



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Fitoalexinas en lima Tahití (*Citrus latifolia*): evaluación de la composición, actividad antifúngica e inducción mediante elicitores**

**César Darío Ramírez Pelayo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Escuela de Química  
Medellín, Colombia  
2018



# **Fitoalexinas en lima Tahití (*Citrus latifolia*): evaluación de la composición, actividad antifúngica e inducción mediante elicitores**

**César Darío Ramírez Pelayo**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Química**

Director:

Ph.D. Diego Luis Durango Restrepo

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Química de los Productos Naturales y los Alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Química

Medellín, Colombia

2018



*A Dios, mi madre y en especial al Prof.  
Pelayo por impulsarme a estudiar y  
superarme.*



## **Agradecimientos**

A Dios y a mi familia, por su apoyo incondicional. En especial a mi tía Martha por haber sido mi pilar en situaciones muchas veces adversas.

A mi tutor Diego Luis Durango por su acompañamiento permanente y aportes a mi crecimiento durante este proceso.

A los profesores Jesús Gil y Tatiana Lobo por su aporte y compañía en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de maestría y amigos del laboratorio de Separaciones Químicas Janio, Andrés, Diana, Leidy, Luisa, Samuel, David, Nataly, Daniela, Luis y Jose por su ayuda incondicional durante el desarrollo de este proyecto.

Especial agradecimiento a el profesor Winston Quiñones del grupo de Química Orgánica de Productos Naturales de la Universidad de Antioquía por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, en especial al grupo de investigación Química de los Productos Naturales y los Alimentos por permitirme hacer parte de él, a los laboratorios de Separaciones Químicas y Productos Naturales por hacer posible la realización de este trabajo.



## Resumen

El presente trabajo describe el aislamiento de seis cumarinas a partir de frutos de lima Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka): 5-geranoxi-7-metoxicumarina (I), 5,7-dimetoxicumarina (sin. Citroptene, II), 5,8-dimetoxipsoraleno (III), 5-metoxipsoraleno (sin. Bergapteno, IV), 5-geranoxipsoraleno (V) y 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxy)psoraleno (VI). Estos compuestos se purificaron usando técnicas cromatográficas estándar y se identificaron por métodos espectroscópicos ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN 1D y 2D, IR y UV). Posteriormente, se evaluó la actividad antifúngica (inhibición del crecimiento micelial y germinación de esporas) de las cumarinas contra el hongo causante de la antracnosis, *Colletotrichum* spp. (aislado de partes aéreas de lima Tahiti). Algunas cumarinas y mezclas de ellas, tales como citroptene y bergapteno, mostraron un efecto inhibitorio significativo (crecimiento radial y germinación de esporas) en comparación con el control. Finalmente, se desarrolló un método por cromatografía líquida (HPLC) para detectar y cuantificar las cumarinas, y estudiar el efecto de algunos elicitores reconocidos para inducir su producción en frutos de *C. latifolia* Tanaka. Los resultados mostraron que los perfiles cromatográficos son dependientes del elicitador aplicado. Como resultado de la inducción, se presentó un aumento significativo en la cantidad de algunas cumarinas, en comparación con los controles. En conclusión, las cumarinas aisladas podrían estar involucradas en los mecanismos de defensa de *C. latifolia* Tanaka y su acumulación puede ser modulada mediante la aplicación de elicitores.

**Palabras clave:** elicitores, fitoalexinas, fitoanticipinas, inhibición de la germinación de esporas, citropten.

## Abstract

The present work describes the isolation of six coumarins from fruits of Tahiti lime (*Citrus latifolia* Tanaka): 5-geranoxy-7-methoxycoumarin (**I**), 5,7-dimethoxycoumarin (syn. Citroptene, **II**), 5,8 -dimethoxypsoralen (**III**), 5-methoxypsoralen (syn. Bergaptene, **IV**), 5-geranoxypsoralen (**V**) and 5- (2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)psoralen (**VI**). These compounds were purified using standard chromatographic techniques and identified by spectroscopic methods ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR 1D and 2D, IR and UV). Subsequently, the antifungal activity (inhibition of mycelial growth and germination of spores) of the coumarins against the fungus causing the anthracnose, *Colletotrichum* spp. (isolated from aerial parts of lima Tahiti). Some coumarins and mixtures thereof, such as citroptene and bergaptene, showed a significant inhibitory effect (radial growth and spore germination) compared to the control. Finally, a method was developed by liquid chromatography (HPLC) to detect and quantify coumarins, and study the effect of some recognized elicitors to induce their production in fruits of *C. latifolia* Tanaka. The results showed that the chromatographic profiles are dependent on the applied elicitor. As a result of the induction, there was a significant increase in the amount of some coumarins, compared to the controls. In conclusion, isolated coumarins could be involved in the defense mechanisms of *C. latifolia* Tanaka and their accumulation can be modulated by the application of elicitors.

**Keywords:** elicitors, phytoalexins, phytoanticipins, spore germination inhibition, citropten.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas .....	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVI
Introducción .....	1
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
1.1 Generalidades de los cítricos y la lima Tahití .....	5
1.1.1 Lima Tahití .....	6
1.2 Importancia nutricional y económica de la lima Tahití. ....	7
1.3 Enfermedades en cítricos .....	8
1.4 Métodos de control de enfermedades en cítricos.....	10
1.5 Mecanismos de defensa de las plantas. ....	11
1.5.1 Fitoanticipinas .....	14
1.5.2 Fitoalexinas.....	18
1.5.3 Elicitores .....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo general.....	25
2.2 Objetivos específicos .....	25
<b>3. SECCIÓN EXPERIMENTAL .....</b>	<b>27</b>
3.1 Materiales y equipos .....	27
3.2 Material vegetal .....	28
3.3 Microorganismo .....	28
3.4 Inducción .....	28
3.5 Aislamiento, purificación e identificación de compuestos .....	29
3.6 Obtención de extracto.....	31
3.7 Detección y cuantificación de compuestos.....	32
3.8 Evaluaciones de actividad antifúngica <i>in vitro</i> .....	33
3.8.1 Crecimiento radial .....	33
3.8.2 Inhibición de germinación de esporas .....	34
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>37</b>
4.1 Aislamiento e identificación de compuestos en lima Tahití.....	37
4.2 Establecimiento de condiciones cromatográficas.....	45
4.3 Cuantificación de los metabolitos en el curso del tiempo .....	46
4.4 Evaluación de la actividad antifúngica .....	53
4.4.1 Crecimiento radial .....	53
4.4.2 Inhibición de germinación de esporas .....	57
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>61</b>
5.1 Conclusiones .....	61

5.2	Recomendaciones.....	62
<b>Anexo A:</b>	<b>Espectros de RMN, IR, UV .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo B:</b>	<b>Tablas de resultados.....</b>	<b>91</b>
<b>Bibliografía .....</b>		<b>103</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1</b> Fruto, hojas y flores de lima Tahití .....	6
<b>Figura 1-2:</b> Síntomas de enfermedades fúngicas en cítricos.....	9
<b>Figura 1-3:</b> Estructura de algunos plaguicidas empleados en la citricultura.....	11
<b>Figura 1-4:</b> Fitoanticipinas en corteza de: aguacate (A) y mango (B) .....	15
<b>Figura 1-5:</b> Estructura de fitoanticipinas .....	16
<b>Figura 1-6:</b> Fitoanticipinas a partir de constituyentes preexistentes.....	18
<b>Figura 1-7:</b> Acumulación de la fitoalexina 3-desoxiantocianinas en sitio de infección. .	19
<b>Figura 1-8:</b> Estructura de fitoalexinas en diferentes géneros y familias .....	20
<b>Figura 4-1:</b> (A) Compuestos aislados de lima Tahití y (B) fitoalexinas de cítricos. ....	43
<b>Figura 4-2:</b> Perfiles cromatográficos a diferentes condiciones.....	45
<b>Figura 4-3:</b> Cromatogramas de estándares aislados de lima Tahití y obtenidos de otras fuentes. ....	47
<b>Figura 4-4:</b> Curvas de calibrado de los compuestos (I), (II), (III y IV) y (V).....	48
<b>Figura 4-5:</b> Acumulación de (I) en el curso del tiempo. ....	50
<b>Figura 4-6:</b> Acumulación de (II) en el curso del tiempo.....	51
<b>Figura 4-7:</b> Acumulación de III y IV en el curso del tiempo. ....	52
<b>Figura 4-8:</b> Acumulación de (V) en el curso del tiempo. ....	52
<b>Figura 4-9:</b> Crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. en presencia de los diferentes compuestos aislados de lima Tahití (1,00 mM).....	54
<b>Figura 4-10:</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. con los compuestos aislados de lima Tahití. ....	54
<b>Figura 4-11:</b> Crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. en presencia de mezclas de dos compuestos aislados de lima Tahití. ....	55
<b>Figura 4-12:</b> Actividad antifúngica de mezclas de dos compuestos aislados de lima Tahití (1mM), expresada como porcentaje de inhibición de <i>Colletotrichum</i> spp. ..	55
<b>Figura 4-13:</b> Actividad antifúngica de mezclas de compuestos aislados de lima Tahití y algunas fitoalexinas reportadas en cítricos (1,00 mM), expresada como: <b>A</b> , crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. y <b>B</b> , porcentaje de inhibición de <i>Colletotrichum</i> spp .....	56
<b>Figura 4-14:</b> Crecimiento radial del hongo ( <i>Colletotrichum</i> spp.) frente a algunos compuestos aislados, mezclas de estos y fitoalexinas reportadas .....	57
<b>Figura 4-15:</b> Porcentaje de inhibición de germinación de esporas.....	58

**Figura 4-16:** Fotografías de esporas; A sin germinar y B germinadas. ....58

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1-1:</b> Mecanismos de defensa en plantas .....	12
<b>Tabla 1-2:</b> Clasificación de elicitores. ....	22
<b>Tabla 4-1:</b> Condiciones cromatográficas para el análisis de los compuestos de lima Tahití. ....	46

## Lista de Símbolos y abreviaturas

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>°C</b>	Grado Celcius
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CCD</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografía en capa delgada preparativa
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>cm<sup>-1</sup></b>	Centímetros inversos
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>DEPT</b>	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EP</b>	Éter de petróleo
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HMQC</b>	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>Hz</b>	Hertz
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
<b>IR</b>	Espectroscopia infrarroja
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>J-mod</b>	J-modulacion

<b>MeOH</b>	Metanol
<b>Me<sub>2</sub>CO</b>	Acetona
<b>PDA</b>	Medio de agar-papa-dextrosa
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>δ</b>	Desplazamiento químico en <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C



# Introducción

En los últimos años la población mundial se ha incrementado notablemente, al mismo tiempo que la demanda de alimentos. Este suceso se encuentra reflejado en el índice de producción de alimentos, que para el periodo de 2006 a 2016 se ha elevado en más del 25%. Las frutas no han sido ajenas a este fenómeno, y en el mismo periodo de tiempo su producción se ha incrementado en un 26 %. En el 2016 los cítricos representaron el 16.9% de la producción total de frutas, siendo uno de los más consumidos a nivel mundial [1]. En Colombia los cítricos tienen un espacio importante dentro de la industria agrícola, ocupando los primeros lugares de producción y áreas sembradas del renglón frutícola [2]. Se estima que el sector cítrico en Colombia generó en el 2009 más de 230 mil empleos entre directos (43 mil) e indirectos (188 mil) estos últimos asociados a procesos de comercialización en establecimientos especializados, plaza de mercado (mayoristas y minorista) y mercados móviles. Este renglón participa con aproximadamente el 24% de los empleos directos en el sector frutales y representa una gran oportunidad de generación de empleos puesto que sus cultivos requieren mano de obra permanente [3].

El cultivo de cítricos se caracteriza por ser permanente y presentar alta adaptabilidad a condiciones climáticas, lo que le facilita su cultivo en varias regiones o países, sumado a esto, Colombia disfruta de condiciones geográficas particulares, que le brindan la posibilidad de desarrollar este tipo de cultivos. Un cítrico que actualmente sobresale por su marcado crecimiento es la lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), que ha aumentado su producción en más de diez veces entre 2007 y 2016. Su comercialización a nivel internacional también ha incrementado, en el 2017 se exportaron más de 13 mil toneladas, valuadas en 13 millones de dólares aproximadamente [4].

Con el fin de aumentar la producción y el rendimiento de los cultivos de cítricos, Colombia ha desarrollado programas como: El Acuerdo Nacional de Competitividad de la Cadena Productiva de los Cítricos y la creación del Consejo Nacional Cítrico, que dentro de sus objetivos se planteó; impulsar y renovar los métodos tradicionales de producción;

incrementar la investigación y el desarrollo tecnológico; fortalecer los procesos de transferencia de tecnología y desarrollar mercados de bienes de factores de la cadena de los cítricos. Para así aprovechar las oportunidades de negocio en los diferentes mercados nacionales y extranjeros [3]. Como resultado de las nuevas políticas, el sector ha ganado dinamismo y ha crecido tanto en áreas cultivadas como en producción.

No obstante, estos esfuerzos han sido insuficientes y se requiere más investigación. Algunos de los problemas del sector cítrico en Colombia están relacionados con el control de microorganismos fitopatógenos que generan pérdidas y bajos rendimientos en los cultivos. Para hacer frente a esta situación, tradicionalmente se han utilizado plaguicidas sintéticos, que han traído consigo; consecuencias negativas en los ecosistemas circundantes a donde son aplicados, problemas de salud para quienes los manipulan, aumento en la resistencia de los patógenos e incremento en los costos de producción [5], [6]. Otro efecto no menos importante, es la residualidad de estos productos en alimentos que limita el acceso a mercados internacionales y disminuye los intercambios comerciales con otros países [7].

Es así, que surge la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos para el control de enfermedades. En ese sentido, el conocimiento de las interacciones entre los metabolitos secundarios de la planta y del microorganismo, de sus efectos, de los mecanismos de invasión y del metabolismo, ha permitido diseñar moléculas más activas y específicas [7], [8]. Dentro de estos metabolitos se encuentran las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que son sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular producidas por las plantas. Las primeras hacen parte de las defensas constitutivas de la planta y se encuentran previo al ataque de un microorganismo. Por su parte, las fitoalexinas pertenecen a las defensas activas y son sintetizadas solo después del ataque de un microorganismo patógeno o por algunos agentes químicos y físicos (denominados elicitores).

Este tipo de compuestos junto a los elicitores, ofrecen un excelente modelo estructural y bioquímico para el desarrollo de métodos novedosos de control de enfermedades en plantas, con efectos menos nocivos con el medio ambiente. Sin embargo, esta perspectiva no ha sido debidamente explorado ni aprovechado. Esto se debe en parte a que no se conocen los mecanismos y eventos que regulan su formación. Las perspectivas en cuanto

al empleo de las fitoalexinas y los elicitores para proteger cosechas y reducir el uso de plaguicidas de baja selectividad, se describen a continuación:

- Aplicar las fitoalexinas directamente en los cultivos.
- Usar las fitoalexinas como plantillas o modelos estructurales para el desarrollo de análogos más activos.
- Emplear las fitoalexinas como marcadores químicos de resistencia y diseñar métodos de selección de variedades o clones basados en su biosíntesis.
- Desarrollar elicitores y aplicarlos de manera exógena sobre la planta, para que se acumulen altas concentraciones de fitoalexinas antes de la interacción con microorganismos.

En el presente trabajo se realizó un estudio sobre la producción, actividad antifúngica y acumulación de fitoalexinas en frutos de Lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) como respuesta a la aplicación de diferentes elicitores. La ejecución del trabajo incluyó en primera instancia la inducción y aislamiento de algunas de las fitoalexinas presentes en frutos de lima Tahití por diferentes técnicas cromatográficas, confirmando sus estructuras por métodos espectroscópicos. Posteriormente se desarrolló una metodología de análisis por cromatografía líquida para la detección y cuantificación de dichos metabolitos. Se construyeron curvas de calibrado a cinco niveles, y se determinó el tiempo de retención de cada fitoalexina. Establecido el método de análisis, se evaluó la acumulación de fitoalexinas en frutos de lima Tahití en respuesta a varios elicitores. El análisis involucró aspectos como la concentración de los elicitores y la acumulación de fitoalexinas en el curso del tiempo. Finalmente, la actividad antifúngica de los compuestos aislados y algunos reportados como fitoalexinas en cítricos fueron evaluados.



# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Generalidades de los cítricos y la lima Tahití

Los cítricos se encuentran dentro de los principales árboles frutales cultivados alrededor del mundo y sus frutos, uno de los productos hortícolas más comercializados. Están integrados por numerosas especies con importancia que varía según el uso, los mercados, condiciones de crecimiento y zonas climáticas. Los cítricos hacen parte del género *Citrus*, el más amplio de la familia de las Rutaceae. La identificación taxonómica es compleja y el número de especies no se encuentra bien definido por la existencia de híbridos [9].

Dos esquemas para la clasificación taxonómica de los cítricos son empleados tradicionalmente; el sistema Swingle que reconoce 16 especies en dos subgéneros, *Citrus* y *Papeda*. El otro sistema taxonómico ampliamente utilizado y desarrollado simultáneamente con el de Swingle es el de Tanaka, que reconoce 162 especies independientemente de si es puro o un híbrido de dos o más especies o variedades. Actualmente se han realizado estudios moleculares que respaldan el supuesto que solo existen tres especies principales, *Citrus maxima*, *Citrus medica* y *Citrus reticulata*. Los demás tipos son híbridos de estos géneros [10].

Los cítricos alternativamente pueden ser clasificados en las siguientes categorías: [9]

- Naranjas dulces (Naranja Dulce, Valencia, Navel (*Citrus sinensis*))
- Mandarinas (Mandarina Común (*Citrus reticulata*); Satsumas (*Citrus unshi*); Tangerinas (*Citrus tangerina*); Clementinas (*Citrus clementina*))
- Naranjas agrias (Seville (*Citrus aurantium*))
- Limón (*Citrus limon*)
- Limas (*Citrus aurantifolia* and *Citrus latifolia*)
- Toronja (*Citrus paradisi*)
- Pomelo (*Citrus máxima*)

Las limas son un grupo de cítricos variado con características organolépticas bastante particulares. Se distinguen dos subgrupos, limas dulces y limas ácidas. La lima dulce (*Citrus limettioides* Tan.) también conocida como lima dulce India o lima Palestina, es empleada principalmente por sus propiedades medicinales. Sus frutos son de tamaño medio, de forma redonda a oblonga y de color amarillo claro en la madurez. Se caracteriza por presentar un zumo sin acides. Las limas ácidas, por su parte, presentan frutos con altos niveles de acides en su jugo; las dos especies más representativas son la *Citrus latifolia* Tan. y *Citrus aurantifolia*. Esta última es conocida como lima mexicana o rey, crece en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, sus frutos son pequeños de forma redonda a elíptica y presentan corteza fina [9], [11], [12].

### 1.1.1 Lima Tahití

La lima Tahití (*Citrus latifolia* Tan.) es también conocida como lima Persa o Bearss. Su origen no se encuentra bien definido, no obstante, estudios genéticos sugieren que es oriunda del sureste asiático, más precisamente del noreste de India y migro alrededor del mundo a través de las rutas comerciales. Es un híbrido del cruce de tres especies de plantas y al menos dos géneros diferentes. *C. latifolia* Tan. es un árbol pequeño que alcanza aproximadamente cinco metros de alto, las hojas son de color verde oscuro, ovals a ampliamente lanceoladas; su fruto es ovalado, de entre 4,7 y 6,3 cm de diámetro, presenta un peso promedio de 54g, es de aspecto verde oscuro y se torna amarillo al madurar, como se ilustra en la Figura 1-1. El fruto carece de semilla, presenta corteza gruesa y se produce durante todo el año, fue identificada por primera vez en 1875 en California – EE.UU. [13], [14], [15].

**Figura 1-1:** Fruto, hojas y flores de lima Tahití



## 1.2 Importancia nutricional y económica de la lima Tahití.

La lima Tahití, así como los demás frutos cítricos, es una valiosa fuente de nutrientes, posee una gran variedad de compuestos bioactivos, como vitaminas B y C, carotenoides, flavonoides, limonoides, minerales, fibra y altos contenidos de agua que pueden tener efectos positivos para la salud humana. Resalta en la lima Tahití los altos niveles de minerales en la pulpa y corteza de la fruta [16]. Adicionalmente, se le ha atribuido propiedades anticancerígenas, cardioprotectoras y de eliminación de radicales libres o antioxidante, así como también actividad bactericida, antiviral y antifúngica [17], [18].

El cultivo de cítricos a nivel mundial se encuentra liderado por China, con aproximadamente 33 millones de toneladas; Brasil con un poco más de 17 millones y Estados Unidos con cerca de 9 millones. Los frutos cítricos de mayor producción son las naranjas, le siguen las mandarinas y en tercer lugar se encuentran las limas y los limones. La producción de estos últimos la encabeza India, seguida muy de cerca por México con más de 1,7 millones de toneladas [19], [1].

Colombia no es un país líder en la producción de cítricos, pero cuenta con las condiciones agroecológicas para desarrollar este tipo de cultivos. En el tercer censo agropecuario realizado en Colombia en 2014 [2], los cítricos disponían del 12,7 % del área agrícola dedicada al cultivo de frutas y su producción fue de más de 600 mil toneladas. Para el 2016, si bien hubo una disminución en la producción general de cítricos, se destaca el crecimiento de la lima Tahití de un poco más del trescientos por ciento, siendo los departamentos de Santander, Antioquía y Tolima los que más contribuyeron a esta cifra [4].

En Colombia son pocos los lugares en los que se producen limones, sin embargo, se cultivan ampliamente las limas ácidas. Estas últimas tienen como principal finalidad el consumo en fresco, si bien sus características no son apropiadas para usarse como postre, presentan algunas ventajas sobre el resto de los cítricos. Dado sus múltiples usos las limas ácidas gozan de un mercado mucho más extenso; son empleadas en la producción de zumo concentrado, como saborizante en la preparación de dulces y bebidas carbonatadas, en la obtención de terpenos, pectinas, ácido cítrico y cascara deshidratada como espesante. En otro mercado que han ganado gran importancia es en el de los aceites esenciales, ya que sus aceites pueden ser usados en la industria de alimentos, farmacéutica, cosmética y en la elaboración de artículos de aseo [20], [21].

En consonancia con lo anterior, el interés de los mercados internacionales en lima Tahití ha incrementado en los últimos años. Adicionalmente, Colombia no presenta restricciones fitosanitarias y arancelarias frente algunos tratados comerciales, esto ha generado oportunidades de negocio que se reflejaron en el volumen de exportaciones. Para el periodo 2006 a 2016, el valor de las exportaciones de lima Tahití se duplicó, y en el 2016 estuvieron avaluadas en más de seis millones de dólares, representando el 74% del total de cítricos exportados [3], [4], [22].

### 1.3 Enfermedades en cítricos

Los cítricos son ampliamente cultivados alrededor del mundo, pero el óptimo desarrollo de las plantaciones se ve limitado por factores climáticos, edáficos y biológicos. Estos últimos proliferan fácilmente en frutos como los cítricos, que presentan altos contenidos de nutrientes, humedad y bajos valores de pH durante el periodo comprendido entre su cosecha y consumo. Por esta razón, en muchas regiones las enfermedades provocadas por microorganismos patógenos, son las responsables de las pérdidas y los bajos rendimientos en los cultivos [23], [24], [25].

La producción de lima Tahití en Colombia se ha incrementado en los últimos años. Para el 2007 la producción fue de 6 mil toneladas y en el 2016 superó las 79 mil toneladas. Este significativo incremento no ha estado en correspondencia con los rendimientos registrados, que en el mismo intervalo de tiempo se redujeron a la mitad, 15,4 toneladas por hectárea, muy por debajo del promedio de grandes productores, con 21,4 toneladas por hectáreas. Son variadas las razones de este fenómeno dentro de las que se destaca la falta de tecnificación y las enfermedades provocadas por microorganismos patógenos [4].

Las principales enfermedades en cítricos son causadas por virus, bacterias y hongos. Por su amplia distribución e importancia económica, las enfermedades más limitantes del cultivo de cítricos en Colombia son [24]:

Enfermedades Virales:

- Tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*)
- Psorosis (*Citrus psorosis virus*)
- Exocortis (*Citrus exocortis viroid*)

## Enfermedades bacterianas:

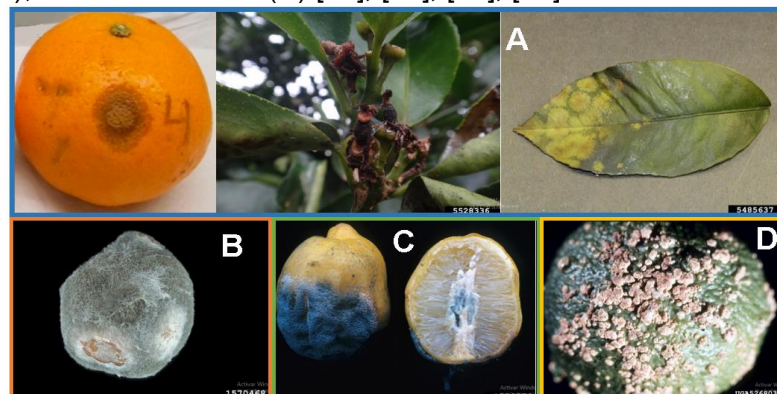
- Cáncer de los cítricos (*Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo*)
- Clorosis variegada de los cítricos (*Xylella fastidiosa*)

## Enfermedades Fúngicas:

- Gomosis o pudrición de raíces y tallos. Pudrición marrón o café en frutos (*Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora citrophthora*)
- El secamiento de los cítricos (*Ceratocystis fimbriata*)
- La mancha foliar o mancha café (*Alternaria tenuissima*)
- Roña (*Elsinoë fawcettii*)
- Caída prematura de flores y frutos (*Colletotrichum acutatum*)
- Pudrición gris (*Botrytis cinerea*)
- Pudrición negra (*Alternaria alternata*)
- Pudrición verde (*Penicillium digitatum* y *Penicillium. Italicum*)
- Pudrición de frutos (*Lasiodiplodia theobromae*)
- Antracnosis de los cítricos (*Colletotrichum gloeosporioides*)

La gran mayoría de enfermedades presentes en los cítricos Colombianos son provocadas por hongos fitopatógenos. Estos pueden actuar en diferentes partes de la planta, así como también en los frutos. Sobresalen los hongos *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, por su acción sobre las limas y limones [23], [24]. En la Figura 1-2 se enseñan frutos y partes aéreas de cítricos con enfermedades fúngicas.

