determinados en nuestro trabajo (84, 80 y 93 respectivamente), exceptuando el caso del extracto de LMA-et frente a *A. solani* (Chutia *et al.*, 2009). Estos resultados confirman la potencialidad antifúngica de los extractos de hojas de cítricos evaluados.

El hecho de que no existiera una correspondencia entre los extractos con menor MIC y los extractos con mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial frente a estos hongos, puede deberse a las diferentes técnicas empleadas, 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. Del mismo modo, pudieron variar los efectos de las relaciones de antagonismo o sinergismo que se establecen entre estos compuestos (Gómez *et al.*, 2007) lo que pudo contribuir a las diferencias entre los resultados.

5.3.3. Porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de *P. fulva* por los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.

El estudio *in vitro* de la inhibición de la germinación de esporas, permite la comprobación de que el extracto 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 *P. fulva* la inhibición de la germinación de esporas se encuentra poco estudiada *in vitro*. Solamente se encontró un estudio de extractos acuosos de hojas de *Artemisia camphorata* y *Rosmarinus officinalis*, los cuales deben su actividad a la presencia del compuesto terpenoide linalool (Itako *et al.*, 2009), en el que se obtuvieron porcentajes de inhibición de la esporulación inferiores a los mostrados por los extractos de LMN-et, ND-met y LMA-met.

Empleando extractos obtenidos a partir del género *Citrus* se han efectuado trabajos de inhibición de la germinación de esporas con extractos acuosos y polvos de hojas de *C. limon* frente a *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb) Vuill, el cual muestra porcentajes de inhibición de la esporulación de 100 % (Bautista-Baños *et al.*, 2000). Sin embargo, en extractos acuosos de hojas de *C. sinensis* L. frente a *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *Cochliobolus miyabeanus* Dreschler y extractos acuosos de hojas de *C. limon* L. ante *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp., *Pyricularia oryzae* Cavara y *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebr, que deben su actividad a la presencia de fitoalexinas, los porcentajes de inhibición de la esporulación, resultaron menores que los encontrados en este trabajo (Deepak *et al.*, 2007). Lo que evidencia la potencialidad preventiva de los extractos hidroalcohólicos de hojas de cítricos frente a *P. fulva*.

5.3.4. Fracción química de los extractos que inhibe el crecimiento de *P. fulva* y *A. solani*

Los componentes del metabolismo secundario de las especies vegetales, desempeñan un importante rol como productos antifúngicos (Maity *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010 y Zhao *et al.*, 2011). Esta condición está siendo estudiada con el propósito de demostrar de forma específica, qué metabolito en particular presenta la actividad fungicida y su modo de acción contra patógenos vegetales. Además se investigan caracteres estructurales de estos componentes, con la finalidad de producir sintéticamente algunos como quinonas (Riffel *et al.*, 2002), cumarinas (Kostova, 2005) y flavonoides (Alam, 2004) que en

condiciones controladas posibiliten una inhibición más eficiente de los agentes microbiales.

Los resultados mostrados en este estudio evidencian la actividad antifúngica de cumarinas, quinonas, flavonoides, alcaloides, saponinas y otros compuestos no identificados, frente a *P. fulva* y *A. solani* (Tabla VII).

Las cumarinas son compuestos fenólicos cuya estructura se basa en la fusión de un anillo α -pirona y un grupo benceno (Murphy, 1999). Varios son los trabajos publicados sobre la actividad antifúngica de este compuesto.

Esta clase de polifenol extraído de los aceites esenciales de las hojas de *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh, tienen actividad antifúngica frente al patógeno de raíces *Coriopus versicolor* Quél (Wang *et al.*, 2005). Similarmente, la hidroxycumarina escopoletina aislada del tallo de *Melia azedarach* Blanco posee actividad antifúngica frente a *Fusarium verticillioides* (Arif *et al.*, 2011), al igual que las cromonocumarinas frutinona A y B extraídas de *Polygala gazensis* que son activas ante *Cladosporium cuncumerinum* (Johann *et al.*, 2011). Las cumarinas producidas de forma sintética también poseen un marcado efecto fungicida, tal es el caso de la escopoletina, umbelliferon, xanthotoxina y herniarina que exhiben una fuerte inhibición del crecimiento de patógenos vegetales como *Fusarium culmorum* Sacc. De igual modo, la cumarina bergaptina retarda el crecimiento de *Botrytis* spp. (Ojala *et al.*, 2000).

De la misma forma que las cumarinas exhiben actividad frente a patógenos de plantas, lo hacen ante microbios que afectan animales; un ejemplo lo constituye la cumarina 5'-oxauraptena (diversinina), extraída con éter de petróleo de las partes aéreas de *Baccharis darwinii* Hook y Arn que posee actividad antifúngica frente a *Microsporum gypseum* (E. Bodin) Guiart y Grigoraki, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Kurdalas *et al.*, 2010).

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 provocando el colapso celular (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

Las quinonas son dicetonas insaturadas que por reacciones de reducción se convierten en polifenoles, los cuales rápidamente son regenerados por oxidación (Murphy, 1999).

Las naftoquinonas (tectoquinona, 2-hidroximetilanttraquinona, deoxilapacol, tectol, hemitectol y 3'-OH-deoxiisolapacol) obtenidas de la fracción en cloroformo-metanol de *Tectona grandis* L, poseen actividad frente al patógeno vegetal *Aspergillus niger* (Sumthong *et al.*, 2000). Esta clase de polifenol también muestra actividad fungicida frente a patógenos de animales, tal es el caso de las antraquinonas agliconas extraídas en etanol de las hojas de *Senna alata* L., que actúan frente a *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, y *Microsporum gypseum* (Wuthi-udomlert *et al.*, 2010).

De igual modo, las quinonas 5,8-dihidroxi-1,4-naftaquinona y 5-acetamido-8-hidroxi-1,4-naftaquinona, producidas sintéticamente, son activas ante *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* y *Aeromonas hydrophila* (Riffel *et al.*, 2002).

La actividad antimicrobiana de las quinonas se basa en su capacidad de formar complejos irreversibles con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de membranas microbiales, lo cual conduce a la inactivación de estas. 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-Brea, 2003).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico. Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona, dando lugar a flavonoles, flavonas y flavanonas (Murphy, 1999).

La actividad de estos metabolitos extraídos en metanol de la corteza del tallo de *Careya arborea* Roxb, ha sido probada frente a *A. solani* comprobándose la inhibición del crecimiento de este hongo (Sambath *et al.*, 2006).

Flavonoides polimetoxilados aislados del hesperidio del fruto de *Citrus* spp. presentan actividad antimicrobiana frente a los patógenos de animales *Microsporum canis* y *Trichophyton mentagrophytes*. (Johann *et al.*, 2007). De modo similar, flavonoides como prunina butirato, hesperetina glucósido y laurato aislados de las hojas de *C. lemon* y *C. sinensis*, actúan frente a los patógenos vegetales *Fusarium semitectum*, *Penicillium expansum* y *Aspergillus parasiticus* respectivamente (Salas *et al.*, 2011).