**Figura 1-2:** Síntomas de enfermedades fúngicas en cítricos. Lesiones en fruto, flores y hojas por *Colletotrichum* spp (A), *Botrytis cinérea*. (B), *Penicillium. Italicum* (C), *Elsinoë fawcettii*. (D) [26], [27], [28], [29].



El género de hongos filamentosos y fitopatógenos *Colletotrichum* spp tienen gran incidencia económica en las regiones tropicales y subtropicales, ya que demerita la calidad y el rendimiento de la producción agrícola e incrementa los costos de la misma por los controles realizados. La enfermedad producida por este hongo se conoce como antracnosis, y se caracteriza por lesiones necróticas de color oscuro. Afecta tanto las partes aéreas, hojas y flores, como tejidos inferiores, raíces y tubérculos. Las infecciones en los frutos pueden ser latentes, en las cuales el patógeno permanece inactivo durante el proceso de desarrollo del fruto, hasta que este alcanza la madurez. En este punto se reanuda el desarrollo del patógeno y la infección progresa hasta los procesos de poscosecha, donde puede afectar a frutos recolectados, transportados o almacenados [30], [31], [32].

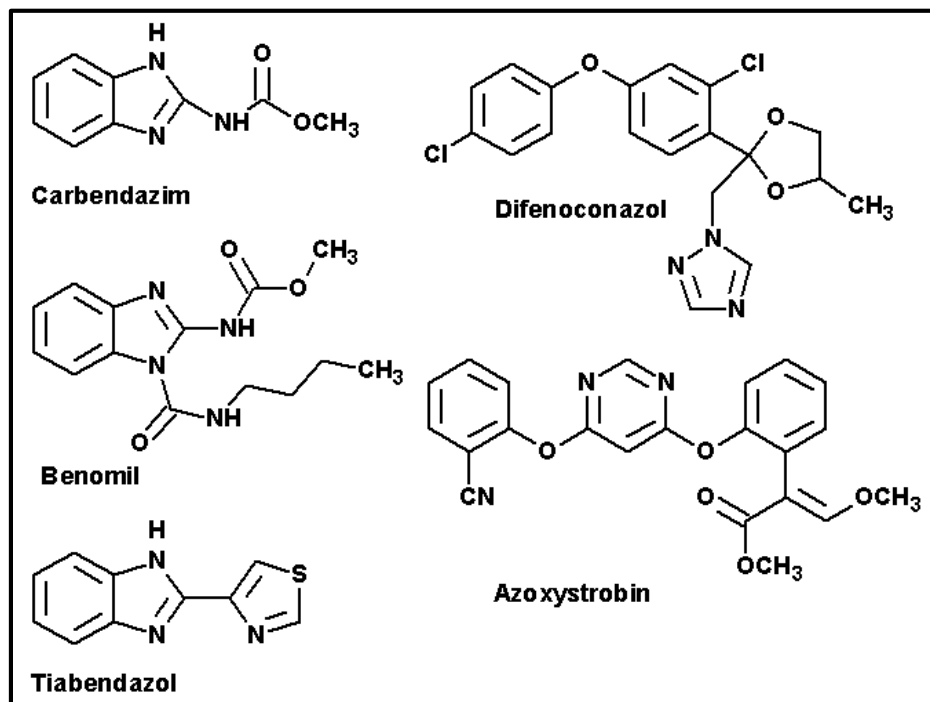
## 1.4 Métodos de control de enfermedades en cítricos

En Colombia el control de las enfermedades en los cítricos se adelanta desde dos perspectivas. La primera, enfocada en la prevención, que abarca el manejo integrado de plagas y enfermedades; esta consiste en el uso y desarrollo de estrategias que prevengan su aparición, adviertan oportunamente su presencia y mitiguen sus daños. Algunas de estas son: la adecuada selección del material a sembrar y el terreno, el diseño y mantenimiento del drenaje, podas fitosanitarias y de formación, así como también un adecuado método de cosechado, entre otros [32], [33]. Dentro de este primer enfoque también encontramos los injertos. Este método de propagación vegetativa es la unión en una sola planta, partes de plantas de manera tal que se unan y continúen su crecimiento como una sola. El objetivo de este sistema es acoplar variedades con distintas cualidades o atributos para mejorar características como: producción, calidad de frutos y tolerancia a enfermedades. Si bien Colombia viene desarrollando estrategias en este campo todavía faltan muchos más esfuerzos [34], [35].

La segunda perspectiva se encuentra orientada a subsanar o corregir los efectos provocados por los microorganismos patógenos. Métodos físicos, biológicos y químicos comprenden esta categoría. Colombia históricamente ha optado por el empleo intensivo y extensivo de métodos químicos; es decir, plaguicidas. En el cultivo de cítricos se maneja una gran variedad de plaguicidas, dependiendo del tipo de cultivo, el patógeno, el momento de aplicación y la persistencia del mismo. Algunos de los más empleados son:

Carbendazim, Fosetil Aluminio, Benomilo, Mancozeb, Azoxystrobin, Difenoconazol, Tiabendazol y Oxiclورو de cobre [24], [32]. La Estructura de algunos se muestra a continuación (Figura 1-3).

**Figura 1-3:** Estructura de algunos plaguicidas empleados en la citricultura.



El empleo de este tipo de sustancias químicas contrasta con los cuestionados efectos adversos a la salud humana y el medio ambiente; además de sobrecostos de producción. Plaguicidas como Carbendazin y Benomil, han sido considerados genotóxicos y de provocar alteraciones en las funciones y el desarrollo reproductivo [36], [37], [38]. Adicionalmente, el fungicida Mancozeb ha sido reportado como causante de dermatitis, irritación en la piel, el tracto digestivo y los ojos [39], [40].

## 1.5 Mecanismos de defensa de las plantas.

Las plantas en general están constituidas por una gran cantidad de sustancias o nutrientes, por lo que la mayoría de organismos las consideran fuente de alimento. Esto las ha llevado a lo largo de la evolución a desarrollar diferentes mecanismos de defensa, dirigidos no solo contra agentes bióticos, sino también contra agentes abióticos que puedan causar condiciones desfavorables para su normal desarrollo.

Las plantas para protegerse del daño provocado por patógenos han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa que se encuentran jerarquizados y concatenados. Estos mecanismos pueden agruparse en dos categorías: defensas constitutivas y defensas inducidas, que dependiendo de su naturaleza pueden ser físicas o químicas [41].

Las defensas constitutivas son la primera barrera de protección ante un patógeno. Son preformadas e incluyen tanto estructuras (físicas), como sustancias químicas (Tabla 1-1) [42], [43]. Las últimas, llamadas fitoanticipinas, son sintetizadas a través del metabolismo primario de la planta, y se encuentran durante todo el proceso de crecimiento de la planta en forma activa o a la espera de una reacción bioquímica para su funcionamiento.

Las defensas inducidas constituyen las barreras activas de las plantas (Tabla 1-1) [41], [43]. Son originadas como resultado de estímulos o factores externos. Al igual que las defensas constitutivas pueden ser físicas o químicas. Las primeras involucran la modificación de estructuras y tejidos. Las segundas, por su parte, son sustancias de diversa naturaleza química que surgen del metabolismo secundario de la planta. Pueden ser enzimas, inhibidores enzimáticos, compuestos antimicrobianos denominados fitoalexinas, compuestos proteicos entre otros.

**Tabla 1-1** Mecanismos de defensa en plantas

	<b><i>Constitutivas</i></b>	<b><i>Inducidas</i></b>
<b><i>Físicas</i></b>	Corteza	Síntesis de Cutina
	Pared Celular	Síntesis de Callosa
	Tricomas	Síntesis de Tilosa
	Cierre de Estomas	Síntesis de Lignina
	Películas cerosas	Síntesis de Suberina
<b><i>Químicas</i></b>	Fitoanticipinas	Especies reactivas de Oxígeno
	Inhibidores enzimáticos	Hormonas de Defensa
	Proteínas antifúngicas	Síntesis de Proteínas
		Síntesis de Fitoalexinas
		Apoptosis

Otro rasgo importante y del cual depende el éxito de los mecanismos de defensa, es el sistema de vigilancia y reconocimiento. Este es el encargado de registrar los peligros potenciales y dar respuesta antes que el patógeno genera afectaciones graves. La respuesta inmune se da a través de dos formas interconectadas: la respuesta basal o innata y la respuesta hipersensible. La respuesta basal se acciona a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos [44]. Aquí, múltiples respuestas son generadas, provenientes de las defensas constitutivas e inducidas, contra la mayoría de los microbios. La otra línea de respuesta es la hipersensible, esta se caracteriza por la muerte deliberada de las células en el sitio de la infección, llamada muerte celular programada (PCD). Se trata de un mecanismo de defensa inducido mucho más específico, ya que solo hospederos que logren adquirir o desarrollar ciertas proteínas de resistencia capaces de reconocer efectores asociados a patógenos, logran desencadenar esta respuesta [43], [45].

Para que un hongo fitopatógeno logre una lesión y un desarrollo exitoso sobre algún tejido de la planta o fruto, un conjunto de sucesos ordenados debe ocurrir. El origen de un proceso infeccioso fúngico comienza con la dispersión y adhesión de las esporas sobre el hospedero (fruto). En este punto el patógeno se encuentra con las defensas físicas constitutivas del fruto, como la cutícula cerosa, que genera interacciones hidrofóbicas para evitar la adhesión de las esporas y la acumulación de humedad en la superficie, evitando un ambiente fisiológico favorable para su germinación. Para superar esta barrera, el patógeno segrega una película, de naturaleza química variable, que media la adhesión. Posteriormente, el hongo tiene que penetrar a su hospedero, para lo que cuenta con muchas estrategias y herramientas. Una de esas es el empleo de enzimas hidrolíticas, cutinasas y celulasas entre otras, para degradar la pared celular y así ingresar [46]. Sin embargo, el fruto puede resistir la penetración del patógeno y evitar su establecimiento dentro del tejido. La reducción de la agresión se logra gracias a una serie de sustancias preexistentes y almacenadas en depósitos estratégicamente ubicados. Estas sustancias, que hacen parte de las defensas químicas constitutivas, pueden ser proteínas antifúngicas, inhibidores enzimáticos o fitoanticipinas entre otros [47], [48].

Burladas o superadas las barreras constitutivas por el patógeno, su siguiente paso es la colonización y desarrollo. Simultáneamente es accionada la respuesta basal en el hospedero a través del reconocimiento de patrones molecular asociados a patógenos. Es aquí, donde las defensas inducidas entran en funcionamiento. Primero se da la alteración

de la pared celular en la región circundante al lugar de infección, procesos de lignificación, acumulación de callosa y celulosa entre otros, son ejecutados [49], [50]. Como segunda medida se origina la síntesis *de novo* de toxinas conocidas como fitoalexinas, proteínas y enzimas hidrolíticas como quitinasas o gluconasas [51]. En última instancia se encuentra la respuesta hipersensible, que implica una forma compleja de muerte celular programada. Tiene como finalidad evitar el abastecimiento de nutrientes por parte del patógeno y así finalizar su proliferación [52].

Inmediatamente la respuesta hipersensible es activada en el lugar de la infección, se desencadena una señal de resistencia sistemática, no específica al resto de la planta. Esta resistencia es conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR). Concede protección de larga duración contra infecciones ulteriores, para una amplia variedad de patógenos en partes distantes no infectadas de la planta. Esta resistencia es mediada por un sistema de señalización capaz de transmitirse entre los tejidos. Se cree que la hormona vegetal ácido salicílico (AS) hace parte de este sistema de señalización en el SAR. Esta hormona se acumula en el lugar de la infección y después se difunde a través del sistema vascular de la planta [53].

### 1.5.1 Fitoanticipinas

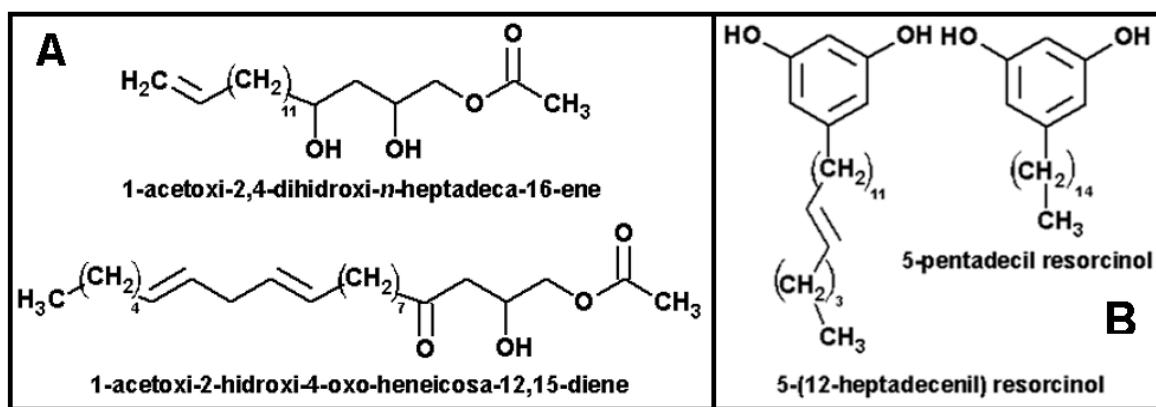
Las plantas producen una serie de compuestos químicos con funciones no esenciales, que median las interacciones entre éstas y su entorno. Una de estas funciones está relacionada con los mecanismos de defensa [54]. Así, por ejemplo, encontramos las fitoanticipinas que agrupan a una serie de sustancias antimicrobianas. El término fitoanticipinas fue acuñado en 1990 por J. W. Mansfield. Este hace referencia a los compuestos de bajo peso molecular, presentes en las plantas previo al ataque de un microorganismo o a los producidos, posteriormente a la infección, a partir de constituyentes preexistentes [55].

La producción de fitoanticipinas en las plantas es una capacidad bastante generalizada en éstas. Se han logrado identificar en un gran número de familias y géneros, sugiriendo que es una habilidad adquirida de procesos evolutivos antiguos. Estos compuestos presentan gran diversidad tanto en su estructura química como en su modo de acción. Se pueden agrupar en dos categorías: metabolitos antimicrobianos de acción previa a la infección, presentes en concentraciones suficientes para inhibir el desarrollo de un patógeno, y

metabolitos antimicrobianos en respuesta a una infección, pero sintetizados a partir de sustancias ya elaboradas [56].

Numerosos compuestos preformados han sido identificados en la corteza de frutos, tubérculos, plantas herbáceas y cereales entre otros. Además, han presentado actividad antimicrobiana *in vitro*, por lo que se les ha asociado con fitoanticipinas de acción previa a la infección [57]. Así, por ejemplo, en la corteza de aguacates se reconoció la presencia de dienos y alquenos de cadena larga con actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*. El contenido de dienos fue relacionado con el grado de madurez del fruto y la actividad antifúngica, encontrándose mayor susceptibilidad al hongo en frutos con estados de maduración más avanzados y niveles de dienos menores. De manera semejante, en corteza de mango se consiguió el aislamiento de una mezcla de compuestos antifúngicos, derivados del resorcinol, que presentaron igual relación entre concentración, estado de maduración y actividad antifúngica [58]. En la Figura 1-4 se presentan las estructuras de los compuestos anteriormente mencionados.

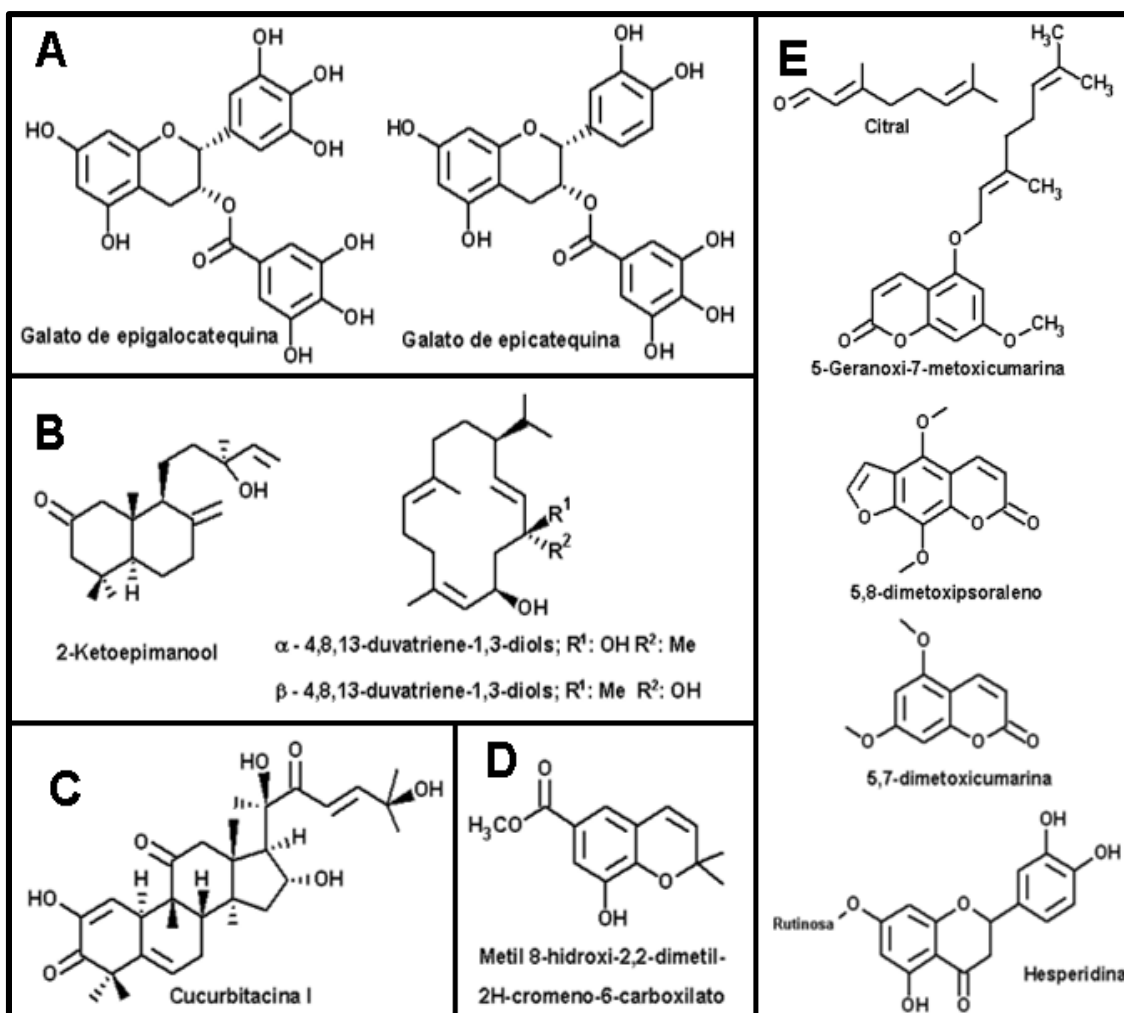
**Figura 1-4:** Fitoanticipinas en corteza de: aguacate (A) y mango (B)



Otros ejemplos que resaltan lo heterogéneo de la estructura química de las fitoanticipinas son: los compuestos polifenoles presentes en hojas de té verde con actividad antiviral y antibacteriana *in vitro* [59], [60]; diterpenos en la superficie de hojas de ciertas especies de tabaco resistente a hongos del género *Erysiphales* [61], [62]; triterpenos en frutos de la familia Cucurbitaceae que otorgan resistencia al ataque de *Botrytis cinérea* [63]; benzopiranos como los aislado de hojas de *Piper aduncum* que presenta actividad antifúngica y antibacterial [64], [65]. Cabe destacar, que en cítricos son múltiples y de diversa naturaleza química (terpenoides, cumarinas y flavonoides) los compuestos

preformados con un rol defensivo [66], [67], [68]. Las estructuras de los compuestos anteriormente mencionados se muestran en la Figura 1-5.

**Figura 1-5:** Estructura de fitoanticipinas: polifenoles de Té (A), diterpenos de tabaco (B), triterpeno de la familia Cucurbitaceae (C), benzopirano de *Piper aduncum* (D) y fitoanticipinas en cítricos (E).



El otro grupo de fitoanticipinas, las sintetizadas a partir de constituyentes preexistentes, no se encuentran en la planta de manera superficial como las anteriormente mencionadas. Este tipo de compuestos, en forma inactiva, son almacenados en orgánulos como las vacuolas al interior de las células. La liberación de la forma activa se da cuando entra en contacto con enzimas, generalmente hidrolizantes, producto de daños en tejidos por patógenos, microorganismos o herbívoros [69]. Dentro de estos compuestos encontramos saponinas, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y otros compuestos.

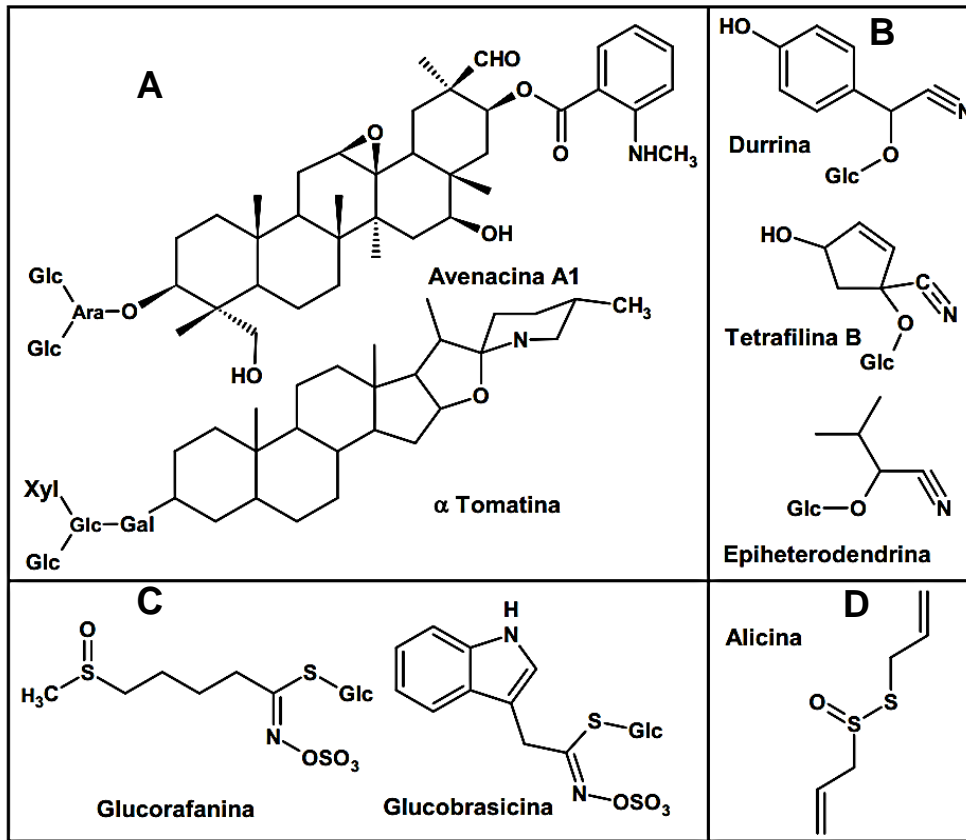
Las saponinas son moléculas glicosiladas y pueden ser terpenos, esteroides o alcaloides esteroidales. Son producidas por muchas plantas, pero principalmente por dicotiledóneas como defensa contra hongos fitopatógenos [70]. Ejemplos de saponinas que han sido estudiadas por su papel defensivo en plantas se muestran en la Figura 1-6 A. La Avenacina A-1 es una saponina triterpenoide presente en las raíces de especies de avena (*Avena spp.*) y la Tomatina  $\alpha$  es una saponinas alcaloide esteroidea identificada en la familia Solanaceae a la que pertenece el tomate [57], [71]. Estas saponinas presentan cadenas de azúcares unidas en la misma posición. Se cree que su actividad antifúngica está relacionada con la capacidad que tienen de formar complejos con esteroides de la membrana fúngica y así causar pérdida de la integridad de la membrana [72], [73].

Los glucósidos cianogénicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores y los emplean principalmente como disuasores alimentarios contra herbívoros. Son  $\alpha$ -hidroxinitrilos glicosilados derivados de aminoácidos como tirosina, fenilalanina, valina entre otros [74] y su función biológica se produce cuando se hidroliza el glucósido cianogénico, por acción de enzimas hidrolíticas, produciendo cianuro de hidrógeno [75]. Ejemplo de este tipo de compuestos se encuentran en la Figura 1-6 B.