Los flavonoles, son un tipo de flavonoides que carecen del [oxígeno](#) cetónico en la posición 4. Los glicosilados en la posición siete del anillo, aislados con metanol de *Lippia turbinata* Griseb, poseen actividad antimicrobiana ante *Klebsiella pneumoneae*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella* sp., *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* (Hernández et al, 2000). Similarmente, flavonoles como la quercetina extraídos en metanol de las semillas de *Phaleria macrocarpa* Scheff poseen actividad frente a *Aspergillus niger* (Hendra et al., 2011).

Las flavonas aisladas en metanol de *Lythrum salicaria* L. actúan frente a patógenos humanos como *C. albicans* y *Micrococcus luteus*. (Rauha et al., 2000) De igual forma la 4,7-dimetoxiisoflavona aislada en metanol de las hojas de *Albizzia lebbbeck*, exhibe actividad antifúngica frente a fitopatógenos como *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Colletotrichum* spp. y *Helminthosporium* spp. (Pandey et al., 2002).

Otra flavona con actividad antifúngica es la flavona O-glicosilada naringina, separada de las hojas de *Barringtonia racemosa* L., la cual actúa inhibiendo el crecimiento de *Fusarium* spp. y *Rhizopus* spp. (Hussin et al., 2009). De modo similar, Las flavonas 3,4',5,7-tetracetil-quercetina extraída de *Adina cordifolia* (Roxb.) Brandis exhibe actividad antifúngica frente a *Aspergillus fumigatus* (Arif et al., 2011) y la polimetoxiflavona tangeretina del fruto de *C. aurantium* actúa ante *P. digitatum* (Lattanzio et al., 2006).

Las flavonas producidas de forma sintética también poseen un marcado efecto fungicida; flavonas anilladas, derivadas de 2-fenil-chromen-4, han mostrado actividad frente a *Aspergillus* spp. y *Colletotrichum gloeosporioide* (Penz) Penz y Sacc (Alam, 2004) y la 4-metilflavona y 7,3-dihidroxi-4-metoxiflavona actúa inhibiendo el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* (Mostahar et al., 2006).

La actividad antimicrobiana de los flavonoides se debe a su capacidad de alterar las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la 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)

Los flavonoides también inhiben la síntesis de ADN y ARN microbiano, a consecuencia de que su anillo β se intercala en la doble hélice de la molécula, e interfiere con la incorporación de precursores radioactivos de los ácidos nucleicos, afectando así la síntesis proteica. 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. Estos polifenoles pueden potenciar su actividad antimicrobiana al combinarse con residuos metálicos y al actuar de modo sinérgico con otros flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005).

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados, cuya extracción es posible tanto en agua como en solventes orgánicos. Son varios los estudios que validan las propiedades antifúngicas de dichos metabolitos ante patógenos vegetales, entre estos se encuentra el extracto etanólico de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. donde alcaloides como lupanina, α -isolupanina, 13-hidroxilupanina, esparteína y epiafilina poseen actividad frente a *A. solani* (Bernal *et al.*, 2005).

Alcaloides como holorrifine-24ol, extraídos de la corteza del tallo de *Holarrhena antidysenterica* Wall ex A. DC, inhiben el crecimiento micelial de microbios vegetales como *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Colletotrichum corchori* Pavgi y U. P. Singh, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (Shafiqur, *et al.*, 2004).

Similarmente sustancias alcaloides extraídas en metanol de *Fagara monophylla* Lam, poseen actividad frente a *Aspergillus flavus* y *Penicillium digitatum* debido al sinergismo y antagonismo de esta sustancia con otros compuestos químicos del extracto (Gómez *et al.*, 2007). El compuesto alcaloide allosecurinina extraído en metanol de *Phyllanthus amarus* L. exhibe actividad frente a *Curvularia* spp., *Collectotrichum* spp. y *Heterosporium* spp. (Singh *et al.*, 2007).

Se ha estudiado que los extractos etanólicos de hojas de *Azadirachta indica* contienen alcaloides con actividad antimicrobiana frente a patógenos de animales como *E. coli* (Aslam *et al.*, 2009). En el extracto etanólico de la corteza del tallo de *Mahonia manipurensis* Takeda, se hallaron compuestos alcaloides como berberina, palmatina y jatrorrizina, con actividad frente a *Bacillus cereus*, *Enterococcus cloacae* y *Enterococcus faecalis* (Pfoze *et al.*, 2011).

La actividad microbicida de los alcaloides se manifiesta debido a que estos compuestos causan cambios morfológicos y lisis en las células microbianas, ya que son capaces de intercalarse en el ADN bacteriano, e inhibir la actividad de la proteína topoisomerasa, involucrada en la síntesis de este ácido nucleico (Karou *et al.*, 2006).

Las saponinas son un grupo glicósidos solubles en agua formados por una aglicona de origen terpénico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, que puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa (Díaz, 2009).

Entre las saponinas más activas frente a patógenos vegetales se encuentran la α -tomatina presente en las hojas y frutos de *L. esculentum* (Mert-Turk, 2006) y las saponinas esteroidales espirostanol y furostanol glicósido contenidas en el fruto de *Yucca schidigera* Ortgies (Chapagain *et al.*, 2007) que actúan de forma efectiva inhibiendo el crecimiento de *A. solani*.

De modo similar las extraídas con metanol de raíces de *Medicago hybrid*, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento micelial del patógeno vegetal *Botrytis cinerea* y *Botrytis tulipae* Lind. Esta inhibición es posible debido a que las saponinas de esta planta, bloquean sitios activos en los receptores de las hifas miceliales de este hongo (Saniewska *et al.*, 2006).

Las saponinas minutosida A, B y C, sapogenina, alliogenina y neoagigenina, extraídas en metanol del bulbo de *Allium minutiflorum* L. actúan frente a *Botrytis cinérea* y *Fusarium solani*. La actividad existente es debido a que las saponinas presentan grupos OH en posición cinco, capaces de formar complejos con los esteroides presentes en la membranas de los microorganismos, provocando daños con el consecuente colapso celular (Barile *et al.*, 2007).

Las saponinas triterpénicas extraídas en metanol de hojas de *Labisa pumila* Benth. mostraron actividad frente a *Fusarium* spp y cuando se hallan en *Dhreslera gramínea*, inhiben el crecimiento micelial de *Rhizopus nodosus* Namys y *Rhizopus nigricens*. (Karimi *et al.*, 2011).

Las saponinas poseen también actividad contra patógenos que afectan animales, en especial frente al género *Candida*. En este grupo figuran las saponinas triterpénicas acetiladas [3-O-(4-acetil- β -D-xilopiranosil)-(1-3)- α -L-rhamnopiranosil-(1-2)- α -L-arabinopiranosil-hederagenina y 3-O-(3,4-di-acetil- β -D-xilopiranosil)-(1-3)- α -L-rhamnopiranosil-(1-2)- α -L-arabinopiranosil-hederagenina], extraídas con butanol del pericarpo del fruto de *Sapindus saponaria* L. que actúan frente a *Candida parapsilosis* (Aschford) Langeron y Talice (Tsuzuki *et al.*, 2007). De la misma forma las saponinas presentes en la fracción etanólica del extracto de hojas de *Clematides tangutica* Skill. actúan frente a *Candida albicans* (Abad *et al.*, 2007), al igual que las kalopanaxsaponinas

extraídas en metanol de toda la planta de *Schwenckia americana* L. (Abdulgafar *et al.*, 2011).

La actividad antimicrobiana de las saponinas tiene lugar, debido a que estos compuestos son capaces de formar complejos con esteroides y proteínas de las membranas celulares, produciendo grandes poros en las mismas que alteran su permeabilidad con la consecuente lisis celular. En ocasiones las saponinas inducen también la muerte celular programada, por la posible activación de las vías de señalización, a través de la tirosina quinasa y la proteína G, (Díaz, 2009)

En la presente investigación se encontró actividad antifúngica de compuestos no identificados por las técnicas cromatográficas empleadas, sin embargo en la literatura consultada se ha estudiado la actividad de otras clases de compuestos tales como catequinas (taninos) aisladas de las hojas de *Fragaria × ananassa* Duchesne ex Rozier que inhiben la esporulación de *P. fulva* (Yamamoto *et al.*, 2000), triterpenos extraídos en metanol de la corteza del tallo de *Careya arborea* Roxb, (Sambath *et al.*, 2006) y aceites esenciales como cinnamaldehído y eugenol extraídos de las hojas y corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, que son responsables de la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *A. solani* (Mishra *et al.*, 2009). Los resultados publicados por otros autores, revelan que en el género *Citrus* recobran singular importancia los aceites esenciales, de los cuales se han estudiado tanto sus actividades microbicidas, como su modo de acción.

Frente a *Aspergillus flavus*, *Fusarium* spp. y *Aspergillus niger*, se evaluó el efecto de aceites esenciales extraídos de *C. limón*, obteniéndose que los mismos poseían actividad antifúngica, a consecuencia de que presentan componentes terpenoides como el limoneno, el mycereno, el α -pineno y el linalool los cuales han demostrado tener actividad antiaflatoxigénica. El mecanismo de acción de estos compuestos, puede estar relacionado con la rotura de las membranas plasmáticas de los microorganismos a través de compuestos lipofílicos. De igual forma la actividad inhibitoria del aceite esencial de esta especie de cítrico se atribuye a una gran variedad de sustancias fitoquímicas presentes en su composición tales como el E-citral, el Z-citral, la genariola y el 1- β pineno, que en general pueden ocasionar granulación y ruptura de la membrana citoplasmática e inactivación y/o inhibición de la síntesis de enzimas intra y extracelulares, impidiendo la producción de micelio. En las hifas, estas sustancias provocan una disminución del 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).

De modo similar los constituyentes limoneno, geranial, neral, geranil acetato, geraniol, β -caryofilleno, nerol, citronellal, neryl acetato del aceite esencial de *C. reticulata*, inhiben el crecimiento de *A. alternata*, *R. solani* y *C. lunata* (Chutia *et al.*, 2009). También los aceites de esta especie actúan ante *Fusarium solani* y *F. oxysporum* (Chanda *et al.*, 2010).

C. limon posee propiedades bactericidas y fungicidas a consecuencia de que contiene aceites esenciales (Prabuseenivasan, 2010) y glicósidos (Nduagu *et al.*, 2008), que actúa inhibiendo el desarrollo de la bacteria animal *Bacillus subtilis* y el fitopatógeno *Colletotrichum capsici* (Synd) Butler & Bisby respectivamente.

Teniendo en cuenta que la técnica empleada para la determinación de los metabolitos con actividad antifúngica fue la TLC, poco específica y donde la visualización de un compuesto depende de la concentración del mismo, cualquiera de los compuestos antes mencionados podría estar presente en los extractos evaluados, y ser uno de los no identificados.

Los resultados de este trabajo demuestran el potencial antifúngico de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas de cinco especies de cítricos naturalizados en Cuba, frente a *P. fulva* y *A. solani*, los que constituyen una alternativa viable para su empleo como una estrategia de manejo agroecológico de estos microorganismos.

6. Conclusiones

1. Los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas de naranjo dulce (*Citrus aurantium* L. var. *sinensis* L.), naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), limón criollo (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), lima persa (*Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), se caracterizaron fitoquímicamente, identificándose la presencia de saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, aminas, quinonas, alcaloides y de varias clases de flavonoides.
2. Los extractos de hojas de los cítricos evaluados son ricos en fenoles totales, obteniéndose concentraciones superiores a 165 mg de ácido gálico/mL de extracto, por lo que pueden emplearse como fuente de estos metabolitos.
3. Todos los extractos de hojas de cítricos evaluados mostraron concentraciones mínimas inhibitorias inferiores a los 40 mg/mL de fenoles totales; siendo el extracto de limón criollo en metanol el de menor concentración mínima inhibitoria frente a *P. fulva* y los extractos de limón criollo y mandarina en etanol frente *A. solani* (5 mg/mL).
4. Todos los extractos de hojas de cítricos evaluados, excepto el de mandarina en etanol, mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* superiores al 50%, siendo el extracto de limón criollo en etanol el más efectivo (70%).
5. Todos los extractos de hojas de cítricos evaluados mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores frente a *A. solani* que a *P. fulva*, siendo el más efectivo el extracto de lima persa en etanol (mayor de 95%) con porcentajes de inhibición similar al antifúngico comercial empleado como control.
6. Todos los extractos de hojas de cítricos evaluados mostraron porcentajes de inhibición de la germinación de conidios de *P. fulva* superiores al 50%, siendo los extractos de limón criollo en etanol, naranjo dulce y lima persa en metanol los de mayor efectividad (mayor 80%).
7. Las quinonas fueron los compuestos con mayor actividad frente a *P. fulva* mientras que los flavonoles 3-glicosilados y flavonas fueron los compuestos más activos frente a *A. solani*.