Los glucosinolatos son glucósidos que contienen azufre y se encuentran en plantas de la familia Brassicaceae que incluye el género *Brassica* con múltiples especies de interés agronómico. Los glucosinolatos se dividen en tres categorías según el tipo de cadena lateral que presente. Pueden ser derivados de  $\alpha$ -aminoácidos alifáticos, indólico o arilalquilos. La hidrólisis de estos compuestos genera especies como tiocianatos, isotiocianatos y nitrilos, que son los responsables de la actividad biológica [76], [77]. La importancia de estos compuestos está relacionada con el papel que desempeñan en la interacción planta-insecto, que puede ser atrayente o de disuasión alimentaria [78]. Ejemplos de estos compuestos se encuentran en la Figura 1-6 C.

Hay otra clase de compuestos que no pertenece a los grupos anteriormente mencionados y desempeñan funciones defensivas como fitoanticipinas. Así, por ejemplo, el compuesto azufrado alicina (Figura 1-6 D) presente en ajo (*Allium sativum*) ha mostrado actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*. Esta sustancia no se encuentra de forma natural en el ajo; su formación ocurre cuando la enzima alinasa y el sustrato aliina entran en contacto por daños en los tejidos del bulbo de la planta [79], [80].

**Figura 1-6:** Fitoanticipinas a partir de constituyentes preexistentes: saponinas (A), glucósidos cianogénicos (B), glucosinolatos (C) y otros grupos (D).



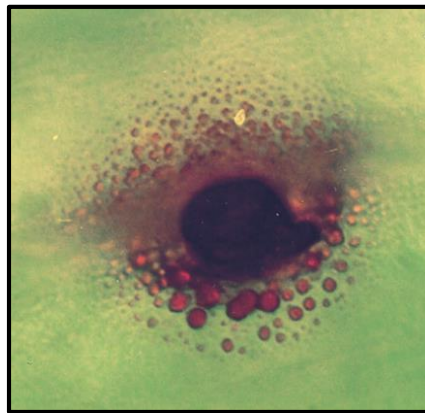
### 1.5.2 Fitoalexinas

La producción de fitoalexinas, son uno de los múltiples mecanismos de defensa utilizados por las plantas. Este término se usó hace más de 70 años, por los investigadores Müller y Borger, para agrupar a un conjunto de sustancias antimicrobianas. Si bien se habían recogido observaciones que hacían pensar en un periodo de respuesta defensiva en las plantas ante enfermedades, solo evidencias claras se presentaron con ensayos sobre *Solanum tuberosum* (papa). Estas fueron expuestas al hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío o mildiu de la papa, observándose la producción de compuestos fungitóxicos que inhibían el crecimiento del microorganismo. Recientemente, las fitoalexinas han sido consideradas como compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular sintetizados por las plantas como respuesta a enfermedades o estrés [81], [55]. La producción de escoparona, fitoalexina de los cítricos, puede ser inducida por diferentes

patógenos (*Botrytis cinérea*, *Penicillium digitatum* y *Phytophthora citrophthor*) y por radiación UV [67], [82], [83].

Una de las características que presentan las fitoalexinas es la síntesis *de novo*; es decir, que no deben estar preformadas en los tejidos o ser liberadas a partir de sustancias preexistentes. También hay que mencionar que su acumulación solo se da en los lugares donde se produce la infección, logrando alcanzar concentraciones lo suficientemente altas como para inhibir el crecimiento del patógeno (Figura 1-7). Adicionalmente, y por ser considerado un mecanismo de defensa activo, su empleo requiere un gasto energético.

**Figura 1-7;** Acumulación de la fitoalexina 3-desoxiantocianinas en sitio de infección [57].

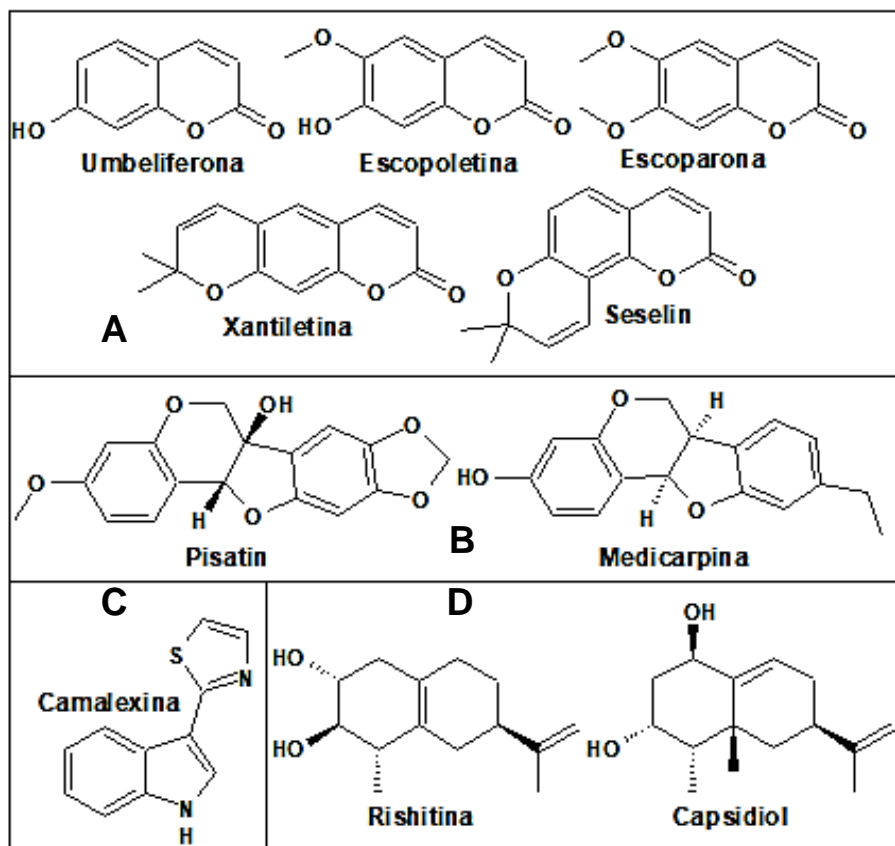


Otros aspectos importantes de las fitoalexinas son el modo de acción y el efecto antimicrobiano, estos varían entre fitoalexinas y en algunos casos no están bien definidos. Algunas tienen afinidad por los lípidos, como es el caso de la camalexina presente en *Arabidopsis thaliana*, que altera la membrana de la bacteria *Pseudomonas syringae* afectando su normal funcionamiento [84]. Otras fitoalexinas afectan procesos de respiración disminuyendo la capacidad de captar oxígeno, esto puede ser exhibido por compuestos del tipo estilbenoide, los cuales alteran los procesos de respiración en conidios de *Botrytis cinérea* [85].

Se han logrado caracterizar aproximadamente 350 fitoalexinas, de alrededor de 900 especies de plantas pertenecientes a 40 familias. La familia más estudiada ha sido la Fabácea con cerca de 600 especies y 130 compuestos identificados. Las fitoalexinas están presentes tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas incluyendo arroz, maíz, sorgo, trigo, cebada, cebolla y lirios, y se han aislado a partir de todas las partes de la

planta, aunque no todos los órganos producen necesariamente el o los mismos compuestos [81], [86]. Debido a que las fitoalexinas son un grupo de compuestos químicamente heterogéneo, prácticamente todas las clases de productos naturales se encuentran representadas; compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, poliacetilenos entre otros. En general hay una correlación entre el tipo de fitoalexina producida por una planta y la familia a la que esta pertenece. Así, isoflavonoides como la pisatina y la medicarpina (Figura 1-8) son comunes en la familia Fabácea, pero no han sido reportados en Solanaceae; mientras que las fitoalexinas sesquiterpénicas, capsidiol y la rishitina, que son comunes en Solanaceae no han sido reportadas en Fabáceas. Otros ejemplos son: la familia Brassicaceae, que produce compuestos de azufre basados en indol, como la camalexina [80], [87], [88]. En el género *Citrus* perteneciente a la familia Rutaceae, con gran importancia a nivel agroindustrial, se han identificado derivados cumarínicos como fitoalexinas (Figura 1-8) [89], [90], [91], [92].

**Figura 1-8:** Estructura de fitoalexinas en diferentes géneros y familias: *Citrus* (A), Fabaceae (B), Brassicaceae (C), Solanaceae (D).



### 1.5.3 Elicitores

Los mecanismos de defensa activos de las plantas han despertado gran interés en la industria agrícola, ya que se muestran como una alternativa a los métodos tradicionales de control de plagas. En ese sentido, numerosos son los estudios que buscan comprender como funciona esta clase de defensa en las plantas. La clave, al parecer, son los elicitores, sustancias químicamente diversas que reconocen las plantas como señales para activar sus sistemas de protección [93].

El término elicitor fue empleado inicialmente para hacer referencia a moléculas capaces de estimular la producción de fitoalexinas; sin embargo, ha sido ampliado a otros tipos de respuesta fisiológica [94]. Por ejemplo, han sido relacionados con la modificación de la pared celular, síntesis de proteínas, síntesis de enzimas entre otros. También hay que mencionar que algunos producen efectos selectivos, aunque en la mayoría de los casos se genera un grupo de respuestas paralelas o secuenciadas [95], [96], [97]. Las estructuras de los elicitores son extensamente diversas. Por esta razón, se descartan patrones universales de señalización que activen las defensas de las plantas [98].

El reconocimiento de los elicitores por parte de la planta, se da a través de receptores en las células vegetales. Estos receptores pueden encontrarse en la superficie de la célula, como sucede con receptores de elicitores de origen fúngico, o en el interior como ocurre para los de origen bacteriano. Se cree, que los elicitores al ser percibidos por los receptores de la planta, desencadenan una serie de eventos metabólicos, que por lo general finalizan en una respuesta de defensa, como la acumulación de fitoalexinas en el sitio de infección. Dentro de estos eventos encontramos reconocimiento, transcripción y transducción de genes específicos que resultan en la inducción *de novo* de enzimas para la biosíntesis de fitoalexinas [99], [100], [101]. Por otra parte, los elicitores pueden ser categorizados en generales o específicos. Los primeros hacen referencia a moléculas con la capacidad de inducir defensas tanto en plantas hospedadoras como no hospedadoras. Por ejemplo, carbohidratos y proteínas de las paredes celulares de los hongos. Mientras que los segundos inducen respuestas defensivas solo en variedades específicas [102].

Los elicitores se clasifican en dos grupos (Tabla 1-2): bióticos y abióticos para describir respectivamente, inductores que son de origen biológico o aquellos de origen químico o físico [103]. Los inductores bióticos corresponden a hongos, bacterias, virus y nematodos. Los inductores abióticos se subdividen en abióticos químicos y abióticos físicos; entre los

primeros están algunas sustancias químicamente disimiles. Estas sustancias probablemente actúan en formas diferentes en cada caso; sin embargo, el resultado es un cambio notable en el metabolismo de la planta que ha sido expuesta [104]. Por su parte, los abióticos físicos incluyen la luz ultravioleta, los cortes y congelamiento del material vegetal.

**Tabla 1-2:** Clasificación de elicitores.

<b>Bióticos</b>	Hongos, Bacterias, Virus, Nemátodos
<b>Abióticos</b>	<b>Físicos:</b> Radiación ultravioleta, daño mecánico, estrés térmico
	<b>Químicos:</b> Microbianos (Oligosacáridos, Glicoproteínas, Glicopéptidos, Elicitinas); Sales de metales pesados (Cu, Cd, Hg, Fe); Inhibidores metabólicos (Cicloheximida, Actinomicina D); Otros: Hormonas, solventes, fungicidas.

Otra forma de clasificar los elicitores es, atendiendo a su origen en endógenos y exógenos. Los exógenos, se consideran las primeras señales de interacción planta patógeno y provienen del agresor. Su naturaleza química es bastante diversa, se han identificado proteínas, oligosacáridos, glicoproteínas, ácidos grasos y derivados. Pero presentan como característica común ser constituyentes estructurales de la superficie del patógeno. Estos pueden ser desprendidos espontáneamente o por la acción de enzimas hidrolíticas generadas por el hospedero [94], [105], [106]. Por su parte, los elicitores endógenos provienen del hospedero y surgen como resultado de la acción del patógeno sobre este. Dependiendo del tipo, pueden generar respuestas tanto localizadas como sistémicas. Los elicitores son liberados por daños celulares o la muerte debido a heridas, una respuesta de hipersensibilidad o la acción de enzimas provenientes de patógenos. Los más estudiados han sido los derivados de los componentes pécticos de las paredes celulares. Otras señales también han sido caracterizadas como el ácido jasmónico y el polipéptido de 18 aminoácidos, conocido como Systemin [107], [108], [109].





## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la producción y actividad antifúngica de fitoalexinas en frutos de la especie vegetal *Citrus latifolia* Tanaka como respuesta a la aplicación de elicitores de origen natural.

### 2.2 Objetivos específicos

- Aplicar diferentes elicitores de origen natural en frutos de la especie *C. latifolia* Tan. para estimular la producción de fitoalexinas.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas algunas de las fitoalexinas presentes en los frutos de la especie vegetal *C. latifolia* Tan. e identificar sus estructuras por métodos espectroscópicos.
- Desarrollar un método cromatográfico para detectar y cuantificar las fitoalexinas en frutos de la especie vegetal *C. latifolia* Tan.
- Determinar la acumulación de fitoalexinas en frutos de la especie vegetal *C. latifolia* Tan. en el curso del tiempo como respuesta a la aplicación de elicitores de origen natural.
- Evaluar la actividad antifúngica de fitoalexinas de la especie *C. latifolia* Tan. contra algún hongo promotor de enfermedad en cítricos.



## 3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 3.1 Materiales y equipos

Para la purificación de los compuestos se emplearon diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía de columna, CC, y de capa delgada, CCD). Como fase móvil se usaron los solventes éter de petróleo (EP), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetato de etilo (EtOAc), etanol (EtOH), metanol (MeOH) y acetona; grado analítico y comercial (previamente purificados por bidestilación y secado con sulfato de sodio anhidro). Para la cromatografía en columna se utilizaron columnas cromatográficas de vidrio con llave de teflón y como fase estacionaria sílica gel 60 (0.040-0.063 mm; Merck) y Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). El seguimiento de los compuestos se hizo mediante CCD en placas de aluminio con fase estacionaria de sílica gel (Si 60 F<sub>254</sub>, 20x20 cm, 0.25 mm, Merk). Los compuestos se visualizaron bajo radiación UV a 254 y 365 nm, y mediante aspersion con la mezcla AcOH: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: H<sub>2</sub>O (143:28:30) y solución de FeCl<sub>3</sub> al 5%, seguido por un calentamiento breve.

La caracterización e identificación de los compuestos fue realizada por métodos espectroscópicos modernos tales como espectroscopia ultravioleta (UV/Vis), infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN) mono (<sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C- RMN) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC). Los espectros de infrarrojo se tomaron en un equipo FT-IR Spectrum two Perkin Elmer (refractancia total atenuada, ATR), mientras que los espectros de resonancia se determinaron usando CDCl<sub>3</sub> en un espectrómetro Bruker AMX 300 (300 MHz para <sup>1</sup>H y 75 MHz para <sup>13</sup>C).

La acumulación de los compuestos en el curso del tiempo fue evaluada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) en un equipo Shimadzu Prominense con detector de arreglo de diodos (SPD-M20A), software LabSolutions Lite versión 1.22 SP1 y columnas RP-C18 Zorbax Eclipse Plus (150 mm x 4,6 mm – 5 μm) Agilent Technologies y RP-C18 Luna (150 mm x 4,6 mm – 5 μm) Phenomenex con gradiente de solventes acetonitrilo (ACN), metanol (grado HPLC) y agua desionizada.

Los ensayos de actividad antifúngica se llevaron a cabo asépticamente dentro de una cabina de flujo laminar (o cabina de seguridad biológica CSB 180 A) clase II tipo A; utilizando para ello materiales esterilizados en un autoclave horizontal automático (marca Centricol AUA 80 L). Para el conteo de esporas se usó un microscopio Carl Zeiss Primo Star y Cámara de Neubauer (Deep 1/10 mm, Boeco).

Escopoletina y umbelliferona (7-hidroxycumarina) se adquirieron de la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Escoparona se aisló desde la semilla de frutos de mamey *Mammea americana* L. (Guttiferae) y xantiletina desde la corteza de Palo de sangre (*Brosimum rubescens* Taub., Moraceae).

### 3.2 Material vegetal

El material vegetal utilizado (frutos) de las especies *Citrus latifolia*. Tanaka se recolectó en la Estación Agraria Cotové, ubicada en el municipio de Santafé de Antioquía y perteneciente a la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. La selección de los frutos para los ensayos se realizó acorde a los requisitos generales y de madurez de la Norma Técnica Colombiana NTC 4087, ubicando los frutos entre las categorías dos y tres de la tabla de colores de lima Tahití.

### 3.3 Microorganismo

El hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp. de frutos de lima Tahiti (*C. latifolia* Tan.) infectados y con síntomas evidentes de la enfermedad, se caracterizó morfológicamente. El hongo se conservó en medio Agar Papa Dextrosa (PDA; Merck-KGaA, Darmstadt, Alemania) a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y se subcultivó mensualmente en cajas Petri (9,0 cm de diámetro y 15,0 mL de medio) hasta la realización de los bioensayos.

### 3.4 Inducción

Para la inducción de los metabolitos secundarios se prepararon soluciones acuosas de los siguientes agentes inductores: sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), glucomananos, mezcla de  $\alpha$ ,  $\beta$  glucanos y gentamicina. También se empleó como agente de inducción físico, radiación ultravioleta (UV), para lo que se utilizó una lámpara UVP UVGL-58 (6 watt) a 254 nm y 20 cm de altura.

Previo a la inducción, los frutos de lima Tahití se lavaron en agua, seguidamente fueron desinfectados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos. Posteriormente los frutos se sometieron a los diferentes tratamientos de inducción con las siguientes soluciones: **T1** y **T2** glucomanano a 50 y 400 mg/L respectivamente. **T3** y **T4** mezclas de  $\alpha,\beta$ -glucanos a 50 y 400 mg/L y **T5** gentamicina a 400 mg/L. Por último, **T6** radiación ultravioleta a 254 nm durante 30 min. Todos los tratamientos, a excepción de la radiación UV, se aplicaron por inmersión durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo los frutos se retiraron de la solución, se secaron al ambiente y almacenaron separadamente en cajas de plástico protegidos de la luz a temperatura ambiente durante 2, 4, 6, 8, 10, 13 y 16 días. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y cada unidad experimental consistió de cuatro frutos.

### 3.5 Aislamiento, purificación e identificación de compuestos

Frutos de lima Tahití se lavaron en agua y seguidamente se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos. Posteriormente los frutos se sometieron a inducción con solución de  $\text{CuSO}_4$  1000 mg/L, por inmersión durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo los frutos se retiraron de la solución, se secaron al ambiente y se almacenaron en cajas de plástico protegidos de la luz a temperatura ambiente durante 6 días. A los frutos elicitados se les retiró la corteza. El material vegetal finamente picado y homogenizado (2500 g de corteza de los frutos), se sometió a extracción exhaustiva por percolación con metanol (2 L) durante 5 días a temperatura ambiente. El extracto metanólico obtenido se concentró por rotaevaporación a presión reducida y temperatura inferior a 40°C. El extracto libre de solvente se almacenó en la oscuridad y a temperatura de 4°C, en un frasco sellado y rotulado hasta su fraccionamiento por cromatografía en columna.

El extracto obtenido de la inducción con  $\text{CuSO}_4$  se sometió a fraccionamiento en columna de sílica gel usando como fase móvil mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo, de polaridad creciente. Seguidamente las fracciones de diferente polaridad o composición se cromatografiaron por CC con Sephadex LH-20, usando la mezcla éter de petróleo-diclorometano-metanol (2:1:1). Adicionalmente, algunas sub-fracciones se purificaron mediante CCD preparativa. En total se obtuvieron seis compuestos, los cuales se identificaron mediante UV, IR,  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se

expresaron en unidades de ppm tomando como referencia la señal del cloroformo a 7,26 ( $^1\text{H-RMN}$ ) y 77,0 ( $^{13}\text{C-RMN}$ ) ppm; las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están dadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales es expresada como singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble doblete (dd). A continuación, se muestran los datos espectroscópicos de los compuestos aislados.

**5-geranoxi-7-metoxicumarina.** UV  $\lambda_{\text{max}}$  (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , nm): 246, 325; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3090, 2970-2900, 1725, 1600, 1160-1100;  $^1\text{H-RMN}$ :  $\delta$  1.65 (s, 3H, H-8'), 1.71 (s, 3H, H-9'), 1.78 (s, 3H, H-10'), 2.12-2.21 (m, 4H, H-4', H-5'), 3.89 (s, 3H, H-11'), 4.64 (d,  $J = 6.6$ , 2H, H-1'), 5.12 (t,  $J = 6.7$ , 1H, H-6'), 5.51 (t,  $J = 6.6$ , 1H, H-2'), 6.19 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-3), 6.32 (d,  $J = 2.0$ , 1H, H-6), 6.45 (d,  $J = 2.0$ , 1H, H-8), 8.04 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-4).  $^{13}\text{C-RMN}$ :  $\delta$  16.7 (C-10'), 17.7 (C-8'), 25.7 (C-9'), 26.2 (C-5'), 39.5 (C-4'), 55.8 (C-11'), 65.7 (C-1'), 92.7 (C-8), 95.8 (C-6), 104.2 (C-4a), 110.7 (C-3), 118.5 (C-2'), 123.6 (C-6'), 132.0 (C-7'), 139.0 (C-4), 142.1 (C-3'), 156.3 (C-5), 156.8 (C-8a), 161.6 (C-2), 163.6 (C-7).

**5,7-dimetoxicumarina.** UV  $\lambda_{\text{max}}$  (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , nm): 254, 326; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3080, 1727, 1625, 1140-1125;  $^1\text{H-RMN}$ :  $\delta$  3.89 (s, 3H, H-9), 3.93 (s, 3H, H-10), 6.20 (d,  $J = 9.8$ , 1H, H-3), 6.32 (d,  $J = 2.1$ , 1H, H-6), 6.46 (d,  $J = 2.1$ , 1H, H-8), 8.01 (d,  $J = 9.8$ , 1H, H-4).  $^{13}\text{C-RMN}$ :  $\delta$  55.8 (C-9), 55.9 (C-10), 92.8 (C-8), 94.8 (C-6), 104.0 (C-4a), 110.9 (C-3), 138.8 (C-4), 156.8 (C-5), 157.0 (C-8a), 161.6 (C-7), 163.7 (C-2).

**5,8-dimetoxipsoraleno.** UV  $\lambda_{\text{max}}$  (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , nm): 222, 249, 311; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3100, 1725, 1620, 1154-1090;  $^1\text{H-RMN}$ :  $\delta$  4.21 (s, 3H, H-1'), 4.22 (s, 3H, H-2'), 6.34 (d,  $J = 9.9$ , 1H, H-3), 7.05 (d,  $J = 2.4$ , 1H, H-9), 7.66 (d,  $J = 2.4$ , 1H, H-10), 8.18 (d,  $J = 9.9$ , 1H, H-4).

**5-metoxipsoraleno.** UV  $\lambda_{\text{max}}$  (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , nm): 222, 266; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3100, 1716, 1600, 1135-1068;  $^1\text{H-RMN}$ :  $\delta$  4.32 (s, 3H, H-1'), 6.33 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-3), 7.05 (d,  $J = 2.2$ , 1H, H-9), 7.18 (s, 1H, H-8), 7.64 (d,  $J = 2.2$ , 1H, H-10), 8.21 (d,  $J = 9.6$ , 1H, H-4).  $^{13}\text{C-RMN}$ :  $\delta$  60.2 (C-1'), 93.9 (C-8), 105.0 (C-9), 106.7 (C-4a), 112.5 (C-3), 112.7 (C-6), 139.3 (C-4), 144.8 (C-10), 150.0 (C-5), 153.5 (C-8a), 159.0 (C-7), 161.35 (C-2).

**5-geranoxipsoraleno.** UV  $\lambda_{\text{max}}$  (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , nm): 219, 250, 307; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3100, 2970-2908, 1721, 1600, 1151-1074;  $^1\text{H-RMN}$ :  $\delta$  1.64 (s, 3H, H-9'), 1.71 (s, 3H, H-8'), 1.73 (s, 3H, H-10'), 2.11-2.20 (m, 4H, H-4', H-5'), 4.98 (d,  $J = 6.6$ , 2H, H-1'), 5.10 (t,  $J = 6.7$ , 1H, H-6'), 5.56 (t,  $J = 6.6$ , 1H, H-2'), 6.30 (d,  $J = 9.8$ , 1H, H-3), 7.00 (d,  $J = 2.1$ , 1H, H-9) 7.18 (s, 1H,

H-8), 7.63 (d,  $J=2.1$ , 1H, H-10), 8.20 (d,  $J=9.8$ , 1H, H-4).  $^{13}\text{C}$ -RMN:  $\delta$  16.7 (C-10'), 17.7 (C-9'), 25.7 (C-8'), 26.2 (C-5'), 39.5 (C-4'), 69.7 (C-1'), 94.2 (C-8), 105.1 (C-9), 107.5 (C-4a), 112.5 (C-3), 114.1 (C-6), 118.8 (C-2'), 123.5 (C-6'), 132.0 (C-7'), 139.6 (C-4), 143.0 (C-3'), 144.9 (C-10), 149.0 (C-5), 152.6 (C-8a), 158.1 (C-7), 161.37 (C-2).