7. Recomendaciones

- ✓ Calcular el porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *Alternaria solani* por los extractos de hojas de *Citrus* spp.
- ✓ Caracterizar por técnicas de mayor resolución y especificidad los extractos de hojas de *Citrus* spp.
- ✓ 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**. 7: 116-145.
- Abd El-aal, H.A y Halaweish, F.T (2010): Food preservative activity of phenolic compounds in orange peel extracts (*Citrus sinensis* L). **Lucrări Științifice**. 53: 457-464.
- Abdulgafar, O.J, M.E. Halilu, Ch. Aminu, T.U. Muhammad y A.Sh. Hudu (2011): Phytochemical screening and antifungal evaluation of methanolic extract of *Schwenckia americana* L. (Solanaceae). **Continental J. Pharmaceutical Sciences**. 5: 11-14.
- Acharya, S y Srivastava, R (2010): Antifungal property of *Tridax procumbens* L. against three phytopathogenic fungi. **Arch. Pharm. Sci y Res**. 2: 258-263.
- Adewusi, E.A y Afolayan, A.J (2009): Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the roots and leaves of *Pelargonium reniforme* Curtis (Geraniaceae). **Afr. J. Biotechnol**. 8: 6425-6433.
- Agarwal, A, G.K. Garg, S. Devi, D.P. Mishra y U.S. Singh (1997): Ultrastructural changes in Brassica leaves caused by *Alternaria brassicae* and destruxin. **B. J. Plant. Biochem. Biotechnol**. 6: 25-28.
- Agrios, G.N (2005): **Plant Pathology**. Academic Prey. 5 th edition. Estados Unidos. 952 pp.
- Ahmad, I y Beg, A (2001): Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. Ethnopharmacol**. 74: 113-123.
- Ajila, C.M, S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, S. Godbout y J.R. Valéro (2011): Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. **Crit. Rev. Biotechnol**. 31: 227-249.
- Akroum, S, D. Satta y K. Lalaoui (2009): Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical screening of some Algerian plant. **Eup. J. Sci. Res**. 2: 289-295.
- Alam, S (2004): Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some derivatives of 2-phenyl-chromen-4-one. **Chem. Sci**. 116: 325-331.

Al-Bayati, F.A (2009): Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. **An. Microbiol. Antmicrob.** 8: 1-6.

Alvarez, B y Ramón-Laca, L (2005): Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. **J. Ethnopharmacol.** 97: 89-95.

Álvarez, R y Delgadillo, F (2004): Enfermedades del tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción. Torreón: México.

Amadi, J.E, S.O. Salami y C.S. Eze (2010): Antifungal properties and phytochemical screening of extracts of African Basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Agric. Biol. J. N. Am.** 1: 163-166.

Anagnostopoulou, M, P. Kefalas, V. Papageorgiou, A. Assimopoulou y D. Boskou (2006): Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chem.** 94: 19-25.

Arif, T, T.K. Mandal y R. Dabur (2011): Natural products: Antifungal agents derived from plants. **Natural Products in Medicinal Chemistry.** 37: 283-311.

Arima, H y Danno, G (2002): Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. **Biosci Biotechnol Biochem.** 66:1727-30.

Asgedom, S, C. Struik, E. Heuvelink, y A. Woldeamlak (2010): 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, F, K. Rehman, M. Asghar y M. Sarwar (2009): Antibacterial activity of various phytoconstituents of neem. **Pak. J. Agri. Sci.** 46: 209-213.

Báez, R, N. Bruce, S. Proveyer, M. Cobo (1999): Evaluación antibacteriana de extractos de cítricos de la provincia de Ciego de Avila. Ciego de Avila. Facultad de Ciencias Médicas de Ciego de Avila.

- Barile, E, G. Bonanomi, V. Antignani, B. Zolfaghari, S. Ebrahim, F. Scala y V. Lanzotti (2007): Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry** 68: 596-603.
- Bautista-Baños, S, M. Hernández-López, J.C. Díaz-Pérez y C.F. Cano-Ochoa (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.
- Bejarano R.J, y Centeno, S.J (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: 57-6.
- Belajová, E y Suhaj, M (2004): Determination of phenolic constituents in *citrus* juices: Method of high performance liquid chromatography. **Food Chem.** 86:339-343.
- Beltrán, M.J, T. Ogura, G. Manzo y C. Arias (2006): Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas?. **Revista mexicana de fitopatología**. 24: 50-58.
- Benson, H.J (1998): **Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology** .WCO/Mc Graw-Hill Ltd. 7th edition.
- Bernal, A, J.F. Zamora, G.V. Callero y R. Nuño (2005): Actividad biológica in vitro de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. **Revista Mexicana de Fitopatología**. 23: 140-146.
- Bernal, A, M. Díaz, C. Huerres, D. Cabrera, M. González y G. Pérez (2003): Incidencia de enfermedades fúngicas en híbridos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de cultivo protegido. **Centro Agrícola**. 3: 91-93.
- Bianchi, A, A. Zambonelli, A. Zechini y F. Bellesia (1997): Ultrastructural Studies of the Effects of *Allium sativum* on Phytopathogenic Fungi in vitro. **Plant Dis.** 81: 1241-1246.
- Butler, E.J. y Jones, S.G. (1949): Tomato Leaf Mould, *Cladosporium fulvum* Cooke. London: Macmillan.
- Castellanos, L, M. Stefanova, P. Villa, I. Irimia, M. González y M.E. Lorenzo (2005): Ensayos con el producto biológico Gluticid para el control de *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* en el tomate en casas de cultivo protegidos. **Fitosanidad**. 2: 39-41.

Chanda, S, Y. Baravalia, M. Kaneria y K. Rakholiya (2010): Fruit and vegetable peels – strong natural source of antimicrobics. Current Research, **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Méndez-Vilas edition. 444-450.

Chandrasekaran, M y Venkatesalu, V (2004): Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J. Ethnopharmacol.** 91: 105–108.

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.

Chutia, M, P.D. Bhuyan, M.G. Pathak, T.C. Sarma y P. Boruah (2009): Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **Food. Sci. Technol.** 42: 777-780.

Cih-Azul; I.R, J.L. Jaramillo-Villanueva, M.A. Tornero-Campante y R. Schwentesius-Rindermann (2011): Caracterización de los sistemas de producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el estado de Jalisco, México. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**.14: 501-512.

Cotoras, M, C. Folch y L. Mendoza (2004): Characterization of the Antifungal Activity on *Botrytis cinerea* of the Natural Diterpenoids Kaurenoic Acid and 3- α -Hydroxy-kaurenoic Acid. **Agric. Food Chem.** 52: 2821-2826.

Cushnie, T y Lamb, A (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 26:343-356.

Damicone, J y Brandenberger, L (1993): Common Diseases of Tomatoes. Part I. Diseases Caused by Fungi. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma State University.

Deacon, J (2006): **Fungal Biology**. Blackwell Publishing Ltd. 4th edition.

Deepak, S.A, G. Oros, S.G. Sathyanarayana, H. Shekar y S. Sashikanth (2007): Antisporulant Activity of Watery Extracts of Plants against *Sclerospora graminicola* Causing Downy Mildew Disease of Pearl Millet. **Am. J. Agril. & Biol. Sci.** 2: 36-42.

Del Río, J.A, M.D. Fustera, P. Gómez, I. Porrasb, A. García-Lidón y A. Ortuño (2004): *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chem.** 84:457-461.

- Depestre, T y Gómez, O (1999): **Mejoramiento de Plantas**. Tomate y Chile Pimiento. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". La Habana: Cuba.
- Dhanavade, M.J, C.B. Jalkute, J.S. Ghosh y K.D. Sonawane (2011): Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract. **Br. J. Pharmacol. Toxicol.** 2: 119-122.
- 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.
- Díaz, P, A. Cabrera, D. Alem, P. Larrañaga, F. Ferreira y M. Dalla (2011): Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. **Chilean Journal of Agricultural Research.** 71: 231-239.
- Ding, T, T. Jiang, J. Zhou, L. Xu y Z.M. Gao (2010): Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). **Genet. Mol. Res.** 9: 2104-2112.
- Domingo, D y López-Brea, M (2003): Plantas con acción antimicrobiana. **Rev. Esp. Quimoterap.** 16: 385-393.
- Doughar, J.H (2006): Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. **Trop. J. Pharm Res.** 5: 597-603.
- Doughari, J.H y Nuya, S.P (2008): *In vitro* antifungal activity of *Deuterium microcarpum*. **Pak. J. Med. Sci.** 24: 91-95.
- Duru, C.M y Onyedineke, N.E (2010): *In vitro* Antimicrobial Assay and Phytochemical Analysis of Ethanolic Extracts of *Voacanga africana* Seeds. **Journal of American Science.** 6: 119-122.
- Džamić, A, M. Soković, M. Ristić, S. Grujić-Jovanović, J. Vukojević, y P. D. Marin (2008): Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (Lamiaceae) essential oil. **Arch. Biol. Sci., Belgrade.** 60: 233-237.
- Džamić, A, M. Soković, M. Ristić, S. Grujić-Jovanović, J. Vukojević, y P. D. Marin (2010): Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. **Botanica Servica.** 34: 57-61.

Escalona, V; P. Alvarado, V. Hernán, C. Urbina y A. Martín (2009): Manual de cultivo del tomate *Lycopersicum esculentum*. Facultad de CS. Agronómicas. Universidad de Chile.

Fadlinizal, M, K. Nagendra, K. Kin y A. Ismail (2009): Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from *Citrus* species. **Afr. J. Biotechnol.** 9: 326-330.

Fawzi, E.M, A.A. Khalil y A.F. Afifi (2009): Antifungal effect of some plant extracts on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. **Afr. J. Biotechnol.** 8: 2590-2597.

Fernández-López, Zhi, L. Aleson-Carbonell, J.A. Pérez-Alvarez, y V. Kuri (2005): Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat. Sci.** 69:371-380.

Ferreira , T, M. Camargo y R. Panizzi (2009): Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa. Phytopathol. Botucatu.** 35: 196-201.

Florido, M, D. Plana, M. Álvarez, C. Moya, R.M. Lara, M. Varela y T. Shagarodsky (2009): Evaluación de la tolerancia al calor a nivel de planta en el germoplasma de tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservado *Ex Situ*. **Cultrop.** 4: 1-6.

Fraternal, D, L. Giamperi, A. Bucchini, D. Ricci, F. Epifano, S. Genovese y M. Curini (2007): Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from Central Italy. **Chemistry of Natural Compound.** 43: 622-624.

Fried, B y Sherma, J (1999): **Thin-Layer Chromatography**. Fourth Edition. New York-Basel. 499 pp.ISBN 0-8247-0222-0.

Fungal Database Nomenclature and Species Banks. (<http://www.mycobank.org>).

Gantner, A.R (2008). **Flora de la República de Cuba**. Fascículo 14. Edit: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem der Freien Universität. Berlín, Alemania.134 pp.

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.

- Ghasemi, K, Y. Ghasemi y M.A. Ebrahimzadeh (2009): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. **Pak. J. Pharm. Sci.** 22: 277-28.
- Ghosh, S, E. Subudhi y S. Nayak (2008): Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. **I.J.I.B.** 2: 27-31.
- Gómez, Y, K. Gil, E. González y L. M. Farías (2007): Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela **Rev. Biol. Trop.** 55: 767-775.
- Gonzalez, O.E y Laguna, J.L (2004): Evaluación del comportamiento agroeconómico de once cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo el manejo del productor en el Valle de Sébaco. Matagalpa: Universidad Nacional Agraria.
- Gorinsteina, S, Z. Zachwiejab, E. Katricha, E. Pawelzick, R. Haruenkitd, S. Trakhtenberge, O. Martin-Bellosof (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.
- Gottwald T.R, T. Trocine y L. Timmer (1997): A Computer-Controlled Environmental Chamber for the Study of Aerial Fungal Spore Release, a computer. Phytopathology. Fungus *Alternaria* spp. **Chil. J. of Agricultural. Research.** 71: 231-239.
- Guerrero, D; E. Tamayo y D. Vuelta, (2008): Efecto de *Trichoderma harzianum* frente al patógeno *Cladosporium fulvum* (Cooke) en condiciones de laboratorio. Laboratorio Provincial Sanidad Vegetal. Santiago de Cuba. Universidad de Oriente.
- Guerrero-Rodríguez, E, S. Solís-Gaona, F.D. Hernández-Castillo, A. Flores-Oliva y V. Sandoval-López (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. **Revista Mexicana de Fitopatología.** 25: 48-53.
- Guimarães, R, L. Barros, J. Barreira, M. Sousa, A. Carvalho e I. Ferreira (2010): Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. **Food Chem. Toxicol.** 48: 99-106.
- Hadacek, F y Greger, H (2000): Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem. anal.** 11:137-147.

- 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.
- 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.
- Hernández, N.E, M.L. Tereschuk y L.R. Abdala (2000): Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi' del Valle (Tucumán, Argentina). **J. Ethnopharmacol.** 73: 317-322
- 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".
- Hussain, F, B. Ahmad, I. Hameed, G. Dastagir, P. Sanaullah y S. Azam (2010): Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of polygonaceae. **Afr. J. Biotechnol.** 9: 5032-5036.
- Hussin, N.M, R. Muse, S. Ahmad, J. Ramli, M. Mahmood, M.R. Sulaiman, M.Y.A. Shukor, M.F.A. Rahman y K.N.K. Aziz (2010): Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (Lecythidaceae). **Afr. J. Biotechnol.** 8: 2835-2842.
- Ignat, I, I. Volf y V.I. Popa (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chem.** 126: 1821-1835.
- International Plant Name Index (IPNI) (<http://www.ipni.org>).
- Itako, A.T, K.R.F. Schwan-Estrada, J.R. Stangarlin, J.B. Tolentino , M.E.S. Cruz (2009): Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arq. Inst. Biol.** 76: 75-83.
- Johann, S, B.G. Mendes, F.C. Missau, M.A. de Resende y M.G. Pizzolatti (2011): Antifungal activity of five species of *Polygala*. **Braz. J. Microbiol.** 42: 1065-1075.
- Johann, S, V. Lopes de Oliveira, M.G Pizzolatti, J. Schripsema, R. Braz-Filho, A. Branco, A. Smânia (2007): Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 102: 681-685.