**5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxy) psoraleno.**  $^1\text{H}$ -RMN:  $\delta$  1.36 (s, 3H, H-4'), 1.41 (s, 3H, H-5'), 3.69 (s, 1H, OH), 3.96 (dd,  $J=8.1$  2.3, 1H, H-2'), 4.49 (dd,  $J=9.9$  8.1, 1H, H<sub>a</sub>-1'), 4.59 (dd,  $J=9.9$  2.3, 1H, H<sub>b</sub>-1'), 6.35 (d,  $J=9.6$ , 1H, H-3), 7.04 (d,  $J=2.0$ , 1H, H-9), 7.22 (s, 1H, H-8), 7.66 (d,  $J=2.0$  1H, H-10), 8.23 (d,  $J=9.6$ , 1H, H-4).  $^{13}\text{C}$ -RMN:  $\delta$  25.1 (C-4'), 26.7 (C-5)', 71.5 (C-3'), 71.7 (C-1'), 74.5 (C-2'), 94.9 (C-8), 104.7 (C-9), 107.3 (C-4a), 113.1 (C-3), 114.3 (C-6), 139.0 (C-4), 145.3 (C-10), 148.4 (C-5), 152.5 (C-8a), 158.1 (C-7), 161.1 (C-2).

**6,7-dimetoxicumarina.** Sólido cristalino incoloro.  $^1\text{H}$ -RMN:  $\delta$  3.95 (s, 3H, H-2'), 3.98 (s, 3H, H-1'), 6.32 (d,  $J=9.6$ , 1H, H-3), 6.87 (s, 1H, H-8), 6.89 (s, 1H, H-5), 7.66 (d,  $J=9.6$ , 1H, H-4').  $^{13}\text{C}$ -RMN:  $\delta$  56.3 (C-2'), 56.4 (C-1'), 100.0 (C-8), 107.9 (C-5), 111.4 (C-4a), 113.5 (C-3), 143.3 (C-4), 146.3 (C-8a), 150.0 (C-6), 152.8 (C-7), 161.4 (C-2).

**Xantiletina.** Sólido cristalino incoloro.  $^1\text{H}$ -RMN:  $\delta$  1.45 (s, 6H, H-12, H-1', H-2'), 5.68 (d,  $J=9.9$ , 1H, H-10), 6.19 (d,  $J=9.3$ , 1H, H-3), 6.32 (d,  $J=9.9$ , 1H, H-11), 6.67 (s, 1H, H-8), 7.04 (s, 1H, H-5), 7.58 (d,  $J=9.3$ , 1H, H-4).  $^{13}\text{C}$ -RMN:  $\delta$  28.3 (C-1', C-2'), 77.7 (C-9), 104.2 (C-8), 112.7 (C-4a), 112.8 (C-3), 118.5 (C-6), 120.7 (C-11), 124.8 (C-5), 131.2 (C-10), 143.4 (C-4), 155.3 (C-8a), 156.8 (C-7), 161.2 (C-2).

### 3.6 Obtención de extracto

A los frutos previamente elicitados se les retiró la corteza (flavedo y albedo). Para determinar la concentración de los compuestos inducidos en el curso del tiempo, de cada tratamiento y réplica se pesó 5 g de material vegetal finamente picado y se extrajo con metanol (3x15 mL) durante 30 minutos en ultrasonido (Ultrasonik 28H). Las fases orgánicas se unieron y se llevaron a un volumen final de 50 mL, para luego ser analizado por HPLC.

### 3.7 Detección y cuantificación de compuestos

Para evaluar la acumulación de los compuestos inducidos en el curso del tiempo, inicialmente se desarrolló una metodología en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC). Para esto se inició con la selección del tipo de columna, el gradiente de solventes, el volumen de inyección y el flujo de fase móvil. Se realizaron análisis sistemáticos, de una misma muestra, en los que se comparó la separación de los compuestos con las distintas columnas y solventes. Seleccionada la columna y la fase móvil, se procedió a optimizar el método con la temperatura de la columna, el gradiente y el flujo de fase móvil.

Habiendo desarrollado el método de separación en el HPLC se procedió a determinar la pureza de los compuestos, tanto los aislados en el presente trabajo como los obtenidos desde las casas comerciales. Todos los compuestos fueron disueltos en acetonitrilo grado HPLC e inyectados en el cromatógrafo. La pureza de los estándares se calculó dividiendo el área del respectivo compuesto entre el área total de los picos en el cromatograma y multiplicando por 100.

Posteriormente se realizó la identificación de los compuestos en los extractos. Para esto se inyectaron soluciones de cada uno de los estándares y se determinó el tiempo de retención ( $t_R$ ) de cada uno. Seguidamente se corroboraron los  $t_R$  de cada compuesto mediante la adición de una cantidad del estándar a los extractos resultantes de los ensayos y se estableció el incremento de su señal con relación a los demás constituyentes presentes en el extracto. Lo anterior permitió determinar con exactitud los  $t_R$  de los diferentes compuestos y sus correspondientes espectros UV/Vis bajo las condiciones empleadas en los análisis.

Para la cuantificación se construyeron curvas de calibración (relación área del pico en función de la concentración). Para esto se pesaron adecuadamente 4 mg de cada compuesto aislado o estándar y se disolvieron en 10 mL de acetonitrilo. Cada solución se diluyó posteriormente con la fase móvil a cinco concentraciones diferentes entre 0,5 y 10 mg/L. La concentración de los compuestos en los extractos se calculó por interpolación a partir del área de los picos en los cromatogramas y las curvas de calibrado. El análisis de cada concentración se realizó por triplicado inyectando 10  $\mu$ L de la solución.

## 3.8 Evaluaciones de actividad antifúngica *in vitro*

### 3.8.1 Crecimiento radial

Las medidas de la actividad antifúngica de los compuestos aislados, mezclas de estos y compuestos reportados en la literatura, se desarrollaron mediante la metodología de envenenamiento del medio de cultivo [110], con algunas modificaciones. Diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar (0,25; 0,50 y 1,00 mmolar) se incorporaron al medio de cultivo, disueltos al 1% en dimetilsulfóxido (DMSO). El medio de cultivo para los ensayos fue Agar-Avena (avena 2%; Agar-Agar 1,8%, Scharlau). Luego, se inoculó el microorganismo en la parte central de cada caja Petri mediante la inserción de círculos de agar con micelio, de 6 mm de diámetro. Todas las concentraciones se evaluaron por triplicado. Los resultados se muestran como valores de crecimiento micelial medio correspondiente a los diámetros de la colonia, y como porcentajes de inhibición, comparando los diámetros de crecimiento de los tratamientos y el control negativo (Ecuación 3-1). Cajas Petri sin compuesto se usaron como control negativo, conteniendo sólo medio de cultivo (Blanco absoluto) y adición de DMSO al 1% (Blanco solvente), mientras que para verificación de inhibición de crecimiento se empleó el fungicida comercial Carbendazim como control positivo, a una concentración 0,05 mM. Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente con luz difusa y el diámetro del crecimiento micelial se midió cada 24 horas. La incubación se detuvo cuando el micelio en los controles absoluto y de solvente ocupó la totalidad del espacio.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{DPBA - DPX}{DPBA} \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 3-1})$$

DPBA (Diámetro promedio del blanco absoluto)

DPX (Diámetro promedio a la concentración X)

La actividad antifúngica también se evaluó como resultado de efectos sinérgicos. Se prepararon mezclas de los dos compuestos con mayor actividad antifúngica, aislados de lima Tahití. Estos se prepararon en proporciones 0,25-0,75; 0,50-0,50 y 0,75-0,25 mM. Las diferentes mezclas se estudiaron a través de la metodología de envenenamiento del medio de cultivo y adicionalmente la solución 0.50-0.50 mM se utilizó para evaluar el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas.

### 3.8.2 Inhibición de germinación de esporas

A los compuestos que presentaron mejores resultados por la metodología de envenenamiento del medio de cultivo, se les evaluó la actividad antifúngica a través del porcentaje de inhibición de la germinación de esporas. Inicialmente se recolectaron esporas de un cultivo en caja Petri con medio PDA y 7 días de incubación. Para esto se adicionaron 20 mL de agua estéril al micelio de la caja Petri y se realizó un barrido repetitivo con hisopo de algodón estéril, para solubilizar el mayor número de esporas. La solución de micelio y esporas se filtró con gaza estéril y se diluyó con agua tipo 1 hasta alcanzar una concentración aproximada de  $3 \times 10^5$  esporas/mL.

Para desarrollar el ensayo se emplearon tubos de microcentrifuga marca Eppendorf de 2 mL de capacidad. En éstos se adicionó 1 mL de la solución de esporas ( $3 \times 10^5$  esporas/mL) seguido del compuesto a evaluar disuelto en 15 uL de DMSO y de forma inmediata se incorporó 0.5 mL de PDA al 9% con agitación en un Vortex V1 Plus hasta homogenizar. El medio de germinación alcanzó una concentración de 3% de PDA y 1 % de DMSO la cual no inhibe el crecimiento de las esporas según curva de germinación de esporas a diferentes concentraciones de DMSO, realizadas previamente. Los compuestos a evaluar se incorporaron en cantidades que garantizaron la concentración de 1 mM y se realizaron por triplicado.

Finalmente, la evaluación del porcentaje de inhibición de la germinación de esporas se realizó midiendo en intervalos de 8, 24 y 48 horas, el número de esporas que desarrollaron una dimensión del tubo germinativo mayor al doble del radio de la espora. Los resultados se presentan en términos de porcentajes de inhibición de germinación (%IG), al comparar el porcentaje de germinación promedio de esporas en los tratamientos (%GT) y los controles, con el porcentaje promedio de esporas germinadas en el blanco absoluto (%GB) según la Ecuación 3-2. Esto con el fin de garantizar que los porcentajes de inhibición obtenidos son debidos al efecto neto de los compuestos en estudio.

$$\% \text{IG} = \frac{\% \text{GB} - \% \text{GT}}{\% \text{GB}} \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 3-2})$$





## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Aislamiento e identificación de compuestos en lima Tahití

De la corteza (flavedo y albedo) de los frutos elicitados con  $\text{CuSO}_4$  se obtuvieron 35,18 g de extracto crudo que al ser fraccionado mediante CC, con la mezcla de éter de petróleo (EP) y acetato de etilo (AcOEt) de polaridad creciente (100:0 a 0:100), genero 23 fracciones. El análisis por CCD realizado a las diferentes fracciones reveló la presencia de varios compuestos de diferente polaridad. Adicionalmente, el perfil cromatográfico mostró diferencias cualitativas entre el control y los tratamientos. Sin embargo, todos los compuestos aislados estuvieron presente tanto en frutos inducidos como en los controles.

Los compuestos aislados y purificados se caracterizaron e identificaron por UV/Vis, IR y RMN (Anexo A), correspondiendo a los siguientes derivados de cumarina: 5-geranoxi-7-metoxicumarina (**Compuesto I**), 5,7-dimetoxicumarina (**Compuesto II**), 5,8-dimetoxipsoraleno (**Compuesto III**), 5-metoxipsoraleno (**Compuesto IV**), 5-geranoxipsoraleno (**Compuesto V**) y 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxy)psoraleno (**Compuesto VI**). Por otra parte, las fitoalexinas ampliamente reconocidas de los cítricos 6,7 dimetoxicumarina (sin. Escoparona, **Compuesto VII**), 6-metoxi-7-hidroxycumarina (sin. Escopoletina, **Compuesto VIII**) y 7-hidroxycumarina (sin. Umbelliferona, **Compuesto IX**) y xantiletina (**Compuesto X**) se obtuvieron de otras fuentes naturales y/o casas comerciales.

5-geranoxi-7-metoxicumarina (**Compuesto I**): Se aisló como un sólido blanco amorfo. Su espectro de UV/Vis dejo ver dos bandas de absorción máximas en 246 y 325 nm, características de cumarinas [111], [112]. El espectro de IR mostró bandas de absorción correspondientes a estiramientos  $=\text{CH}$  de compuestos aromáticos y C-H alifáticos en 3090 y 2970  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Además, se presentaron tenciones de grupo carbonilo (C=O), insaturaciones (C=C) sobre 1725 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente y estiramientos de (C-O) en 1160-1100. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN reveló la presencia de 24 protones. Cuatro

singletes que integran para tres protones cada uno; tres señales a campo alto en la región alifática 1.65, 1.71 y 1.78 ppm correspondientes a (H-8', H-9' y H-10') y una señal (H-11'), desplazada a campo bajo (3.88 ppm) por encontrarse sobre carbono unido a un átomo electronegativo (-OCH<sub>3</sub>). Otros protones también observados en la región alifática fueron H-1', H-4' y H-5', con señales en 4.64 y en 2.12 - 2.21 ppm respectivamente. De igual forma se identificó la presencia de dos protones olefínicos (H-6' y H-2') a 5.12 y 5.51 ppm con multiplicidad que indica acoplamiento a protones vecinales de cadena alifática (H-5' y H-1 correspondientemente). Los dos últimos grupos de señales junto a los tres protones alifáticos pueden ser atribuidos a un grupo geranil. Adicionalmente se identificaron dos sistemas de espin, AB y AX. El primero formado por dos dobletes en 6.19 y 8.04 ppm correspondientes a los protones del anillo  $\alpha$ -pirona de la cumarina (H-3 y H-4). El otro sistema corresponde al par de protones en posición meta (H-8 y H-6) del anillo aromático (6.32 y 6.45 ppm).

Del espectro de <sup>13</sup>C-RMN se observaron 20 señales. Cuatro señales (16.7, 17.7, 25.7 y 55.8 ppm) se asignaron a carbonos metílicos (C-10', C-8', C-9', C-11'), tres señales (26.2, 39.5 y 65.7 ppm) a carbonos metilénicos (C-4', C-5' y C-1') de la cadena alquílica y seis señales (92.7, 95.8, 110.7, 118.5, 123.6, 139.0 ppm) a carbonos metínicos (C-8, C-6, C-3, C-2, C-6 y C-4). Finalmente, las señales restantes corresponden a carbonos cuaternarios (C-4a, C-7', C-3', C-8a, C-5, C-2 y C-7).

El experimento COSY permitió determinar correlaciones escalares entre los protones ubicados sobre carbonos vecinos, se observó la correlación entre los protones olefínicos 6.19 (H-3) y 8.04 (H-4) ppm. Las otras dos correlaciones mostradas en el espectro confirman la presencia de la cadena geranoxi. Aquí se puede notar las correlaciones de los protones metínicos 5.12 (H-6') y 5.51 (H-2') ppm con los metilénicos 2.12-2.21 (H-5') y 4.64 (H-1') ppm.

El experimento HSQC reveló la conectividad de los hidrógenos a los respectivos carbonos. Se observó la correlación de los cuatro protones metílicos 1.65, 1.71, 1.78 y 3.89 ppm (H-8', H-9', H-10' y H-11') con los carbonos 17.7, 25.7, 16.7 y 55.8 (C-8', C-9', C-10' y C-11') respectivamente. También se observó la conectividad de seis protones metínicos; dos olefínicos y dos aromáticos (del esqueleto de la cumarina) 6.19, 6.32, 6.45 y 8.04 ppm (H-3, H-6, H-8 y H-4) con los respectivos carbonos 110.7, 95.8, 92.7 y 139.0 ppm (C-3, C-6,

C-8 y C-4). Finalmente, los protones olefínicos de la cadena geranoxi 5.12 y 5.51 ppm (H-6' y H-2') con los carbonos 123.6 y 118.5 ppm (C-6' y C-2') respectivamente.

A través del experimento HMBC se ubicaron los sustituyentes sobre el anillo aromático y los carbonos cuaternarios de la molécula. La ubicación del grupo geranoxi sobre el anillo aromático fue determinada mediante la correlación a tres enlaces entre el protón 4.64 ppm (H-1') y el carbono aromático 156.3 ppm (C-5), la posición del otro grupo sustituyente (metoxilo) fue confirmado a través de la correlación a tres enlaces entre el protón 3.89 ppm (H-11') con el carbono aromático 163.6 ppm (C-7). La confirmación de la cumarina con el anillo  $\alpha$ -pirona no sustituido fue corroborada mediante la correlación a dos y tres enlaces de los protones 6.19 (H-3) y 8.04 (H-4) ppm con los carbonos cuaternarios 161.6 (C-2) y 104.2 (C-4a) ppm. Estas correlaciones se muestran en el anexo A.

5,7-dimetoxicumarina (**Compuesto II**): Este compuesto fue obtenido como un sólido cristalino incoloro. Su espectro UV/Vis presentó bandas de absorción máximas en 254 y 326 nm característico de compuestos tipo cumarina [112], [113]. El espectro de infrarrojo mostró bandas de absorción particulares del grupo carbonilo, estiramientos =C-H e insaturaciones aromáticas (C=C) y estiramientos de (C-O) en 1718, 3080, 1625 y 1140-1125  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. En cuanto al espectro  $^1\text{H}$ -RMN se observaron señales para 10 protones. Dos señales singletes a campo alto que integran para tres protones cada una (-OCH<sub>3</sub>). Dos sistemas de espines, AX y AB, a campo bajo; el primero lo conforman dos dobletes a 6.20 y 8.01 ppm, mientras que el segundo corresponde a dos protones aromáticas con señales en 6.32 y 6.46 ppm. Esto permite inferir que se trata de una cumarina con el anillo  $\alpha$ -pirona no sustituido. De los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135 se observaron dos señales (55.8 y 55.9 ppm) correspondientes a los grupos metoxilo C-9 y C-10. Adicionalmente, se reconoció la presencia de cuatro carbonos metínicos (92.8, 94.8, 110.9 y 138.8 ppm), dos del anillo aromático (C-8 y C-6) y dos (C-3 y C-4) de la insaturación del anillo  $\alpha$ -pirona.

También, se reconocieron 5 señales a 104.0, 156.8, 157.0, 161.6 y 163.7 ppm, correspondientes a los carbonos cuaternarios C-4a, C-5, C-8a, C-7 y C-2, respectivamente.

El experimento COSY mostró correlaciones entre los protones olefínicos 6.20 (H-3) y 8.1 (H-4) ppm, mientras que el experimento HSQC reveló la conectividad de los hidrógenos a los respectivos carbonos; los protones de señales en 3.89 (H-9) y 3.93 (H-10) ppm con los

carbonos metílicos en 55.8 (C-9) y 55.8 (C-10) ppm respectivamente, los protones olefínicos en 6.20 (H-3) y 8.1 (H-4) ppm con los carbonos 110.9 (C-3) y 138.8 (C-4) ppm. Finalmente, los protones aromáticos 6.32 (H-6) y 6.46 (H-8) con los carbonos 92.8 (C-8) y 94.8 (C-6) ppm respectivamente (Anexo A).

Del experimento HMBC permitió ubicar los sustituyentes sobre el anillo aromático y confirmar los carbonos cuaternarios. La posición de los grupos metoxilos se determinó mediante la correlación a tres enlaces entre los protones 3.89 (H-9) y 3.93 (H-10) ppm con los carbonos aromáticos 156.8 (C-5) y 161.6 (C-7) respectivamente. La confirmación de la cumarina con el anillo  $\alpha$ -pirona no sustituido mediante la correlación a dos y tres enlaces de los protones 6.20 (H-3) y 8.1 (H-4) ppm con los carbonos cuaternarios 163.7 (C-2) y 104.0 (C-4a) ppm. Estas correlaciones se muestran en el anexo A.

5,8-dimetoxipsoraleno (**Compuesto III**): Este compuesto se aisló como un sólido blanco amorfo. El espectro UV/Vis mostró tres bandas de absorción máximas en 222, 249 y 311nm, características de psoraleno [111], [114]. En el espectro de infrarrojo se observaron las bandas de absorción 3100, 1725, 1620 y 1159-1090  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a estiramientos =C-H aromáticos, de grupo carbonilo, insaturaciones C=C y estiramientos de (C-O). Entre tanto, el espectro  $^1\text{H}$ -RMN reveló la presencia de dos singletes a campo alto (4.21 y 4.22 ppm) que integran para tres protones cada uno, indicando la presencia de dos grupos metoxilos. También se observaron dos sistemas de espín AX. Uno, conformado por dos dobletes a 6.34 y 8.18 ppm, correspondientes al par de protones del anillo  $\alpha$ -pirona del psoraleno. El otro sistema AX, corresponde al par de protones H-9 y H-10 (7.05 y 7.66 ppm) presentes en el anillo sin sustituir de furano. La estructura fue confirmada con la ayuda de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos similares (**IV** y **V**).

5-metoxipsoraleno (**Compuesto IV**): Fue aislado como un sólido cristalino de color amarillo. Presento bandas de absorción máximas a 222, 266 y 311 nm en el UV/Vis, características de psoraleno [111], [114]. El espectro IR mostró bandas de absorción correspondientes a tensión de enlace =C-H aromáticos y C-H alifáticos sobre 3100 y 2920  $\text{cm}^{-1}$ . También se observó una banda intensa en 1715  $\text{cm}^{-1}$  representativa del grupo carbonilo del anillo  $\alpha$ -pirona, una señal en 1600  $\text{cm}^{-1}$  de insaturaciones C=C y bandas en 1135-1068 correspondientes a estiramientos de (C-O). El espectro  $^1\text{H}$ -RMN reveló la presencia de un singlete a campo alto (4.32 ppm) el cual integra para tres protones, H-1'. Mientras que a campo bajo se observaron dos sistemas de espín AX. El primero,

conformado por dos dobletes a 6.33 y 8.21 ppm, correspondientes a los protones del anillo  $\alpha$ -pirona del psoraleno (H-3 y H-4): el otro sistema, corresponde al par de protones C-9 y C-10 (7.05 y 7.64 ppm) presentes en el anillo furano sin sustituir. El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN mostró señales para 12 carbonos. A partir del espectro DEPT-135 se observó la presencia de un carbono metílico (C-1') en 60.2 ppm y cinco carbonos metínicos (C-8, C-9, C-3, C-4 y C-10) en 93.9, 105.0, 112.5, 139.3 y 144.8 ppm, respectivamente. Adicionalmente se identificaron seis carbonos cuaternarios. Cinco corresponden al anillo aromático (C-4a, C-6, C-5, C-8a y C-7) y un sexto (C-2) se asignó al carbono carbonílico en 161.35 ppm.

5-geranoxipsoraleno (**Compuesto V**): Este compuesto fue aislado como sólido cristalino incoloro. Presento bandas de absorción máxima (219, 250 y 307 nm) en el UV/Vis, características de psoraleno [111], [114]. El espectro IR mostró absorción a  $3100\text{ cm}^{-1}$ , de tensión =C-H de aromático. En la región  $2970 - 2910\text{ cm}^{-1}$  se identificaron señales correspondientes a tensiones de CH y  $\text{CH}_2$  de alifáticos. Otras señales importantes fueron la tensión de grupo carbonilo, la insaturación C=C en  $1721$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. También se identificaron los estiramientos de (C-O) en 1151-1074. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN presentó señales que integraron por 22 protones. Se observó la presencia de tres protones alifáticos (H-9', H-8' y H-10') a campo alto con señales en 1.64, 1.71 y 1.73 ppm respectivamente. De igual forma se identificó la presencia de dos protones olefínicos a 5.10 y 5.56 ppm con multiplicidad que indica acoplamiento a protones vecinales de cadena alifática, correspondiendo a H-6' y H-2'. Las señales antes mencionadas, junto a los cuatro protones entre 2.11 y 2.20 ppm (H-4' y H-5') pueden ser atribuidos a un grupo geranilo. También se identificó la presencia de dos sistemas AX. Uno formado por dos dobletes en 6.3 y 8.20 ppm del anillo  $\alpha$ -pirona del psoraleno (H-3 y H-4). El otro corresponde al par de protones H-9 y H-10 (7.00 y 7.63 ppm) presentes en el anillo sin sustituir de furano. Adicionalmente se presenta un singlete en 7.18 ppm correspondiente a H-8 e indicando la presencia de un anillo aromático pentasustituido. Con el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN fue posible establecer la presencia en total de 21 carbonos. Al compararse con el experimento DEPT 135 se pudieron discriminar de la siguiente forma: tres carbonos metílicos (16.7, 17.7 y 25.7 ppm), tres metilénicos (26.2, 39.5 y 69.7 ppm), siete metínicos (94.2, 105.1, 112.5, 118.8, 123.5, 139.6 y 144.9 ppm) y ocho cuaternarios (107.5, 114.1, 132.0, 143.0, 149.0, 152.6, 158.1 y 161.3 ppm) siendo el último el carbono carbonílico.

El experimento COSY permitió determinar correlaciones escalares entre los protones olefínicos en 6.30 y 8.20 ppm (H-3 y H-4), así como también los presentes en 7.00 y 7.63

ppm (H-9 y H-10). Estos confirmando la presencia del anillo  $\alpha$ -pirona del psoraleno y el anillo sin sustituir de furano. También se pudo corroborar la presencia de la cadena geranoxi a través de las correlaciones observadas entre los protones metínicos 5.10 y 5.56 ppm (H-6' y H-2') con los protones metilénicos 2.11-2.20 y 4.98 ppm (H-5' y H-1') respectivamente.

Del experimento HSQC manifestó la conectividad de los hidrógenos a los respectivos carbonos. Se observó la correlación de los tres protones metílicos 1.64, 1.71 y 1.73 ppm (H-9', H-8' y H-10') con los carbonos 17.7, 25.7 y 16.7 ppm (C-9', C-8' y C-10') respectivamente. También se observó la conectividad de cinco protones metínicos; tres olefínicos y uno aromático (del esqueleto de psoraleno) 6.30, 7.00, 7.18 y 7.63 ppm (H-3, H-9, H-8 y H-10) con los respectivos carbonos 112.5, 105.1, 94.2 y 144.9 ppm (C-3, C-9, C-8, C-10 y C-4). Finalmente, un protón olefínico de la cadena geranoxi 5.10 ppm (H-6') con el carbono 123.5 ppm (C-6').