- Jones, J.B, J. Jones, R. Stall y T. Zitter (1997): Compendium of Tomato Diseases. **St. Paul, MN: APS Press.** 1: 1-5.
- Kamran, M, M. Abert-Vian, A. Fabiano-Tixier, O. Dangles y F. Chemat (2010): Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chem.** 119: 851-858.
- Karimi, E. H, Z.E. 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.
- Karou, D, A. Savadogo, A. Canini, S. Yameogo, C. Montesano, J. Simpure, V. Colizzi y A.S. Traore (2006): Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **Afr. J. Biotechnol.** 5: 195-200.
- Khallil, A.R (2001): Phytofungitoxic Properties in the Aqueous Extracts of Some Plants. **Pak. J. Biol. Sci.** 4: 392-394.
- Klančnik, A, S. Piskernik, B. Jeršek, 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.
- Kumaresan, K, M. Subramanian, S. Vaithiyanatan, 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.
- Kurdelas, R.R, B. Lima, A. Tapia, G.E. Feresin, M. Gonzalez, M.V. Rodríguez, S. Zacchino, R.D. Enriz y M.L. Freile (2010): Antifungal Activity of Extracts and Prenylated Coumarins Isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (*Asteraceae*). **Mol.** 15: 4898-4907.
- Lattanzio, V, V.M.T. Lattanzio y A. Cardinali (2006): Role of phenolics in the resistance mechanisms of plant against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry.** 1: 23-67.
- Laugé, R, M.H.A.J. Joosten, J.P.W. Haanstra, P.H. Goodwin, P. Lindhout y P.J.G.M. De Wit (1998): Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 9014-9018.

- Lawrence, C.B, M.H. Joosten y S. Tuzun (1996): Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance, differential induction of patogénesis. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 48: 361–377.
- Lazarovits, G y Higgins, V.J (1976): Ultrastructure of susceptible, resistant, and immune -reactions of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. **Can. J. Bot.** 54: 235-249.
- Leiva-Mora, M, N. Veitía y Y. Alvarado-Capó (2006): Protocolo para la diferenciación de genotipos de papa mediante la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* Sor. en cantero y campo. **Biotecnología Vegetal.** 6: 45-49.
- Lourenço, V, A. Moya, F. González-Candelas, I. Carbone, L. Mafia y E. Mizubuti (2009): Molecular Diversity and Evolutionary Processes of *Alternaria solani* in Brazil Inferred Using Genealogical and Coalescent Approaches. **Popul Biol.** 99: 765-74.
- Luque de Castro, M.D y Garcia-Ayuso, L.E (1998): Soxhlet extraction of solid matrices: an outdated technique with a promising innovative future. **Anal. Chim. Acta.** 369: 1-10.
- Ma, Y, X. Ye, Y. Hao, G. Xu, G. Xu y D. Liu (2008): Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrason. Sonochem.** 15: 227-232.
- Mahlo, S.M, L.J. McGaw y J.N. Eloff (2010): Antifungal activity of leaf extracts from South African trees. **Crop Prot.** 29: 1529 -1533.
- Maity, P, D. Hansda, U. Bandyopahyay y D. Kumar (2009): Biological activities of crude extracts and chemical constituents of Bael, *Aegle marmelos* (L) Corr. **Indian. J Exp. Biol.** 47: 849-861.
- Mert-Turk, F (2006): Saponins versus plant fungal pathogens. **Journal of Cell and molecular Biology.** 5: 13-17.
- Mishra, A, M. Amita, HK. Kehri, B. Sharma y AK. Pandey (2009): Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** 8: 1-7.

Mónaco, C, A. Nico, M. Rollán y M. Urrutia (2001): Efecto «in vitro» de dos fungicidas sobre la micoflora antagonista al tizón temprano del tomate. **Invest. Agr: Prod. Prot. Veg.** 16: 325-332.

Mostahar, S, S. Alam y A. Islam (2006): Cytotoxic and antimicrobial activities of some synthetic flavones. **Indian. J. Chem.** 45: 1478-1486.

Muhammad, K.K, A.V. Maryline, F.T. Anne-Sylvie, D. Olivier y Ch. Farid (2010): Ultrasonically-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chem.** 119: 851-858.

Mujica, Y y Medina, N (2008): Respuesta del tomate (*Solanum lycopersicum* L) a la formulación líquida de cuatro cepas de *Glomus* en condiciones de campo. **Cultivos tropicales.** 29: 23-25.

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.

Murphy, M (1999): Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.** 12: 564-582.

Myco-ual (2004): Sistemática y aislamiento de los hongos. Grupo de investigación en Micología. Universidad de Almería; Área de Botánica. (<http://www.ual.es/Grupos.htm>)

Nantachit, K (2009): Antimicrobial Activity of *Cassia alata* Linn. Leaves (Caesalpinioideae). **J. Nat. Sci.** 8: 37-41.

Nduagu, C, E.J. Ekefan y A.O. Nwankiti (2008): Effect of some crude plant extracts on growth of *Colletotrichum capsici* (Synd) & Bisby, causal agent of pepper anthracnose. **Journal of Applied Biosciences.** 6: 184-190.

Nostro, A, M.P. Germano, V. D'Angelo, A. Marino y M.A. Cannatelli (2000): Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 379-384.

Ojala, T, S. Remes, P. Haansuu, H. Vuorela, R. Hiltunen, K. Haahtela y Pia Vuorela (2000): Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **J. Ethnopharmacol.** 73: 299-305.

- Olimpia G; A. Casanova; H. Laterrot y G. Anaïs (2000): Mejora genética y manejo del Cultivo del Tomate para la producción en el Caribe. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". La Habana. 159pp.
- Pacheco, E.C, O. Alves, P.L. Contente y L. Sebastiao (2006): Avalicao do óleo de copaíba (*Copaifera*) na inibicao do crescimento micelial *in vitro* de fitopatógeno. **Rev. Cien. Agrar.** 46: 53-61.
- Pan, Y, K. Wang, S. Huang, H. Wang , X. Mu, Ch. He, X. Ji, J. Zhang, F. Huang (2008): Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. **Food Chem.** 106:1264-1270.
- Pandey, M.K, R. Pandey, V.P. Singh, V.B. Pandey y U.P. Singh (2002): Antifungal Activity of 4',7-Dimethoxyisoflavone Against Some Fungi. **Mycobiology.** 30: 55-56.
- Penecilla, G y Magno, C. (2011): Antibacterial activity of extracts of twelve common medicinal plants from the Philippines. **J. Med. Plant. Res.** 5: 3975-3981.
- Peralta, I, S. Knapp y D. Spooner (2005): New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Syst. Bot.** 30: 424-434.
- Peralta, I, S. Knapp y D. Spooner (2006): Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Report of the Tomato (Genetics Cooyorative).** 56: 6-12.
- Peteira, B, D.F. Díaz, M. González-Chavez, B. Martínez e I. Miranda (2002): Búsqueda de un marcador RAPD asociado a la resistencia a *Alternaria solani* Sor. en tomate. **Rev. Protección. Veg.** 17: 6-13.
- Pfoze, N.L, Y. Kumar, B. Myrboh, R. Kumar y S. Ram (2011): *In vitro* antibacterial activity of alkaloid extract from stem bark of *Mahonia manipurensis* Takeda. **J. Med. Plant. Res.** 5: 859-861.
- Prabuseenivasan, S, M. Jayakumar y S. Ignacimuthu (2006): *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC. Complement. Altern Med.** 6: 1-8.
- Pupo Y.G, D.B. Kalombo, L. Herrera, D.I. Malheiros, B. Vargas (2011): Effect of plant extracts on growth and spore germination of *Alternaria solani* (E. & M.) J. & G. under *in vitro* conditions. **Rev. Iberoam. Micol.** 28: 60.
- 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.