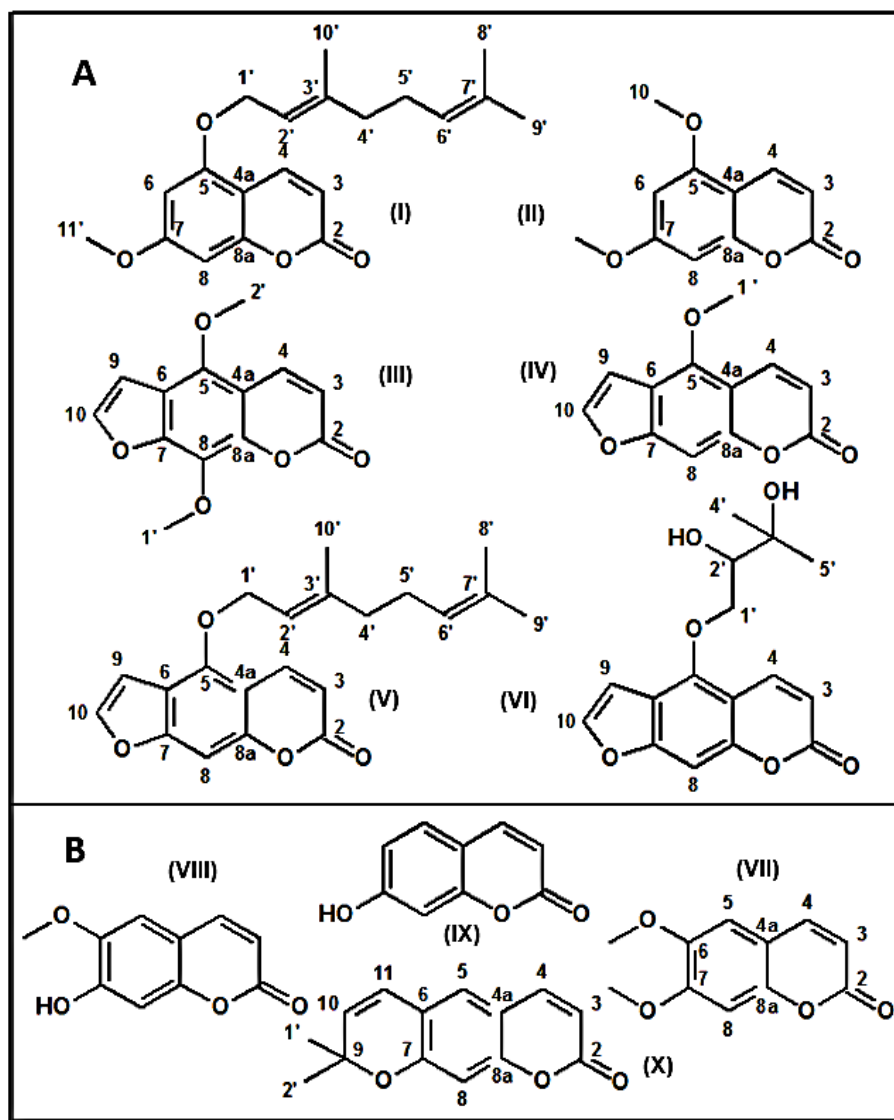
A través del experimento HMBC se ubicaron los sustituyentes sobre el anillo aromático y los carbonos cuaternarios de la molécula. La ubicación del grupo geranoxi sobre el anillo aromático fue determinada mediante la correlación a tres enlaces entre el protón 4.98 ppm (H-1') y el carbono aromático 149.0 ppm (C-5). La confirmación del psoraleno con el anillo  $\alpha$ -pirona no sustituido fue corroborada mediante la correlación a dos y tres enlaces del protón 6.30 (H-3) con los carbonos cuaternarios 161.3 (C-2) y 104.2 (C-4a) ppm, así como también, con la correlación de 8.20 (H-4) ppm con los carbonos cuaternarios 161.3 (C-2) y 104.2 (C-8a) ppm. También se pudo comprobar la presencia de la furanocumarina lineal a través de la correlación a dos y tres enlaces de los protones 7.00 y 7.63 ppm (H-9 y H-10) con los carbonos cuaternarios 114.1 ppm (C-6) y 158.1 ppm (C-7). Estas correlaciones se muestran en el anexo A.

5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxy)psoraleno (**Compuesto VI**): Fue aislado como un sólido amorfo de color blanco. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN presentó señales que integraron por 14 protones. Se observaron dos protones alifáticos (H-4' y H-5') a campo alto con señales en 1.36 y 1.41 ppm respectivamente. También se identificó un protón alifático (H-2') con señal en 3.96 ppm que acopló con dos protones en disposición geminal (H-1<sub>a</sub>' y H-1<sub>b</sub>') en 4.49 y 4.59 ppm respectivamente. Las otras señales son muy similares a las reportadas para el núcleo de psoraleno como se mostró para los compuestos (**III**, **IV**, **V**). En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se estableció la presencia de 16 carbonos. Al compararse con el experimento

DEPT 135 se pudieron discriminar de la siguiente forma: dos carbonos metílicos (25.1 y 26.7 ppm), uno metilénico (71,7 ppm), seis metínicos (74.5, 94.9, 104.7, 113.1, 139.0 y 145.3 ppm) y siete cuaternarios (71.5, 107.3, 114.3, 148.4, 152.5, 158.1, 161.1 ppm) siendo el último el carbono carbonílico. Los datos espectroscópicos coinciden con los reportados previamente para el compuesto **VI** [115], [116].

A continuación (Figura 4-1), se presentan las estructuras de los compuestos aislados de lima Tahiti y algunas fitoalexinas de cítricos empleadas en el presente trabajo como estándares.

**Figura 4-1** (A) Compuestos aislados de lima Tahiti y (B) fitoalexinas de cítricos.



Los compuestos (**I - V**) han sido reportados en el aceite extraído de la corteza de frutos de lima Tahití [117]. También se han identificado en otros cítricos y en diferentes partes de la planta. Por ejemplo; los compuestos (**I y V**) pueden encontrarse en corteza de *C. limon*, *C. máxima* y *C. Paradisi* entre otros [118], [119]; los compuestos (**II y III**) han sido aislado en hojas y pulpa de *C. aurantifolia* [120], [121]. En cuanto al compuesto (**VI**), se ha reportado su presencia en aceite de *C. aurantifolia* y *C. limon*.

Por otra parte, **VII, VIII, IX y X** se han reportado ampliamente como fitoalexinas de cítricos, junto con su inducción provocada por múltiples elicitores (bioticos y abioticos) [92], [122], [90]. No obstante, bajo las condiciones usadas en el presente trabajo, no se detectó la presencia de estos compuestos en el extracto de frutos de lima Tahití inducidos con  $\text{CuSO}_4$ . Con el objeto de analizar la presencia/ausencia de dichas fitoalexinas en lima Tahiti tratados con diferentes elicitores, los compuestos (**VIII y IX**) se adquirieron de casas comerciales, mientras que (**VII y X**) se aisló y purificó desde otra fuente natural. A continuación, se realiza su elucidación estructural a partir de los espectros de RMN.

6,7-dimetoxicumarina (**Compuesto VII**): Fue aislado como un sólido cristalino incoloro. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN presentó señales que integraron por 10 protones. Dos señales en la región alifática desplazadas a campo alto y con integración para tres protones (3.95 y 3.98 ppm) indicando la cercanía a átomos electronegativos ( $\text{OCH}_3$ ). Dos singletes en la región aromática 6.87 y 6.89 ppm característico de dos protones (H-5 y H-8) en posición *para*. Adicionalmente un sistema de espín AX formado por dos dobletes en 6.32 y 7.66 ppm asignados al anillo  $\alpha$ -pirona de la cumarina (H-3 y H-4) sin sustituir. Del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN se estableció la presencia en total de 11 carbonos. Al compararse con el experimento APT, se pudieron discriminar de la siguiente forma: dos carbonos metílicos (56.3 y 56.4 ppm), cuatro metínicos (100.0, 107.9, 113.5 y 143.3 ppm) y cinco carbonos cuaternarios (111.4, 146.3, 150.0, 152.8 y 161.4 ppm) siendo el último el carbono carbonílico.

Xantiletina (**Compuesto X**): Fue aislado como un sólido cristalino incoloro. El espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto mostró un patrón característico de un sistema aromático conteniendo un sustituyente de naturaleza prenílica, este último se evidencio por las señales en 1.45, 5.68 y 6.32 ppm, correspondientes a: un singlete que integra para seis protones (H-1' y H-2') y dos protones olefínicos (H-10 y H-11) respectivamente. Las señales en 6.67 y 7.04 ppm, corresponden a dos protones (H-8 y H-5) en posición meta de anillo aromático, junto a un sistema de espín AX, formado por dos dobletes en 6.19 y 7.58 ppm asignados a los

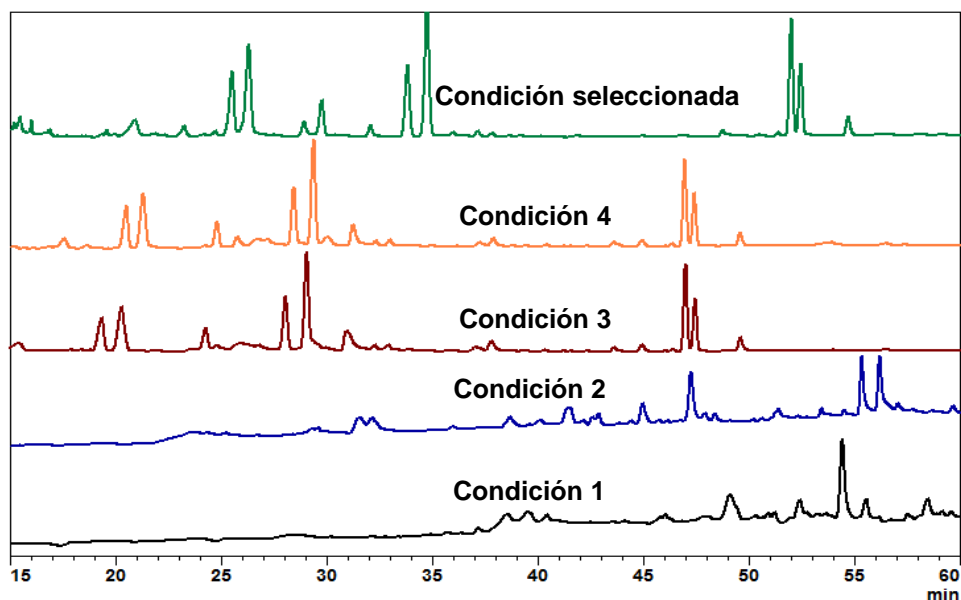
protones (H-3 y H-4), son característicos de una cumarina con el anillo  $\alpha$ -pirano sin sustituir. Del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN se estableció la presencia en total de 14 carbonos. Se identificaron de la siguiente forma: dos carbonos metílicos en 28.3 ppm, seis metínicos (104.2, 112.8, 120.7, 124.8, 131.2 y 143.4 ppm) y seis carbonos cuaternarios (112.7, 112.8, 118.5, 155.3, 156.8 y 161.2 ppm) siendo el último el carbono carbonílico. Estos datos espectroscópicos coinciden con los reportados por otros para este compuesto [123].

Luego de identificados los compuestos, se procedió a desarrollar una metodología de análisis cromatográfico a través de la cual se pudieran analizar cualitativa y cuantitativamente los compuestos aislados del extracto de frutos de lima Tahití.

## 4.2 Establecimiento de condiciones cromatográficas

Para el análisis en el curso del tiempo de los diferentes compuestos aislados en frutos de lima Tahití, se desarrolló una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En primer lugar, se seleccionaron las mejores condiciones de separación, que incluían: columna cromatográfica, temperatura de la columna, fase móvil (gradiente de solventes), volumen de inyección de muestra, flujo, entre otros. En la Figura 4-2 se observan algunos de los perfiles cromatográficos a diferentes condiciones.

**Figura 4-2** Perfiles cromatográficos a diferentes condiciones.



Para la elección de las mejores condiciones, se evaluó repetidamente la separación de los componentes del extracto de lima Tahití, teniendo en cuenta el menor tiempo de retención, la resolución y simetría de los picos de cada compuesto. En la Tabla 4-1 se observan las condiciones con los mejores resultados.

**Tabla 4-1:** Condiciones cromatográficas para el análisis de los compuestos de lima Tahití.

<b>Columna</b>	Luna 5 µm C18 150 X 4.6 mm	
<b>Temperatura columna</b>	33° C	
<b>Volumen de inyección</b>	10 µL	
<b>Flujo</b>	0,5 mL/min.	
<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo (ACN) – Agua tipo 1	
<b>Gradiente</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Relación % (ACN – H<sub>2</sub>O)</b>
	0.0	5 - 95
	10.0	34 – 66
	38.0	70 – 30
	48.0	87 – 13
	53.0	90 - 10
	60.0	90 - 10

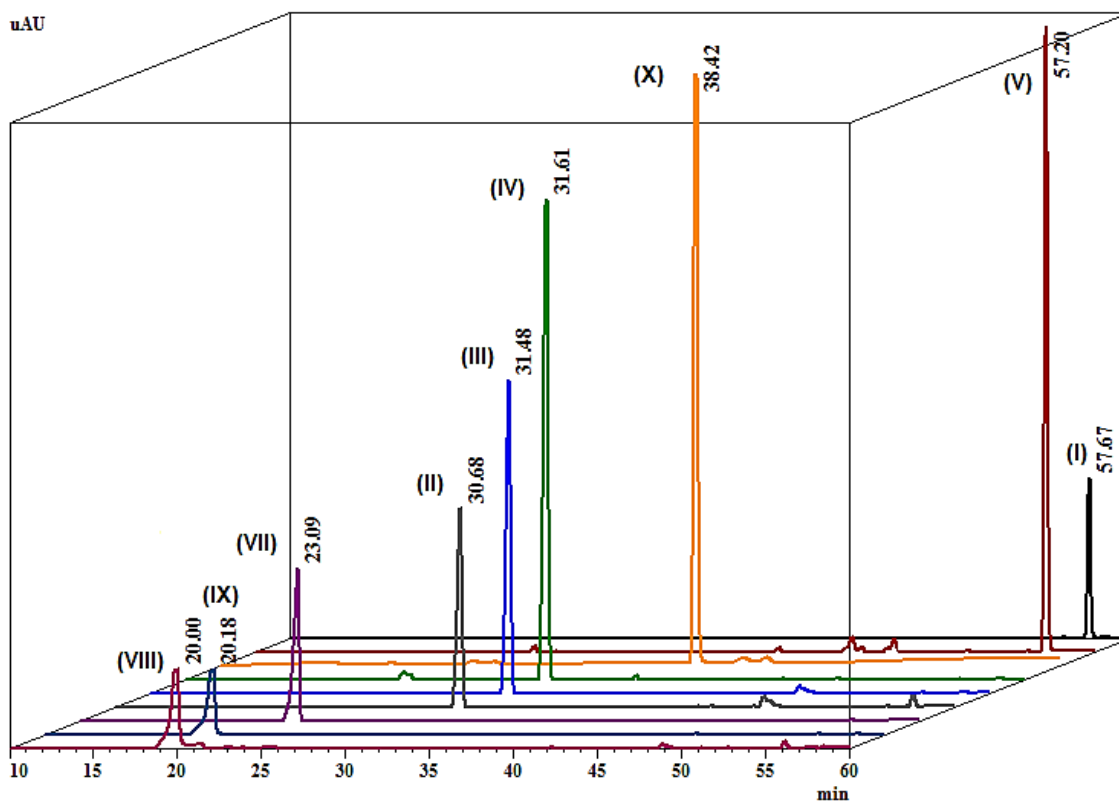
### 4.3 Cuantificación de los metabolitos en el curso del tiempo

Para la detección y cuantificación de los diferentes compuestos, tanto los aislados de frutos de lima Tahití (I - V) como los obtenidos de otras fuentes o casas comerciales (VII - X), les fue determinada la pureza. Para ello, se disolvieron separadamente en 1 mL de acetonitrilo (grado HPLC) y se inyectaron en el cromatógrafo. El porcentaje de pureza de los estándares se calculó dividiendo el área del pico de los compuestos por el área total de los picos en el cromatograma y multiplicando por 100. Todos los compuestos presentaron una pureza superior al 95% (Figura 4-3). Sin embargo, el compuesto (VI) no se incluyó en los perfiles cromatográficos y en la cuantificación debido a la limitada cantidad disponible de este.

Posteriormente, se realizó la identificación de los diferentes compuestos en el extracto de lima Tahití; en primer lugar, se inyectaron soluciones de los compuestos puros y se determinaron los tiempos de retención  $t_R$  (Figura 4-3). Los  $t_R$  fueron confirmados por la adición de estándar a algunos de los extractos y se estableció el incremento de su señal con relación a los demás constituyentes presentes. Lo anterior permitió determinar con exactitud los  $t_R$  de los compuestos y sus respectivos espectros UV/Vis bajo las condiciones empleadas en los correspondientes análisis por HPLC. Cabe resaltar que los compuestos (III) y (IV) no se lograron separar satisfactoriamente, presentando  $t_R$  similares como resultado de las semejanzas estructurales.

Después de establecidas las condiciones cromatográficas e identificado los  $t_R$  de cada uno de los estándares se procedió a realizar la cuantificación de los compuestos. Dado que no se identificó la presencia de los compuestos (VII), (VIII), (IX) y (X) solo fueron cuantificados los aislado de los frutos de lima Tahití. De los cuales (III) y (IV) se cuantificaron como mezcla por no presentar una buena separación.

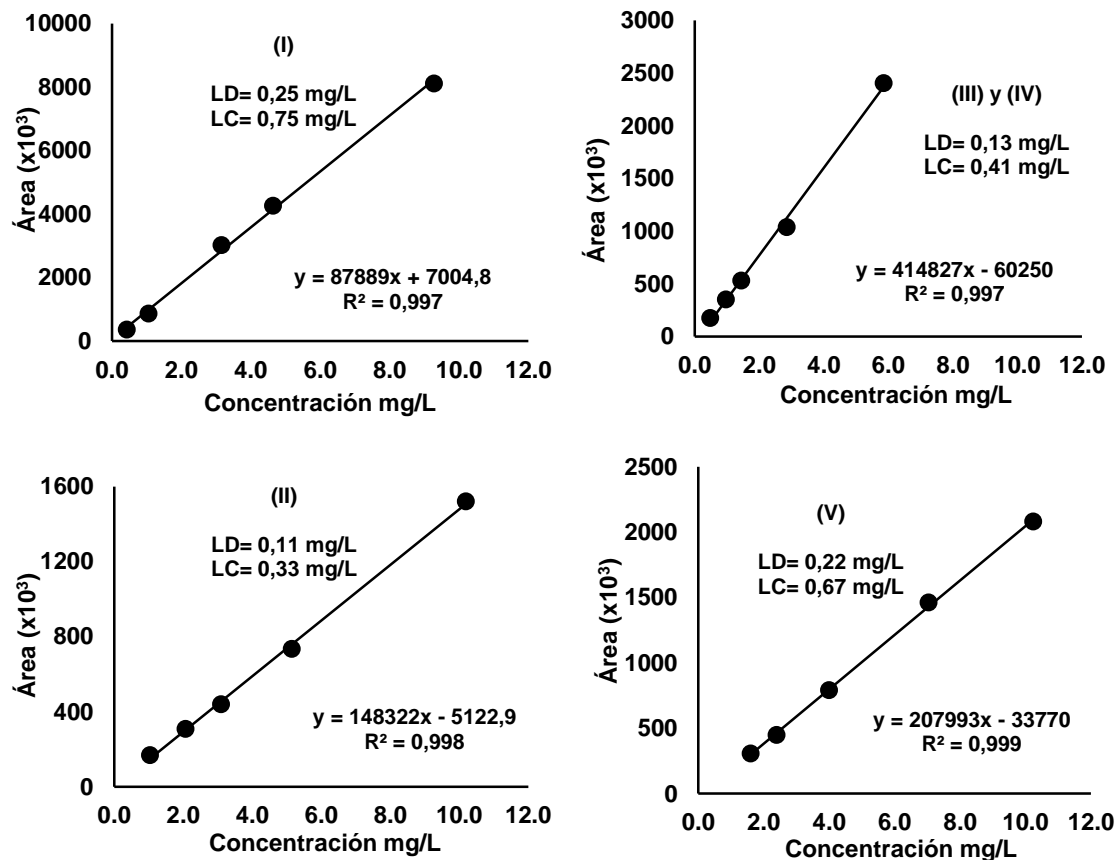
**Figura 4-3** Cromatogramas de estándares aislados de lima Tahití y obtenidos de otras fuentes.



Para la cuantificación, se construyeron curvas de calibración (relación área de pico en función de la concentración). Se pesó adecuadamente 4 mg de cada compuesto y se disolvió en 10 mL de acetonitrilo. Cada solución fue posteriormente diluida con la fase móvil a cinco concentraciones diferentes entre 0,5 y 10 mg/L. El análisis de cada concentración se realizó por triplicado inyectando 10  $\mu$ L de la solución. Las curvas de calibrado se muestran en la Figura 4-4.

Para todas las curvas de calibrado el coeficiente de determinación fue mayor al 0.99. Por consiguiente, más del 99% de la variación observada en la concentración de los compuestos es explicada por el modelo de regresión lineal. Adicionalmente se realizó un análisis de significancia a las pendientes de las curvas de calibrado, mostrando relación lineal significativa entre las variables (Anexo B). Por último, los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) a cada una de las curvas, se determinó según guías ICH y IUPAC [124].

**Figura 4-4** Curvas de calibrado de los compuestos (I), (II), (III y IV) y (V).



Con el objetivo de evaluar el efecto provocado por los diferentes tratamientos (elicitores) aplicados a los frutos de lima Tahití, se realizó un estudio en el curso del tiempo. Para esto, se comparó la composición química del extracto de la corteza de frutos de lima Tahití de todos los tratamientos (Control y elicitores) en diferentes tiempos después de la inducción (2, 4, 6, 8, 10, 13 y 16 días). Esta comparación fue realizada a través de los perfiles cromatográficos, empleando la metodología establecida en la sección anterior.

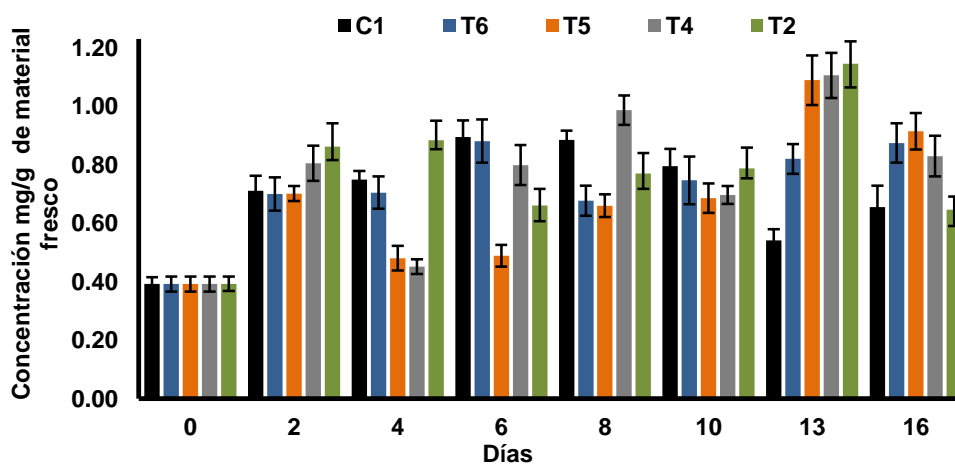
Al comparar los diferentes perfiles cromatográficos, no se identificaron variaciones en la composición química de los frutos de lima Tahití tratados con los diferentes elicitores, en relación a las principales fitoalexinas que han sido reportadas para los cítricos (compuestos **VII**, **VIII**, **IX** y **X**). Es decir, la exposición de los frutos a los tratamientos (**T1 – T6**) no originó la biosíntesis de dichas fitoalexinas o en su defecto, las originó a concentraciones bajas (por debajo de los límites de detección establecidos en el método). Esto se diferencia con lo expuesto por Ben-Yehoshua et al. [66] que reportan la presencia de **VII** (23 µg/ g de material vegetal fresco) en corteza de frutos de lima Tahití al día decimo de ser tratada con radiación ultravioleta. Este hecho contrastante puede ser el resultado de diferencias en la potencia de la radiación UV empleada (3.6 watt), mientras que en nuestro experimento fue de 6 watt. Otros cítricos que también acumulan estos compuestos (**VII** y **IX**) en la corteza del fruto y otras partes de la planta tratadas con UV, pero de manera más acentuada, son *C. sinensis* y *C. limon* [122], [91]. También se ha publicado el empleo de polisacáridos y oligosacáridos como elicitores en cítricos, aunque son pocos los estudios al respecto [125]. Por ejemplo,  $\beta$ -ciclodextrinas y oligómeros de quitosano han inducido la producción de varios derivados de cumarina (xantiletina y seselina) en raíces y brotes de *Citrus jambhiri* Lush., pero no así en cualquier variedad, como sucede con *C. sinensis* [89], [126]. A pesar de que los tratamientos empleados (**T1 – T6**) no estimularon la producción de dichas fitoalexinas, se observaron diferencias, cuantitativamente significativas, de algunos de los constituyentes aislados con respecto al control. Es importante mencionar que, aunque los compuestos aislados se detectaron en el control su concentración incrementó como resultado de la inducción.

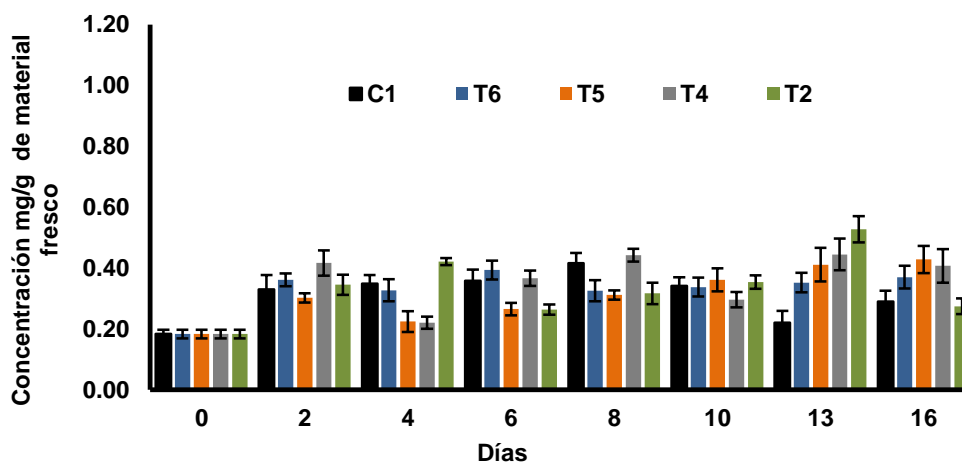
De forma general (comparando tratamientos y días), se pudo observar que todos los compuestos se acumularon con el tiempo, con fluctuaciones particulares de cada sustancia, pero con valores superiores a los obtenidos el primer día. Los compuestos (**I**) y (**V**) alcanzaron concentraciones superiores a 1 mg/g de material vegetal fresco, este valor

duplicó los registrados por el compuesto (II) y triplicó los obtenidos por la mezcla de (III) y (IV). Los resultados se encuentran en el anexo B.

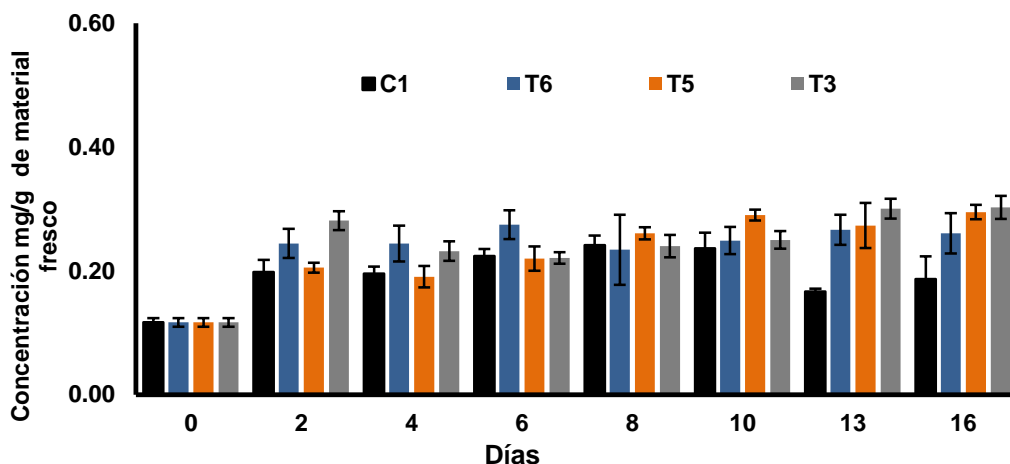
Al comparar la acumulación de los compuestos (I) y (II), como resultado de la aplicación de los diferentes tratamientos, distintas concentraciones y días posteriores a su suministro. Sólo se observaron diferencias significativas, en la acumulación, al comparar los días seguidos a la aplicación del tratamiento. No se notaron diferencias ni entre los tratamientos, ni entre las concentraciones para un mismo elicitor. En las Figuras 4-5 y 4-6 se presenta la acumulación en el curso del tiempo para los compuestos (I) y (II) respectivamente; se omitieron los datos para los tratamientos **T1** y **T3** correspondientes al glucomanano y  $\alpha,\beta$ -glucano a la menor concentración, 50 mg/L. Los resultados muestran que los mayores incrementos de (I) y (II) se dan en los días 13 y 16 para la mayoría de los tratamientos, a excepción de **T6** y **C1**, que fueron al sexto día. Resalta de (I) y (II) su pronunciado incremento en frutos tratados con **T2**, los cuales alcanzaron a duplicar la concentración del blanco en el día 13. Estos compuestos (I, II) también se han reportado en *C. limon* (recién cosechado) con valores de 113 y 136  $\mu\text{g/g}$  de flavedo respectivamente, pero en niveles mucho menores a los encontrados en el presente trabajo para *C. latifolia* (1146 y 528  $\mu\text{g/g}$  de corteza para (I) y (II) respectivamente) al día 13 de inducción con **T2**. Para los compuestos (I) y (II) se observaron máximos transitorios dependientes del elicitor; particularmente para (I), los máximos niveles se encontraron los días 4 y 13 para **T2**, días 6 y 16 para **C1** y **T6**, días 2 y 13 para **T5**, y días 2, 8 y 13 para **T4**.

**Figura 4-5** Acumulación de (I) en el curso del tiempo.

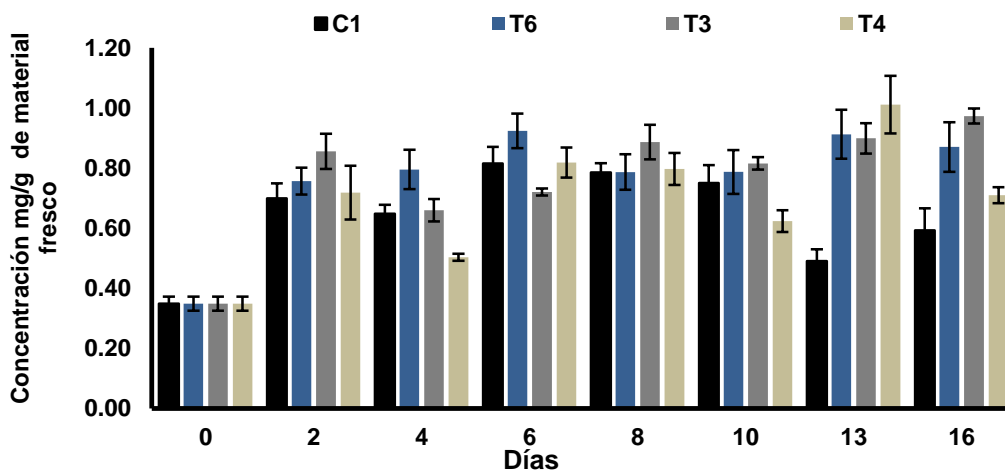


**Figura 4-6** Acumulación de (II) en el curso del tiempo.

Los compuestos (III) y (IV) no se lograron separar y se cuantificaron como mezcla. Al evaluar la concentración de esta mezcla en el curso del tiempo (Figura 4-7), se establecieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. En la Figura 4-7 se omitieron los resultados de los tratamientos **T2** y **T4**, correspondientes a los tratamientos con el glucomanano y el  $\alpha,\beta$ -glucano respectivamente, a la mayor concentración, 400 mg/L (No se encontraron diferencias significativas en la acumulación de (III) y (IV) entre las concentraciones para un mismo elicitor). Los tratamientos que lograron un efecto cuantitativamente diferente en relación a los controles fueron los frutos tratados con **T3**, **T5** y **T6**. Dichos tratamientos ocasionaron efectos semejantes; se observó un incremento gradual de la concentración, a medida que avanzaron los días. Es así que los niveles más altos registrados para los tratamientos, se alcanzaron el día 16. Solo los frutos tratados con **T6** alcanzaron esta concentración máxima previamente, día sexto, pero los niveles se mantuvieron constantes hasta el día 16. Este hecho contrasta con lo acontecido por el control **C1**, el cual alcanzó un máximo al octavo día, a partir del cual descendió. La concentración más alta de (III) y (IV) se alcanzó en los frutos tratados con **T3**, mientras que la más baja fue con **T5**, al cuarto día.

**Figura 4-7** Acumulación de III y IV en el curso del tiempo.

La acumulación del compuesto (V) presentó diferencias significativas entre los frutos no tratados (control) y los tratados con elicitores. Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas en la concentración entre los diferentes días. El compuesto (V) alcanzó las concentraciones mayores los días 6 y 16, en frutos tratados con **T6** y **T3**, respectivamente. El patrón de acumulación de (V) incrementó gradualmente hasta el día 16, en frutos tratados con **T3**, presentando fluctuaciones pequeñas en este proceso. Para el caso de **T6**, el incremento fue constante desde el primer día hasta alcanzar su máximo al día sexto, posteriormente presentó pequeñas oscilaciones cercanas a este máximo, como muestra la Figura 4-8.

**Figura 4-8** Acumulación de (V) en el curso del tiempo.

Un aspecto particular se observó con los frutos tratados con el  $\alpha,\beta$ -glucano. De dos tratamientos aplicados con este elicitor (**T3** y **T4**), sólo el de menor concentración (50 mg/L; **T3**) presentó diferencias significativas respecto al control. En cuanto a los demás tratamientos (**T1**, **T2** y **T5**), ninguno presentó diferencias significativas respecto al control.

## 4.4 Evaluación de la actividad antifúngica

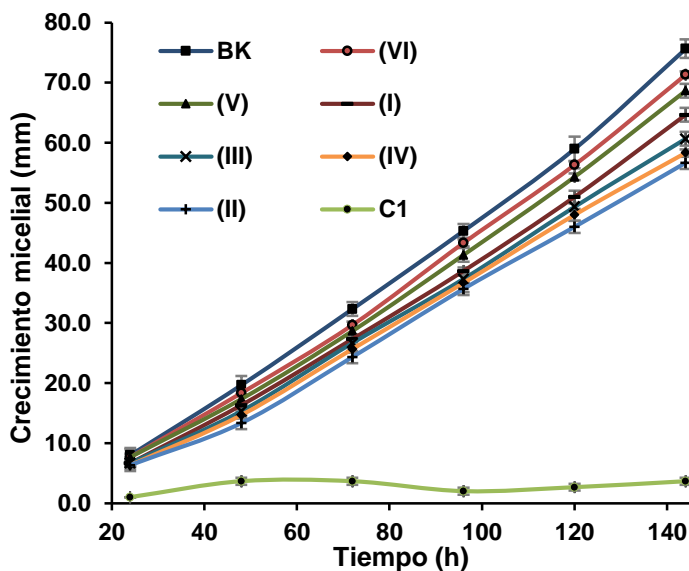
La actividad antifúngica de 9 sustancias se evaluó contra *Colletotrichum* spp. Seis de ellas se aislaron de la corteza de frutos de lima Tahití, dos obtenidas comercialmente (umbeliferona y escopoletina) y dos (escoparona y xantiletina) extraídas de otra fuente vegetal. La actividad antifúngica se evaluó como inhibición del crecimiento radial y de la germinación de esporas. Como control positivo se utilizó Carbendazin y Timol (**C1**) a una concentración de 0,5 mM. El primero presentó una inhibición completa tanto del crecimiento radial como de la germinación de esporas, mientras que el segundo mostró porcentajes de inhibición superiores al 85%.

### 4.4.1 Crecimiento radial

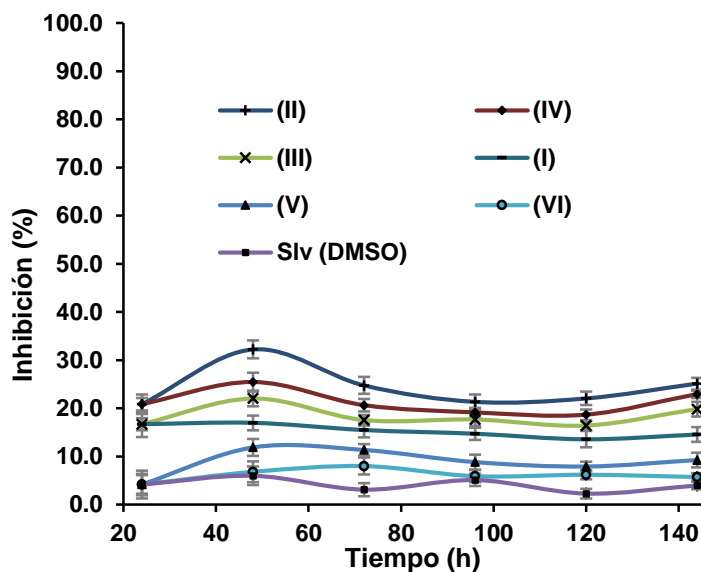
La actividad antifúngica de los compuestos aislados de lima Tahití (**I** - **VI**) se evaluó a tres concentraciones (0,25; 0,50 y 1,00 mM), a excepción del compuesto (**VI**) que se realizó a la concentración más alta. Los resultados se muestran como valores medios de tres réplicas del diámetro del micelio, con sus respectivas barras de desviación estándar.

De forma generalizada los compuestos aislados de lima Tahití (**I** - **VI**), a las diferentes concentraciones, presentaron actividad significativa sobre el patógeno, conforme al análisis de varianza realizado (Anexo B). Al comparar el efecto de la concentración para un mismo compuesto, no se observaron diferencias significativas para los compuestos (**I**) y (**V**); mientras que para el resto (**II**, **III**, **IV** y **VI**) al menos dos concentraciones fueron diferentes (por lo general 0,25 y 1,00 mM). La concentración 1,00 mM mostró la mayor actividad antifúngica, siendo está de baja a moderada (Figura 4-9). No obstante, los porcentajes de inhibición se mantuvieron aproximadamente constantes después de las 72 horas. Los compuestos (**II**) y (**IV**) exhibieron los mejores porcentajes de inhibición con 32 y 35% respectivamente (Figura 4-10).

**Figura 4-9** Crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp. en presencia de los diferentes compuestos aislados de lima Tahití (1,00 mM)



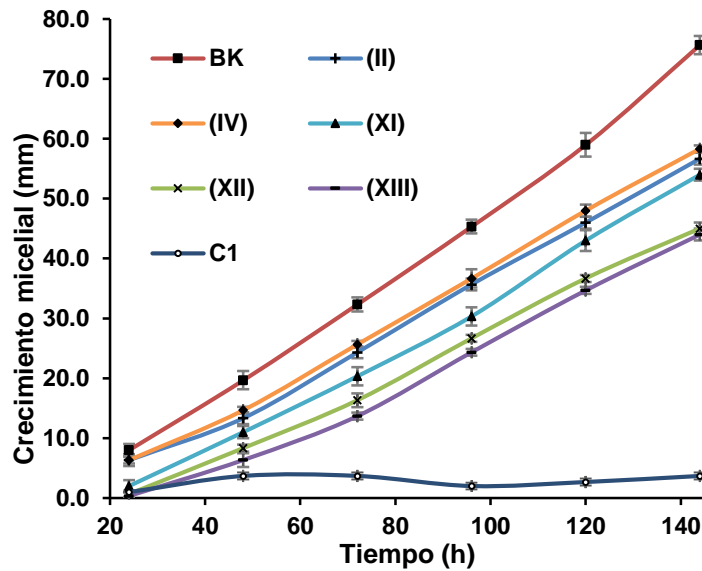
**Figura 4-10** Inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp. con los compuestos aislados de lima Tahití.



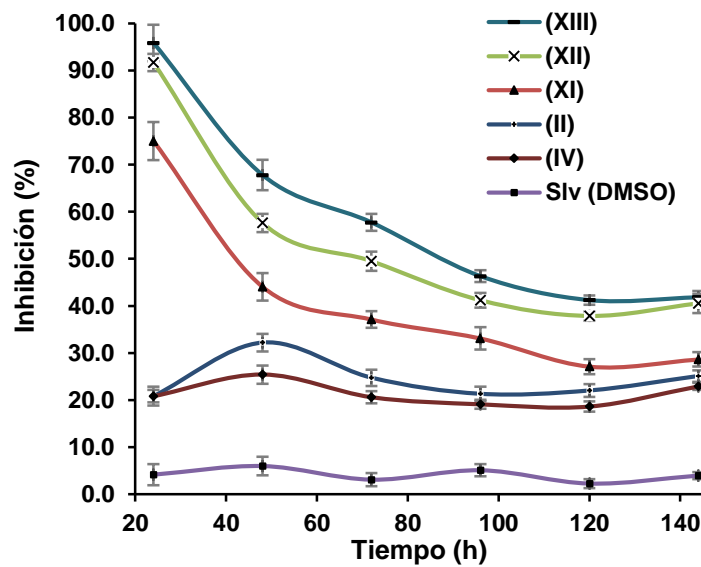
Adicionalmente, se evaluó el efecto sinérgico de los compuestos (II) y (IV) aislados de lima Tahití que presentaron la mejor actividad antifúngica. Las mezclas preparadas para este ensayo: 0,25-0,75 (II-IV); 0,50-0,50 (II-IV) y 0,75-0,25 mM (II-IV), se designaron como (XI), (XII) y (XIII) respectivamente. En todos los casos, la mezcla de los compuestos mostró

diferencias significativas respecto a los controles, y mejor actividad que los compuestos individuales (Figura 4-11). El porcentaje de inhibición a las 24 horas fue de 95, 91 y 75% para las mezclas (IX), (XI) y (XII), respectivamente (Figura 4-12). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre las mezclas (XI) y (XII) (Análisis de varianza Anexo B).

**Figura 4-11** Crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp. en presencia de mezclas de dos compuestos aislados de lima Tahití.



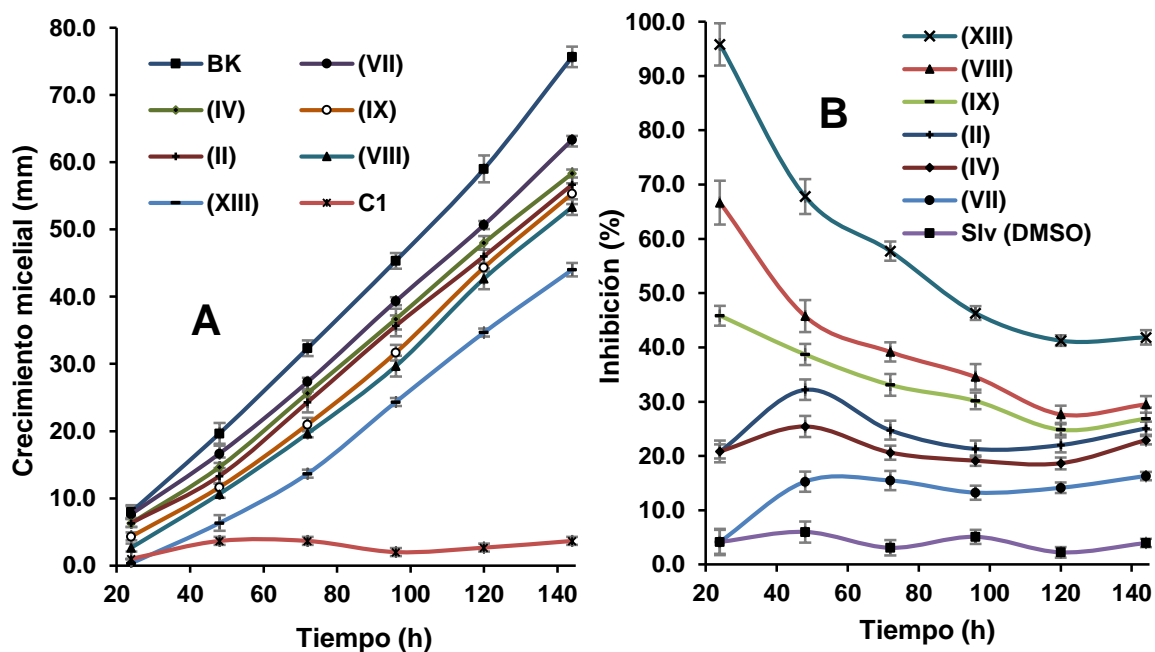
**Figura 4-12** Actividad antifúngica de mezclas de dos compuestos aislados de lima Tahití (1mM), expresada como porcentaje de inhibición de *Colletotrichum* spp.



También se comparó la actividad antifúngica de los compuestos de naturaleza cumarínica 6,7-dimetoxicumarina (VII), 7-hidroxi-6-metoxicumarina (VIII) y 7-hidroxycumarina (IX) reportados como fitoalexina de cítricos, con los aislados de lima Tahití (II y IV) y la mezcla (XIII).

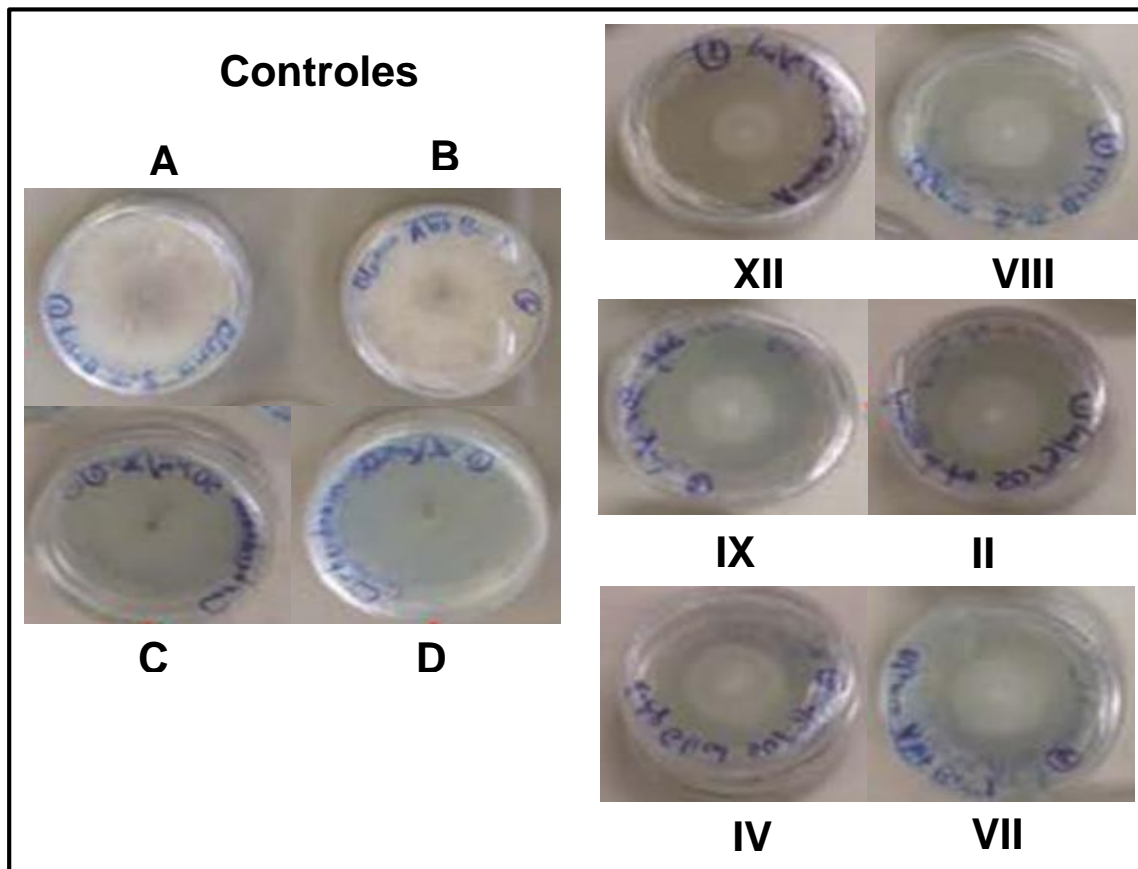
Solo la actividad antifúngica exhibida por la fitoalexina (VIII) fue superior a la obtenida con los compuestos (II) y (IV) aislados de lima Tahití. Sin embargo, la mayor actividad antifúngica fue exhibida por la mezcla (XIII) (Figura 4-13). Otro aspecto para resaltar es que no hubo diferencias significativas entre la reconocida fitoalexina (VII) y el compuesto aislado de Lima Tahití (IV), aunque este último presentó mayores porcentajes de inhibición. De manera semejante sucedió con los compuestos (IX) y (II); pero en este caso, el de mayores porcentajes de inhibición fue el compuesto (IX) reportado en la literatura como una fitoalexina.

**Figura 4-13** Actividad antifúngica de mezclas de compuestos aislados de lima Tahití y algunas fitoalexinas reportadas en cítricos (1,00 mM), expresada como: A, crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp. y B, porcentaje de inhibición de *Colletotrichum* spp.