- Pupo, Y (2010): Selección de extractos vegetales para el control de la alternariosis en *Solanum lycopersicum* L. y *Allium cepa* L. en sistemas agrarios urbanos. [tesis doctoral] Bayamo: Universidad de Granma.
- Pupo, Y, L. Herrera, B. Vargas, 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.
- Rahman, S, A. Khasru, R. Islam y M. Hossain (2011): Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water, Bangladesh. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** 10: 1-4.
- Rauha, J.P, S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela y P. Vuorela (2000): Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J Food. Microbiol.** 56: 3-12.
- Reddy, K.R.N, S.B. Nurdijati y B. Salleh (2010): An overview of Plant-Derived Products on Control of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins. **Asian J. Plant Sci.** 9: 126-133.
- Riffel, A, L. F. Medina, V. Stefani, R. C. 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.
- Rivas, S y Thomas C.M (2005): Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen: *Cladosporium fulvum*. **Annu Rev Phytopathol.** 43: 395-436.
- Rivera, A (2007): Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* Mol. cultivada *in vitro* en *Botrytis cinerea* Pers. [tesis doctoral]. Temuco: Universidad de la frontera.
- Rondón, Olivier, 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.
- Rotem, J (1994): The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Runyoro D.K, M.I. Matee, O.D. Ngassapa, C.C. Joseph y Z.H. Mbwambo (2006): Screening of Tanzanian medicinal plants for anticandidal activity. **BMC. Complement. Altern. Med.** 6: 11-21.

- Saif, M y Suganuma, T (2006): Antioxidant and antimicrobial activities of the methanol extracts from pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) fruits albedo tissues. **Eur. Food Res. Technol.** 224: 39-47.
- Salas, M.P, G. Céliz, H. Geronazzo, M. Daz y S.L. Resnik (2010): Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chem.** 124: 1411-1415.
- Sambath. K.R, S. Thangavel, S.S. Rajagopal, S. Palanavel, N. Ramalingam, G. Malaya y K.M. Upal (2006): Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Careya arborea* Roxb. Stem Bark. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics.** 5: 35-41.
- Sánchez-García, C, M. Cruz-Martín, Y. Alvarado-Capó, M. Pérez, M. Medinilla, M. Acosta-Suárez, M. Leiva-Mora y B. Roque (2007): Evaluación del efecto del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* para el control de microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. **Biotecnología Vegetal.** 7: 187-190.
- Saniewska, A, A. Jarecka, Z. Biały y M. Jurzysta (2006): Antifungal activity of saponins originated from *Medicago hybrida* against some ornamental plant pathogens. **Acta Agrobotanica.** 59: 51-58.
- Santamarina, M.P, J. Rosello, R. Yacer y V. Sanchos (2002): Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum*.
- Saonere, J.A (2011): An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. **Afr. J. Plant Sci.** 5: 390-395.
- Sarita, V (1993): Cultivo de tomate de mesa. Boletín Técnico No.19. Fundación de Desarrollo Agropecuario. Santo Domingo, República Dominicana.
- Sartoratto, A, A.M. Machado, C. Delarmelina, G.M. Figueira, M.C.T. Duarte y V.L.G. Rehder (2004): Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in brazil. **Braz. J. Microbiol.** 35:275-280.
- Schabra, S.C, F.C. Ulso y E.N. Mshin (1984): Phytochemical screening of tanzanian medical plants, **J. Etnopharmacol.** 11:157-159.
- Schwikkard, S y Heerden, F (2002): Antimalarial activity of plant metabolites. **Nat. Prod. Rep.** 19: 675-692.

- Shafiqur, MD, N. Sultana y M.N. Anwar (2004): *In Vitro* Antimicrobial Activity of olarrifine–24ol Isolated from the Stem Bark of *Holarrhena antidysenterica*. **Int. J. Agri. Biol.** 6: 698-700.
- Sharma, M.C y Sharma, S (2010): Phytochemical Screening and *In vitro* Antimicrobial Activity of Combined *Citrus paradisi* and *Ficus carica* Linn Aqueous Extracts. **Intl. J. Microbiol. Res.** 1: 162-165.
- Sharma, N y Tripathi, A (2006): Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Mycology and Plant Pathology Division.** 163: 337-344.
- Singh, A.K, M.B. Pandey y U.P. Singh (2007): Antifungal Activity of an Alkaloid Allosecurinine against Some Fungi. **Mycobiology.** 35: 62-64.
- Sivakumar, N y Venkataraman, R (2010): Phytochemical and pharmacological studies on plant waste materials. **Der Pharmacia Sinica.** 1: 1-6.
- Stadnick, M y Talami, V (2004). Legislacao e uso de productos naturais em países do Cone Sul. Manejo ecológico de doencas de plantas. CCA/UFSC. Florianópolis, Brasil.
- Stanojević, L, M. Stanković, V. Nikolić, L. Nikolić, D. Ristić, J. Čanadanovic-Brunet y V. Tumbas (2009): Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. **Sensors.** 9: 5702-5714.
- Stauffer, A, A. Oriego y A. Aquino (2000): Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y bactericida. **Revista de Ciencia y Tecnología.** 1: 29.
- Sumthong, P, R.R. Romero-González y R. Verpoorte (2000): solation and elucidation of quinones in *Tectona grandis*. **Division of Pharmacognosy**, Section of Metabolomics, Institute of Biology, Leiden University.
- Sule, I.O, T.O. Agbabiaka y G.P. Oyeyiola (2009): Tradomedical Values of Cotton Leaf Plus Lemon Juice Against Clinical Bacterial Isolates. **Ethnobotanical Leaflets.** 13: 522-531.
- Sun, Y, J. Wang, S. Gu, Z. Liu, Y. Zhang y X. Zhang (2010): Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of *Citrus reticulata* ‘Chachi’ Fruit by High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection. **Mol.** 15: 5378-5388.