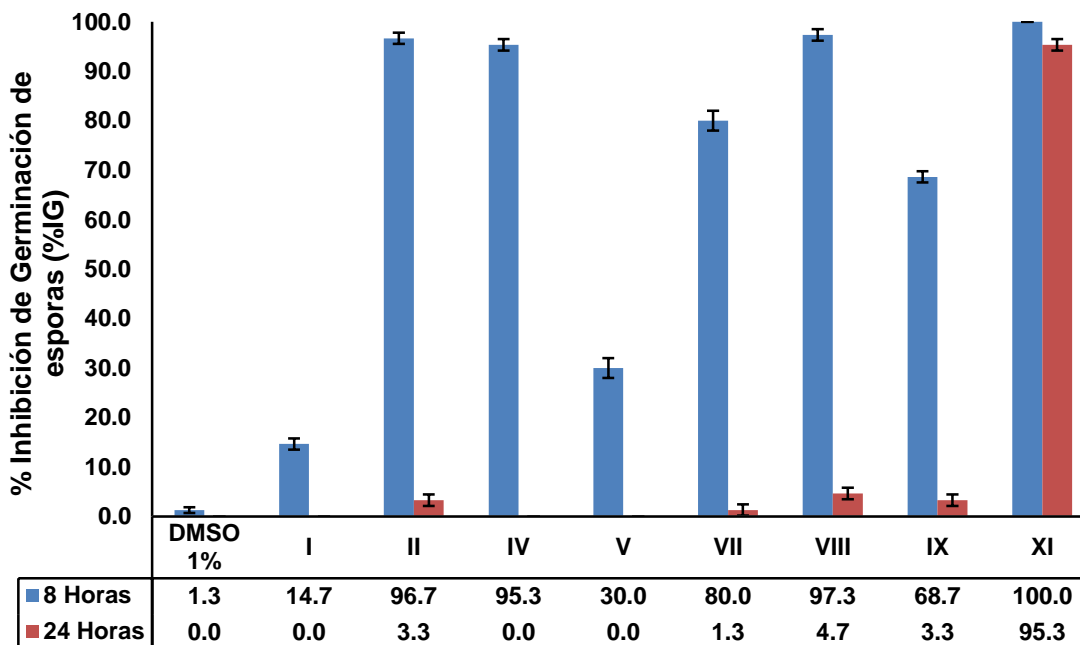
En la Figura 4-14 se puede observar el crecimiento radial del hongo expuesto a algunas de los compuestos aislados, mezclas de estos y fitoalexinas reportadas.

**Figura 4-14** Crecimiento radial del hongo (*Colletotrichum* spp.) frente a algunos compuestos aislados, mezclas de estos y fitoalexinas reportadas (**II**, **IV**, **VII**, **VIII** a 1mM), a las 144 horas. (**A**) control absoluto, (**B**) control solvente y controles positivos (**C**) carbendazim y (**D**) timol.

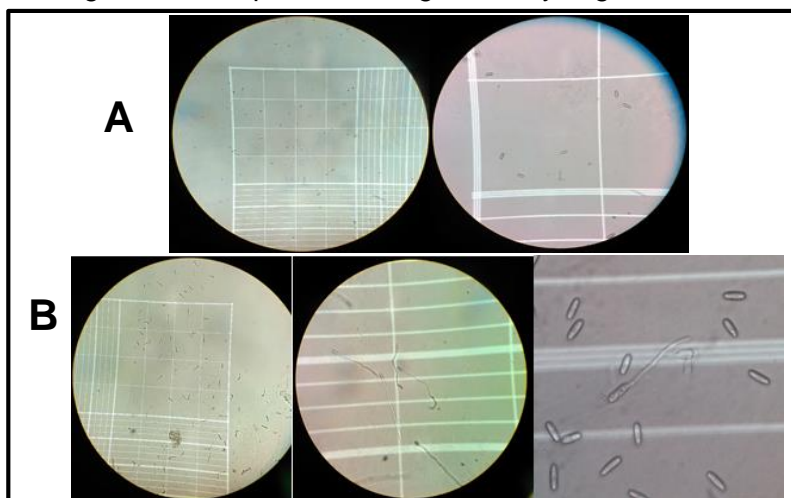


#### 4.4.2 Inhibición de germinación de esporas

Se evaluó el porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *Colletotrichum* spp, Los compuestos analizados fueron: los aislados de frutos de lima Tahití a excepción de (**III** y **VI**); los reportados como fitalexinas de cítricos (**VII**, **VIII** y **IX**); la mezcla (**XI**) y los controles (Solvente DMSO, Carbendazin y Timol). La Figura 4-15, revela un efecto generalizado en la inhibición de la germinación por todos los compuestos a las 8 horas, alcanzando valores de hasta un 100% para la mezcla (**XI**). Los resultados contrastan con los obtenidos a las 24 horas, cuya inhibición se reduce a menos del 5% a excepción de la mezcla (**XI**). Esto sugiere que todos compuestos presentan un efecto fungistático y no fungicida, que en el caso de la mezcla (**XI**) se prolonga hasta las 24 horas y declina drásticamente a un 2% sobre las 48 horas.

**Figura 4-15** Porcentaje de inhibición de germinación de esporas (*Colletotrichum* spp.)

Luego de las primeras 8 horas, los compuestos aislados de lima Tahití, (II) y (IV), exhibieron la mayor actividad inhibitoria alcanzando valores de 97 y 95% respectivamente; estos valores son semejantes a los encontrados para la fitoalexina (VIII), pero superaron la inhibición mostrada por (VII) y (IX) que también son compuestos considerados como fitoalexinas en cítricos. En la Figura 4-16 se observan fotografías del ensayo realizado con las esporas.

**Figura 4-16** Fotografías de esporas; **A** sin germinar y **B** germinadas.

En síntesis, la actividad antifúngica de los diferentes compuestos evaluados sólo presentó un efecto fungistático y moderado sobre el hongo *Colletotrichum* spp. Esto concuerda con lo exhibido sobre otros patógenos como *Candida albicans*, *Fusarium solani* y *Aspergillus fumigatus* [127], [111]. De los compuestos aislados de lima Tahití resaltan (II) y (IV), que exhiben los mayores porcentajes de inhibición. Asimismo, superan el efecto fungistático de compuestos considerados fitoalexinas en cítricos, como es reportado por Simonsen et. al. [128] para *Candida albicans* y *Penicillium expansum*. Otro patrón que se pudo constatar fue la mayor actividad antifúngica del compuesto (VIII) dentro de los considerados fitoalexinas, concordando con lo reportado por Angioni et. al. [129]. Otro patrón que se pudo constatar fue la mayor actividad antifúngica del compuesto (VIII) dentro de los considerados fitoalexinas, concordando con lo reportado por Angioni et. al. [130] como sucedió con los compuestos (II) y (V) frente a *Colletotrichum* spp.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

El empleo de elicitores en frutos de Lima Tahití conservó altos niveles de cumarinas y furanocumarinas, pudiendo así prolongar la vida útil de los frutos.

Se desarrolló una metodología para la detección de compuestos relacionados con los mecanismos de defensa de frutos de Lima Tahití. Esta metodología puede ser usada en la selección de materiales promisorios para los programas de fitomejoramiento en el sector cítrico.

Fueron identificados seis compuestos en frutos de lima Tahití, de los cuales (II) y (IV) mostraron actividad antifúngica; contribuyendo así, con estructuras para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos. Se encontraron por primera vez, efectos aditivos o sinérgicos entre los metabolitos aislados contra el hongo *Colletotrichum* spp.

Nuestros hallazgos, permitían diseñar nuevas estrategias para el control de enfermedades en cítricos.

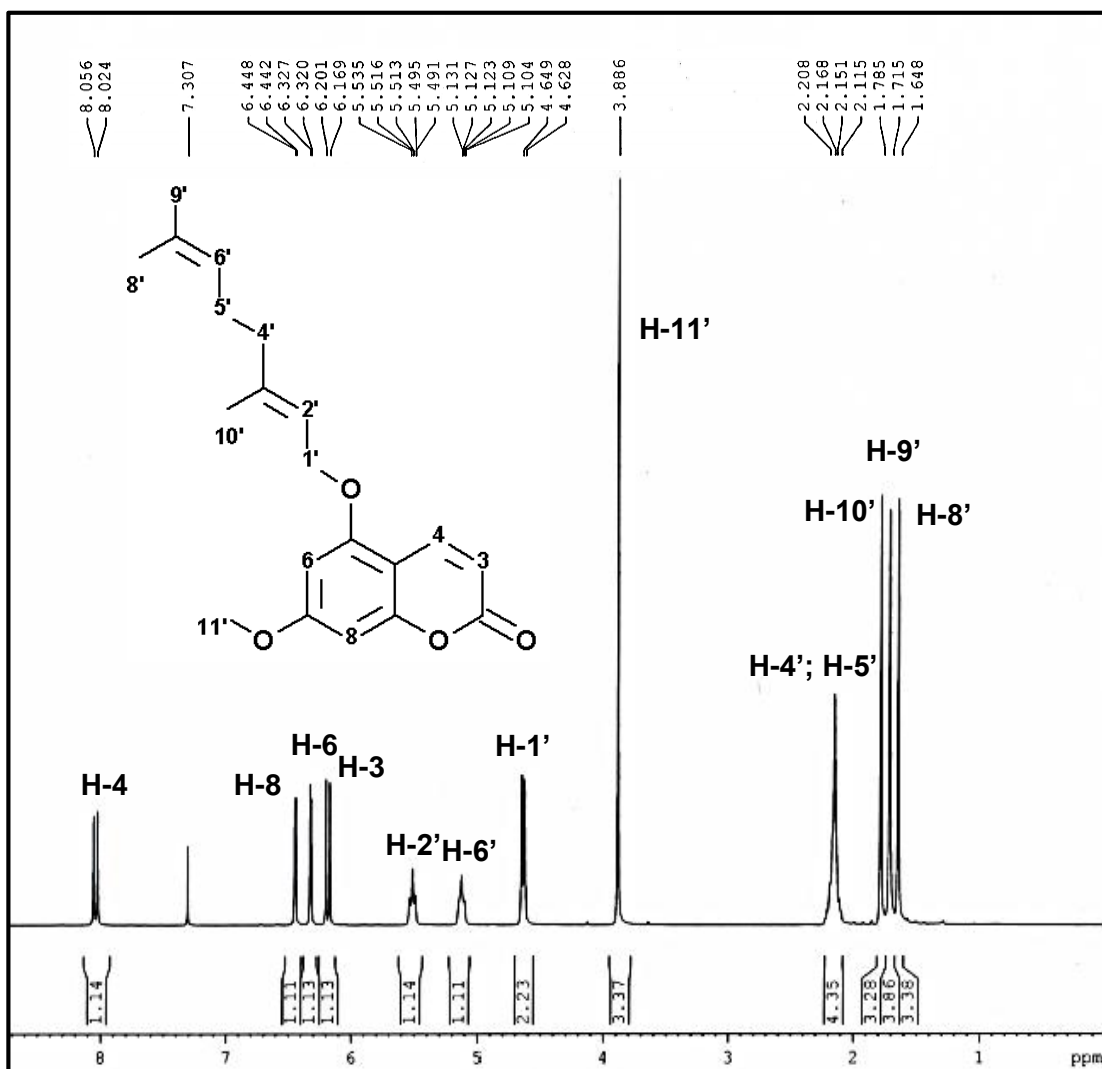
## 5.2 Recomendaciones

Realizar el aislamiento e identificación de los compuestos presentes en la corteza de frutos de lima Tahití que no se lograron reconocer en el presente estudio y evaluar su actividad antifúngica contra el hongo *Colletotrichum* spp.

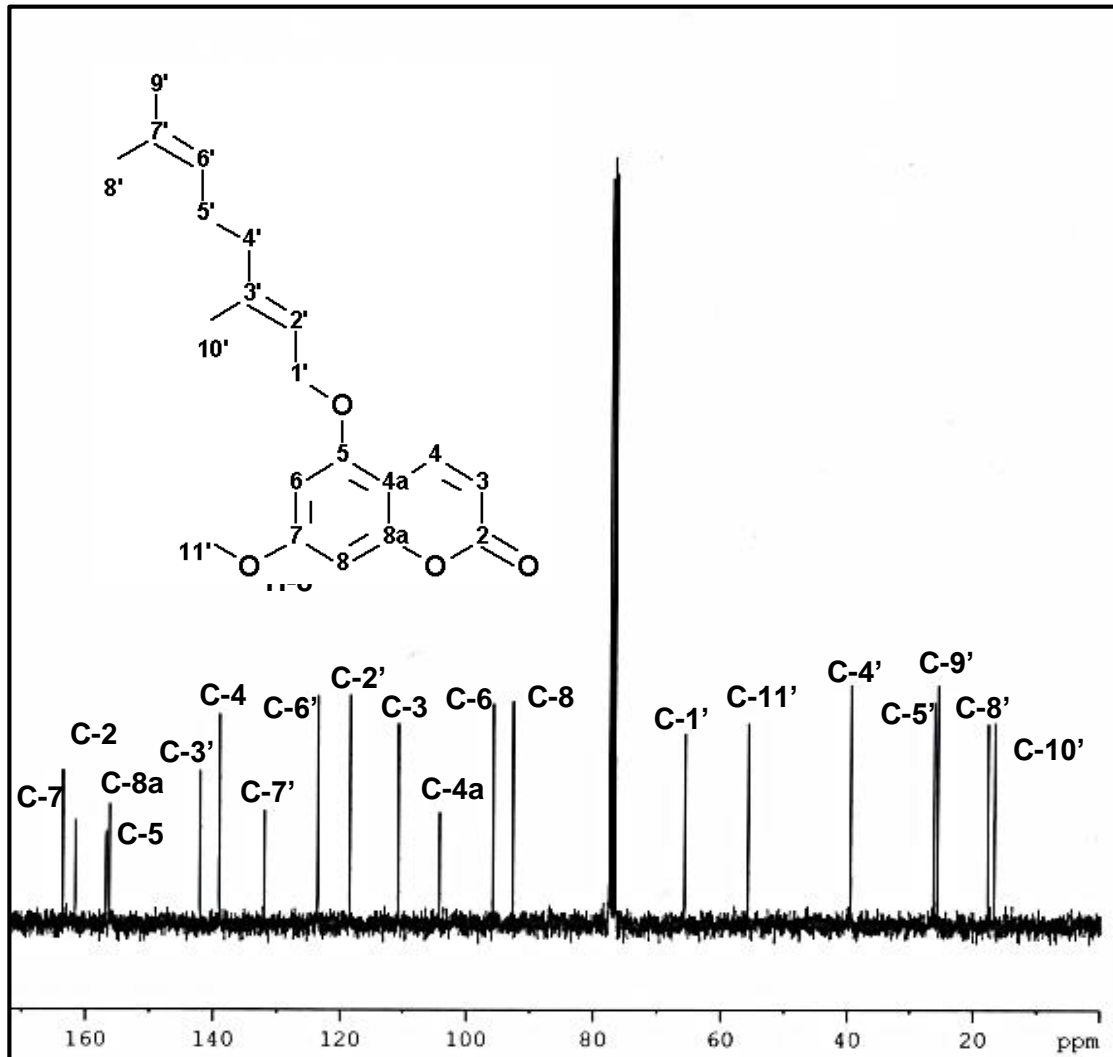
Realizar un estudio más detallado, que permita establecer claramente el papel (fitoanticipinas o fitoalexinas) de los compuestos aislados en lima Tahití. Para lo cual se tenga en cuenta el empleo de otro tipo de elicitores como los relacionados con la pared celular de hongos. También evaluar diferentes concentraciones, tiempos de inducción e incubación.

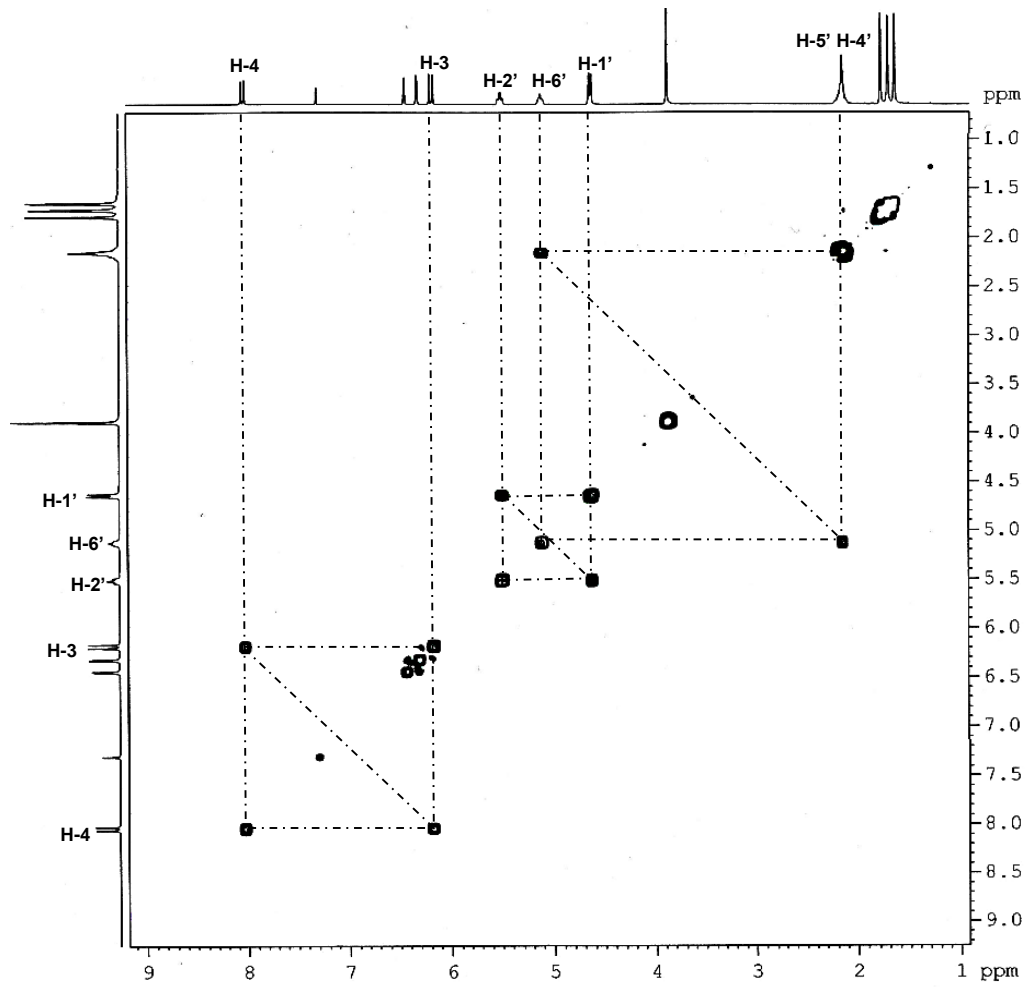
# Anexo A: Espectros de RMN, IR, UV

Compuesto (I): 5-geranoxi-7-metoxicumarina

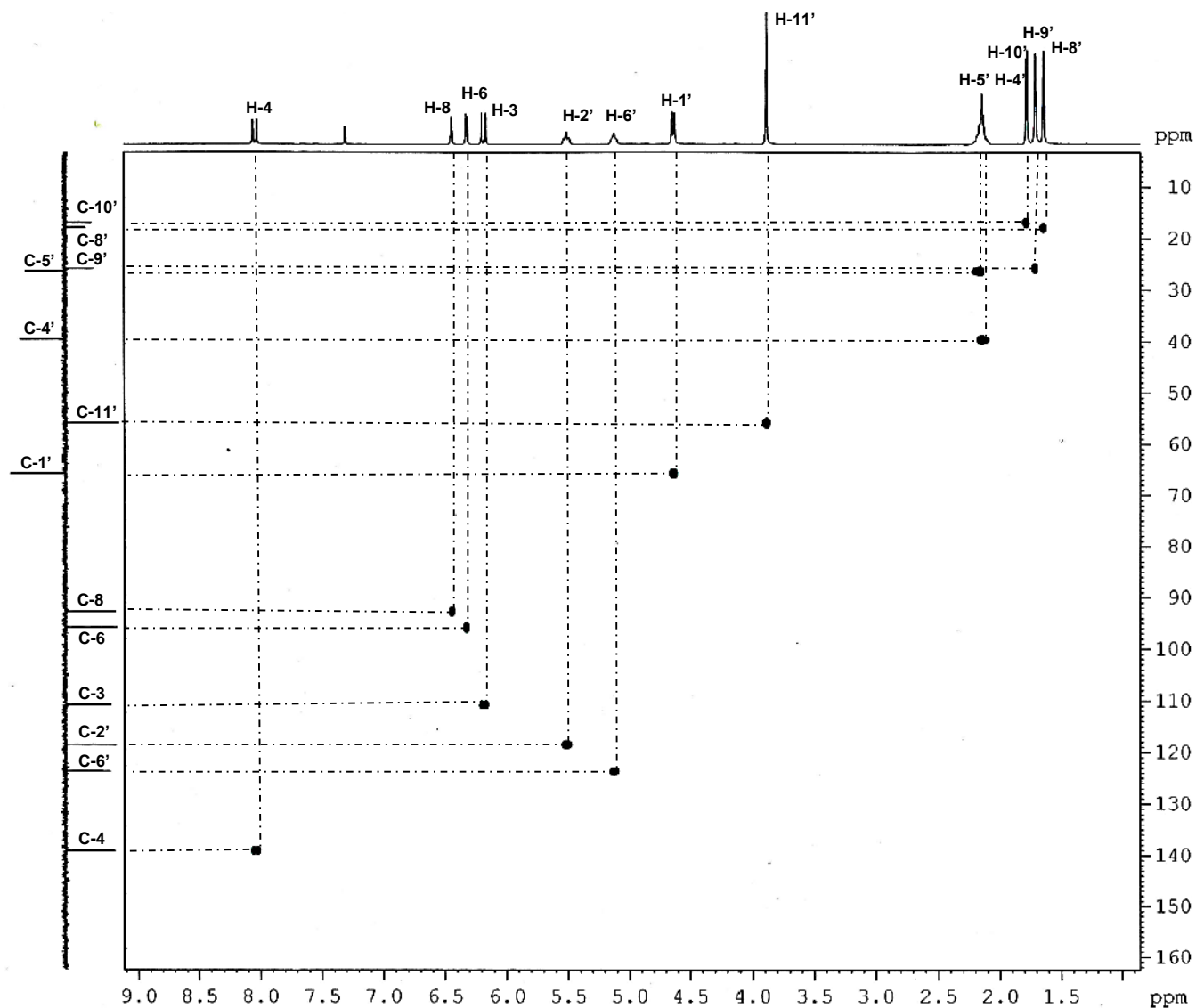


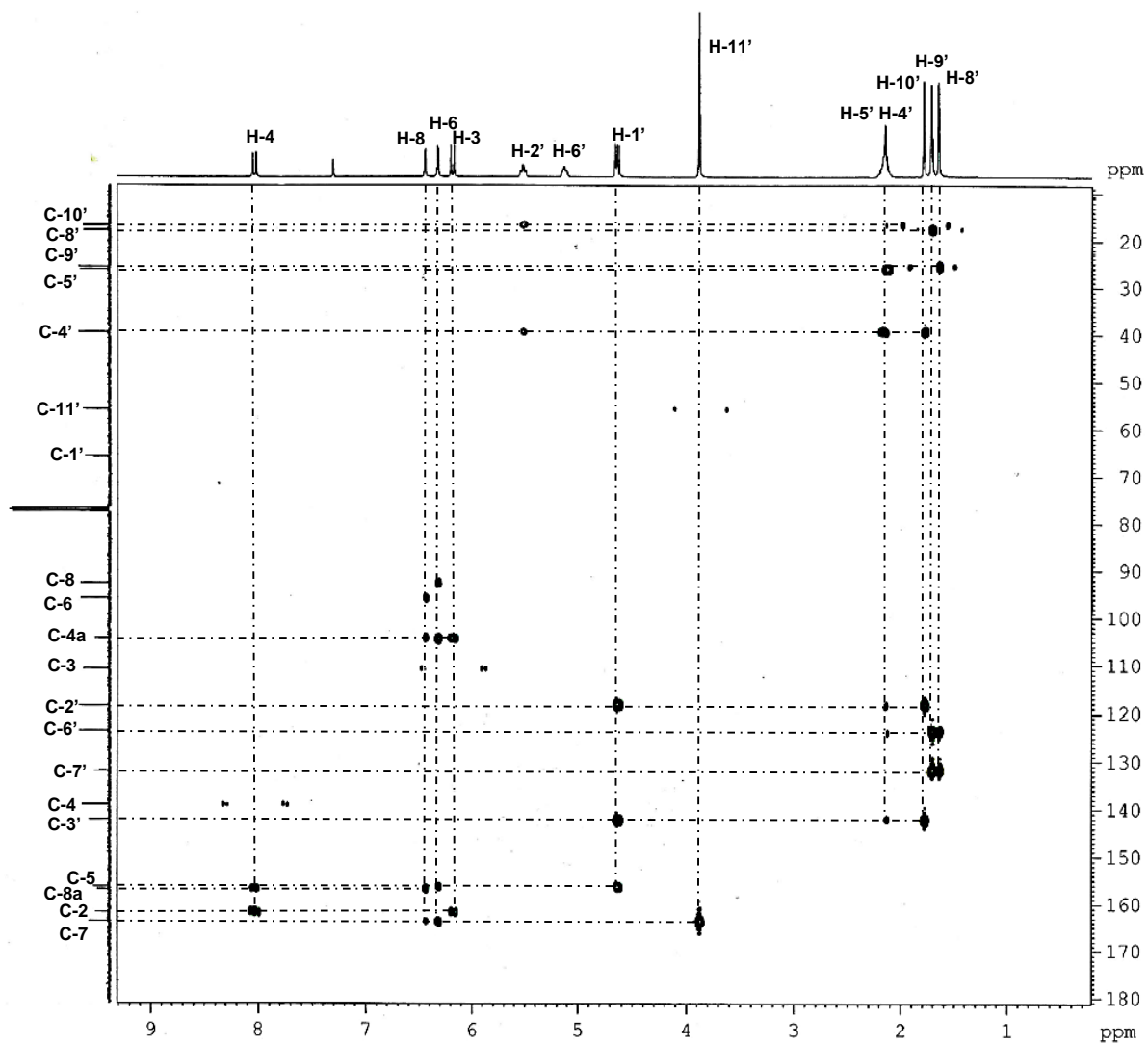
Espectro de <sup>13</sup>C RMN de la 5-geranoxi-7-metoxicumarina