- Takahashi, T, R. Kokubo y M. Sakaino (2004): Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Lett. Appl. Microbiol.** 39: 60-64.
- Tao, N, L. Y-jin y Z. M-ling (2010): Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Int. J. Food. Sci. Technol.** 44: 1281-1285.
- Thomma, B.P.H.J (2003): *Alternaria* spp: From general saprophyte to specific parasite. **Mol. Plant Pathol.** 4:225-236.
- Thomma, B.P.H.J, H. Van Esse, P. Crous y P. De Wit (2005): *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. **Mol. Plant Pathol.** 6:379-393.
- Torres, E, J. Iannacone, H. Gomez (2008): Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. **Bragantia**, Campinas. 67: 169 -178.
- Touré, A, C. Bahi, I. Bagré, JD. N'Guessan, AJ. 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.
- Tripoli, E, M. La Guardia, S. Giammanco, D. Di Majo y M. Giammanco (2007): Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chem.** 104: 466-479.
- Tsuzuki, J, T.I.E. Svidzinski, C. Shinobu, L.F.A. Silva, E. Rodrigues-Filho, D.A.G. Cortez e I.C.P. Ferreira (2007): Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **An Acad Bras Cienc.** 79: 577-583.
- Tuberoso, C.I.G, 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.
- Uchechi, N y Oghenerobo, V (2010): The antibacterial activity of crude leaf extract of *Citrus sinensis* (sweet orange). **International Journal of Pharma and Bio Sciences.** 1: 742-750.

Umeh, V.C; F. Kuku, E. Nwanguma, O. Adebayo y A. Manga (2002): A Survey of the Insect Pests and Farmers' Practices in the Cropping of Tomato in Nigeria. **Tropicultura**. 20: 181-186.

van den Ackerveken, G.F.J.M. Dunn, R.M. Cozijnsen, A.J. Vossen, J.P.M.J. van den Broek y P.J.G.M de Wit (1994): Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene A vr9 in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Mol. Gen. Genet.** 243: 277-285.

Vasudeva, N y Sharma, T (2012): Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Citrus limettioides* Tanaka. **Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research**. 1: 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.

Viuda-Martos, M, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López y J. Pérez-Álvarez (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.

Vloutoglou, I y Kalogerakisj, S.N (2000): Effects of inoculum concentration, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. **Plant Pathol.** 49: 339-45.

Wang, S.Y, P.F. Chen y S.T. 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.

Weingartner, D.P (1981): Early Bligh. **Compendium of Potato Diseases**. Hooker ed. American Phytopathological Society. St. Paul MN, USA. 43-44.

Wilson, C.L, J.M. Solar, A. El Ghaouth, y M.E. Wisniewski (1997): Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*. **Plant Dis.** 81: 204-210.

- Wubben, J.P, M.H.A.J. Joosten y P.J.G.M de Wit (1994). Expression and localization of two in planta induced extracellular proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Mol. Plant–Microbe. Interact.** 7:516-524.
- Wuthi-udomlert, M, P. Kupittayanant y W Gritsanapan (2010): In vitro evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivates of *Senna alata*. **Health Res.** 24: 117-122.
- Yamamoto, M, S. Nakatsuka, H. Otani, K. Kohmoto y S. Nishimura (2000): (+)-Catechin Acts as an Infection-Inhibiting Factor in Strawberry Leaf. **Biochem. Cell Biol.** 90: 595-600.
- Yanar, Y, A. Gökçe, I. Kadioglu, H. Çam 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.
- Zarrin, M, N. Amirrajab y B. Sadeghi-Nejad (2010): In vitro antifungal activity of *Satureja Khuzestanica* Jamzad against *Cryptococcus neoformans*. **Pak. J. Med. Sci.** 26: 880-882.
- Zhang L, Y. Shan, K. Tang, R. Putheti (2009): Ultrasound-assisted extraction flavonoids from Lotus (*Nelumbo nuficera* Gaertn) leaf and evaluation of its anti-fatigue activity. **Int. J.Phys. Sci.** 4:418-422.
- Zhao, H, G. Zong, J. Zhang, D. Wang y X. Liang (2011): Synthesis and Anti-Fungal Activity of Seven Oleanolic Acid Glycosides. **Mol.** 16: 1113-1128.
- Zvaigzne, G, D. Karklina, D. Seglina y I. Krasnova (2009): Antioxidants in various citrus fruit juices. **Cheminé Technologija.** 3: 56-61.

Anexo 1. Compuestos químicos y R_f identificados en extractos de hojas de naranjo dulce (ND); naranjo agrio (NA), lima persa (LMA), limón criollo (LMN) y mandarina (MAN), en etanol 70% (-et) y metanol 70% (-met) con actividad antifúngica frente a *P. fulva* y *A. solani*.

Extracto	Fase móvil	R_f	Compuesto identificado	Actividad antifúngica	
				<i>A. solani</i>	<i>P. fulva</i>
ND-E	PAA	0,50		+	+
		0,52		+	+
		0,58	Quinonas	-	+
		0,64	Quinonas	+	+
		0,74	Quinonas	-	+
		0,83		-	+
		0,93	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	-	+
	AMA	0,57		-	+
		0,96		-	+
	BAA	0,14		-	+
		0,18		-	+
		0,92		+	+
NA-E	PAA	0,83		+	+
		0,87	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	-	+
	AMA	0,45		+	+
		0,56		+	+
		0,72		+	-
		0,82	Alcaloides	+	-
		0,88	Alcaloides	+	-
	BAA	0,81		-	+
		0,99		+	

Extracto	Fase móvil	R_f	Compuesto identificado	Actividad antifúngica	
				<i>A. solani</i>	<i>P. fulva</i>
LMA-E	PAA	0,44		+	+
		0,72	Quinonas	+	-
		0,85	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
	BAA	0,1		-	+
		0,23		-	+
		0,54		-	+
LMN-E	PAA	0,32		+	+
		0,44		+	+
		0,50		+	+
		0,57		+	+
		0,90	Flavonoides sin OH en posición 5	+	-
	BAA	0,41	Flavonol y flavona	+	+
		0,58		-	+
		0,69		-	+
MAN-E	PAA	0,43		+	+
		0,50		+	+
		0,76	Quinonas	+	+
		0,83	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
		0,89	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
	BAA	0,18		-	+
		0,63		-	+
ND-M	PAA	0,39		+	+
		0,72	Quinonas	+	+
		0,76	Quinonas	+	+
		0,89	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
	AMA	0,60		+	+
	BAA	0,38		+	+

Extracto	Fase móvil	R_f	Compuesto identificado	Actividad antifúngica	
				<i>A. solani</i>	<i>P. fulva</i>
NA-M	PAA	0,76	Quinonas	+	+
		0,83		+	+
		0,90	Flavonoides sin OH en posición 5	+	+
	BAA	0,11		+	+
		0,62		+	+
	PAA	0,34		+	+
LMA-M	PAA	0,55		+	+
		0,76	Quinonas	+	+
		0,85	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
LMN-M	PAA	0,76	Quinonas	+	+
		0,82	Flavonoides metoxilados y coumarinas	+	+
	AMA	0,75		+	+
	BAA	0,02		-	+
		0,83	Flavonoles 3-glicosilados y flavonas	+	+
MAN-M	PAA	0,30		+	+
		0,57		+	+
		0,67		+	+
		0,76	Quinonas	+	+
		0,80	Flavonoides metoxilados y coumarinas	-	+
	AMA	0,92	Flavonoides sin OH en posición 5	-	
	BAA	0,83		+	+