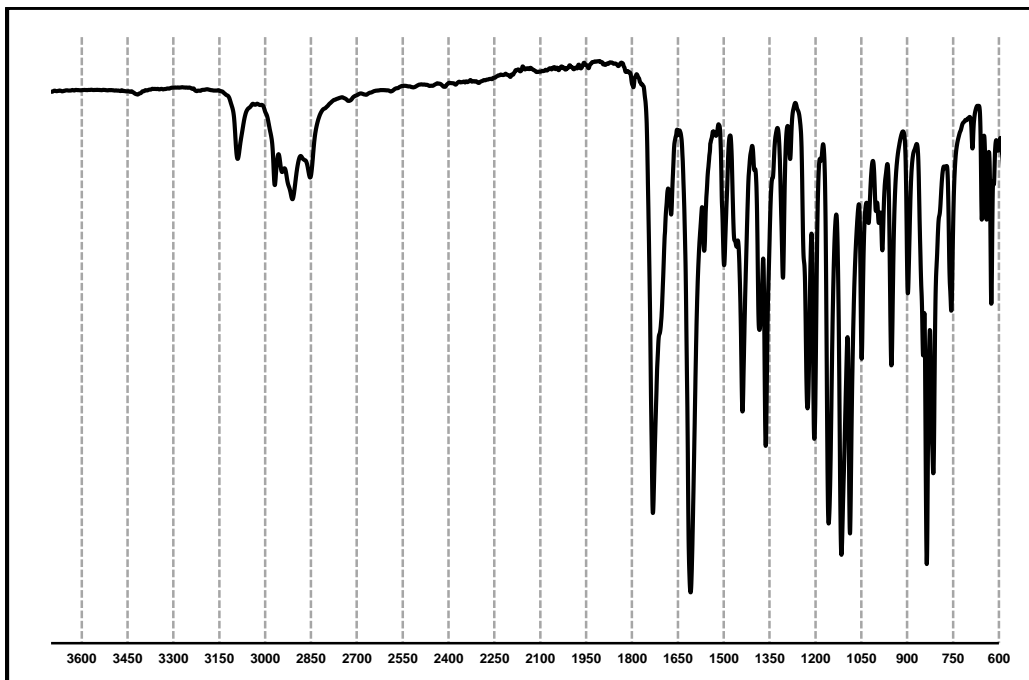
Espectro de <sup>1</sup>H RMN de la 5-geranoxi-7-metoxicumarina



Espectro de RMN COSY en  $\text{CDCl}_3$  de 5-geranoxi-7-metoxicumarina

Espectro de RMN HSQC en  $\text{CDCl}_3$  de 5-geranoxi-7-metoxicumarina

Espectro de RMN HMBC en  $\text{CDCl}_3$  de 5-geranoxi-7-metoxicumarina

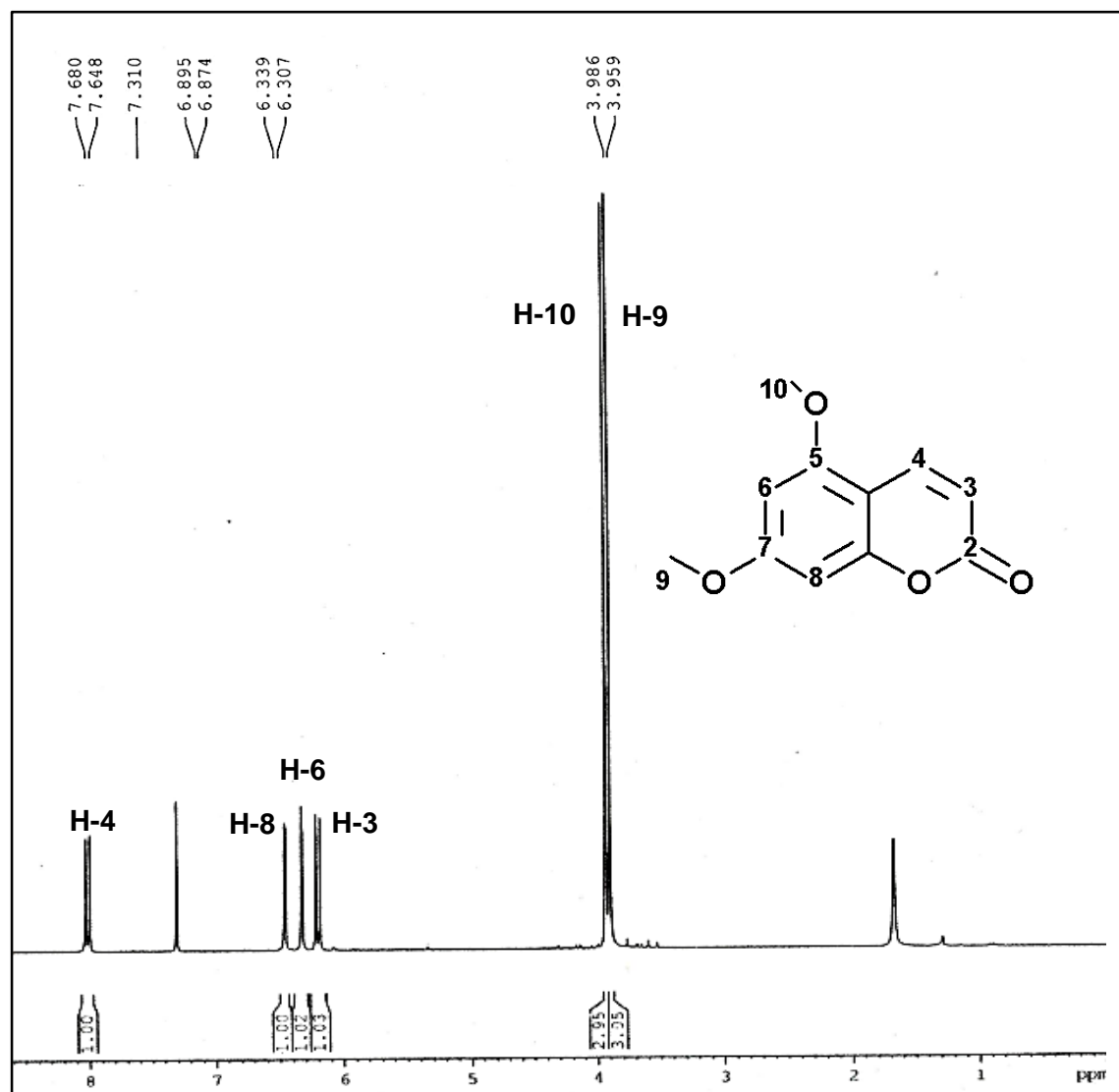


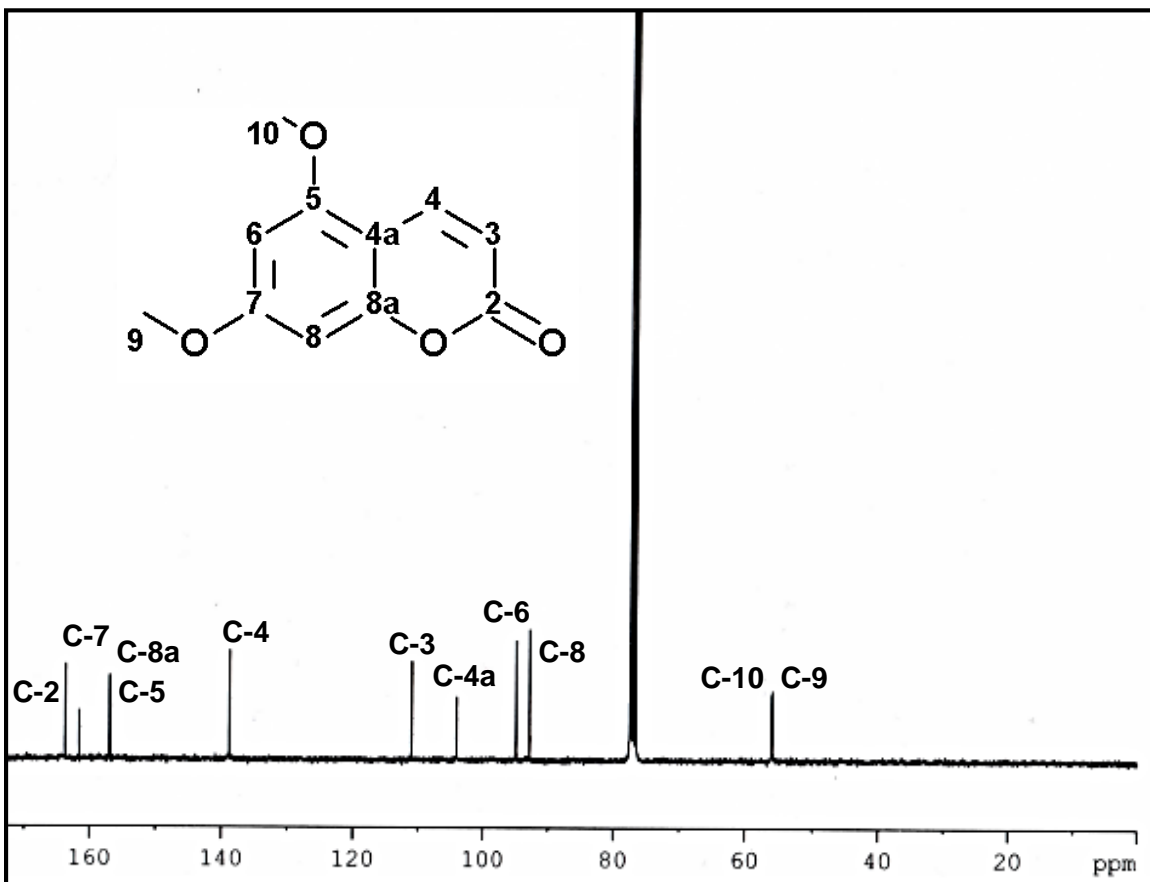
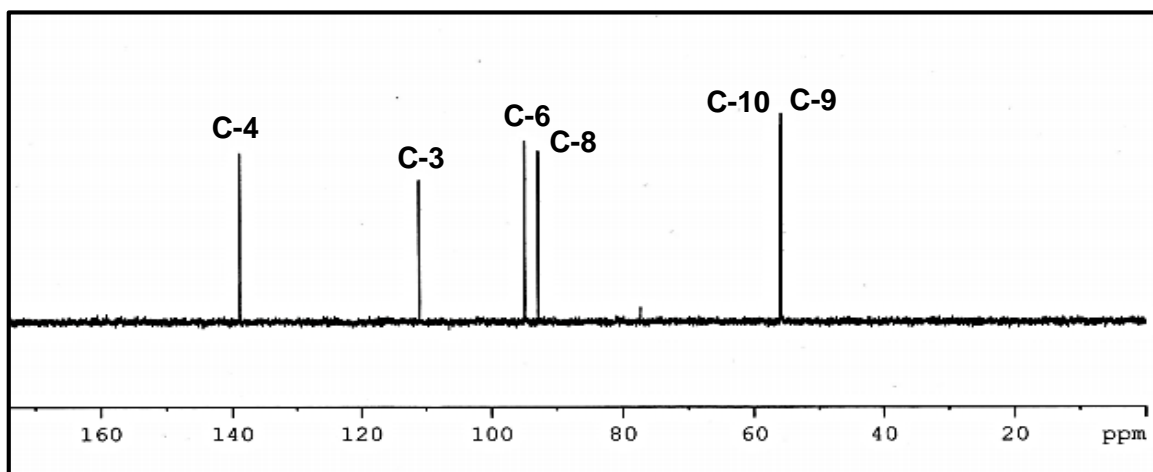
Espectro de IR de la 5-geranoxi-7-metoxicumarina



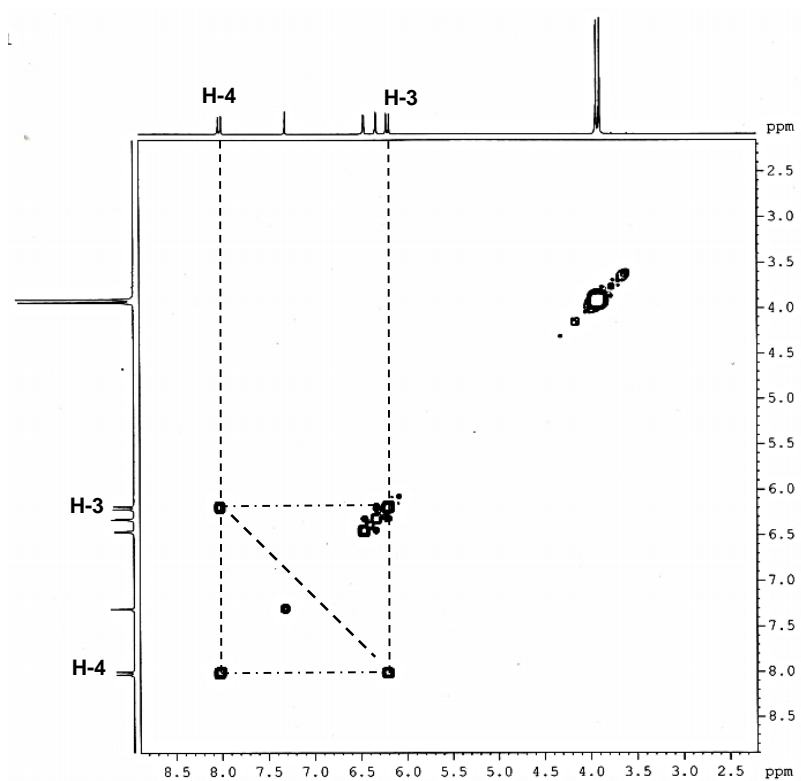
Espectro UV de la 5-geranoxi-7-metoxicumarina

## Compuesto (II): 5,7-dimetoxicumarina

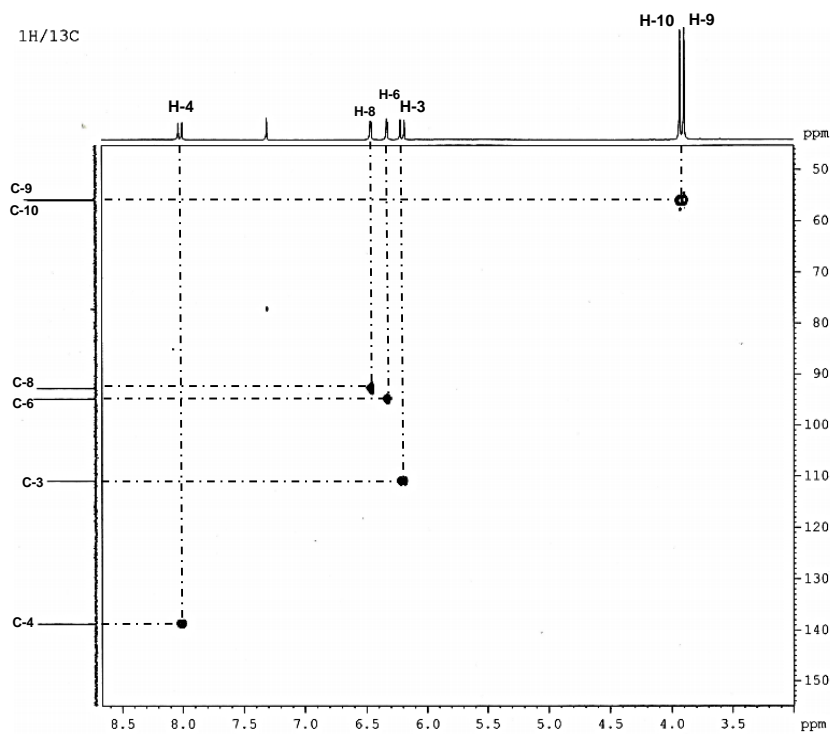
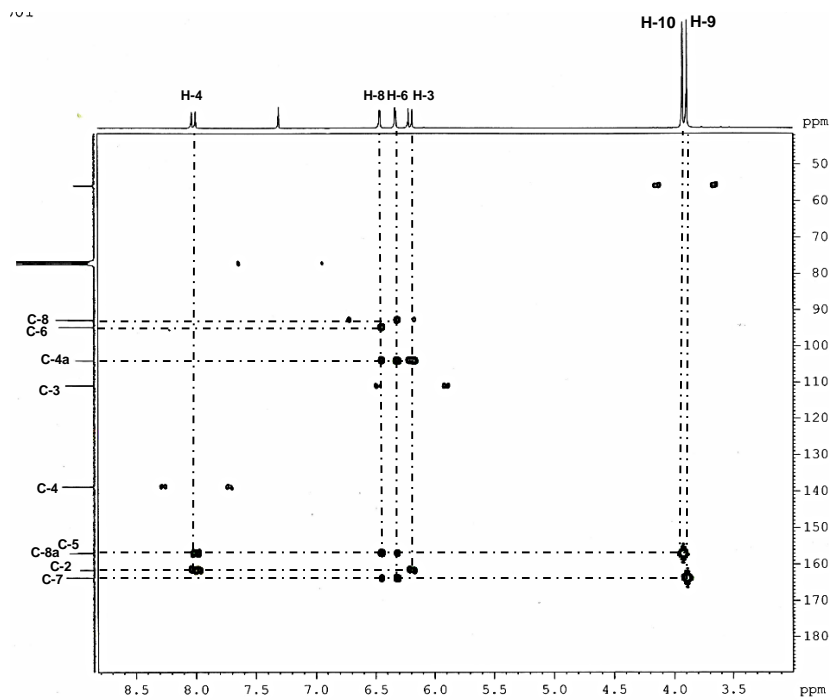
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5,7-dimetoxicumarina

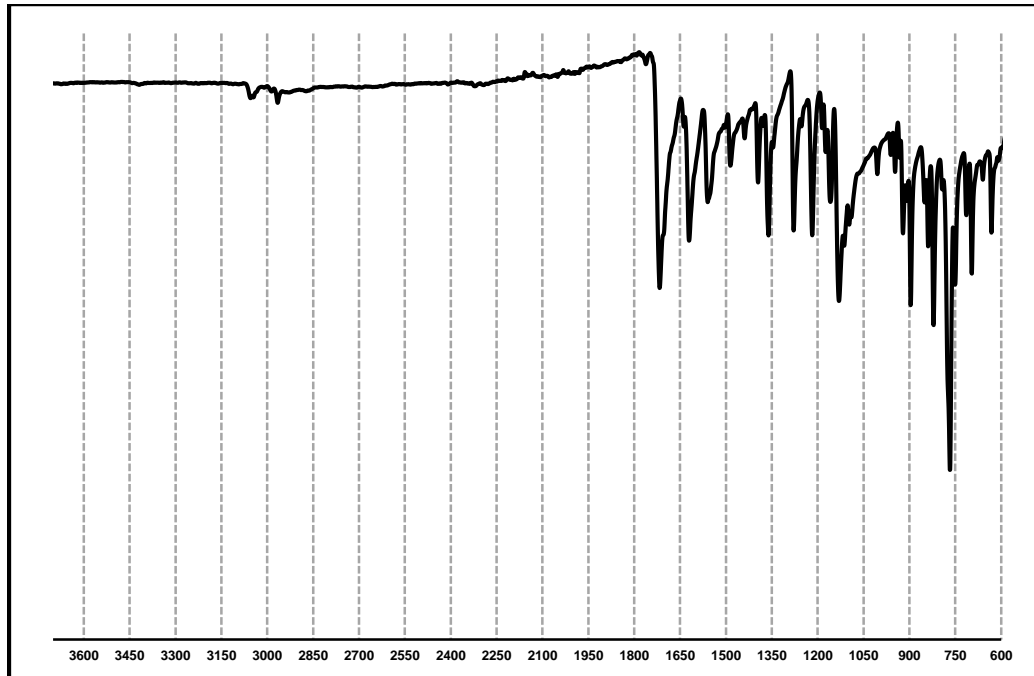
Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5,7-dimetoxicumarina

Espectro de RMN (DEPT 135) en  $\text{CDCl}_3$  de 5,7-dimetoxicumarina

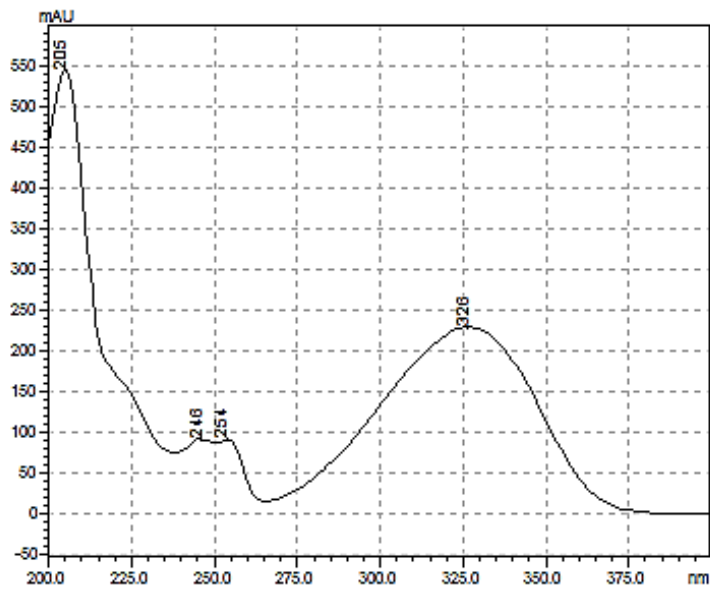


Espectro de RMN COSY en  $\text{CDCl}_3$  de 5,7-dimetoxicumarina

Espectro de RMN HSQC en  $\text{CDCl}_3$  de 5,7-dimetoxicumarinaEspectro de RMN HMBC en  $\text{CDCl}_3$  de 5,7-dimetoxicumarina

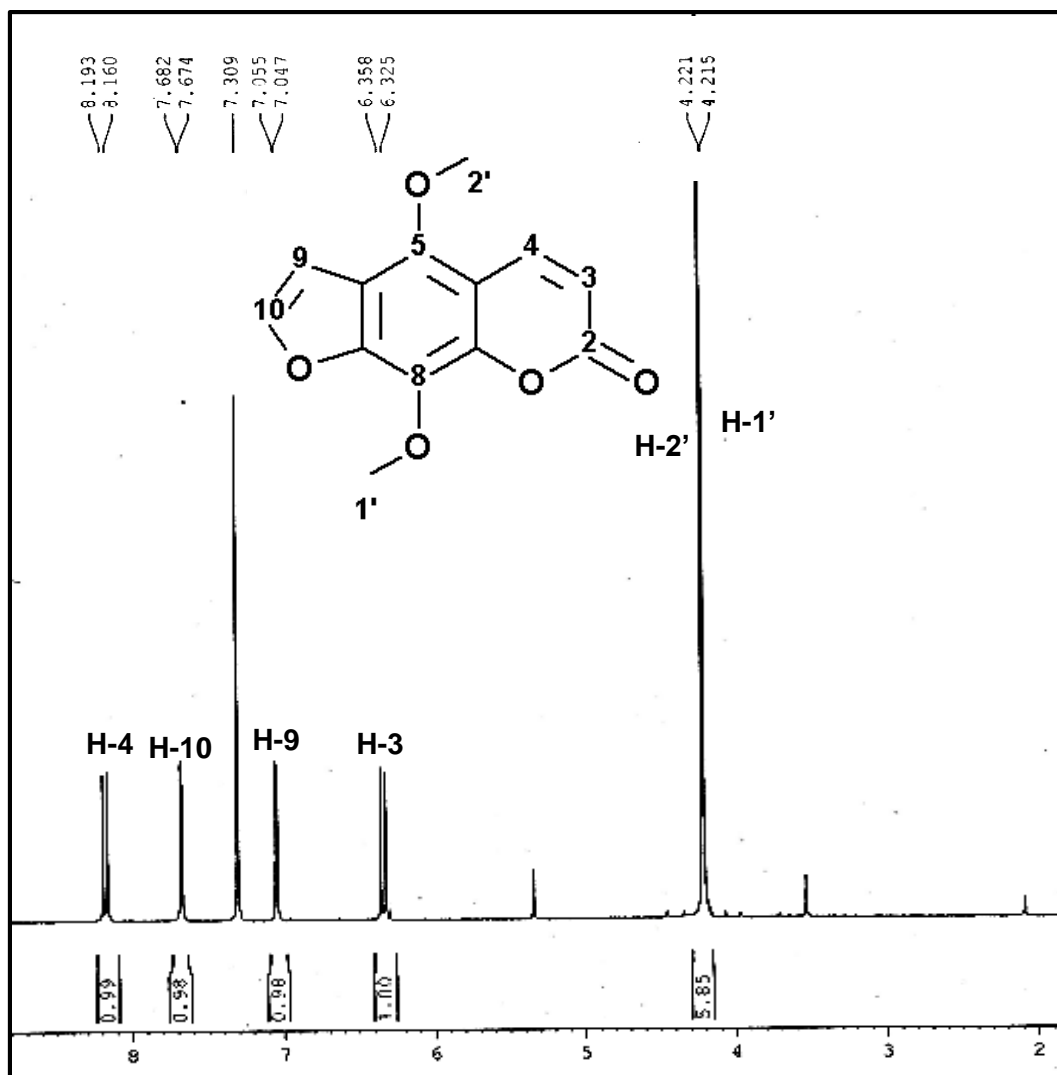


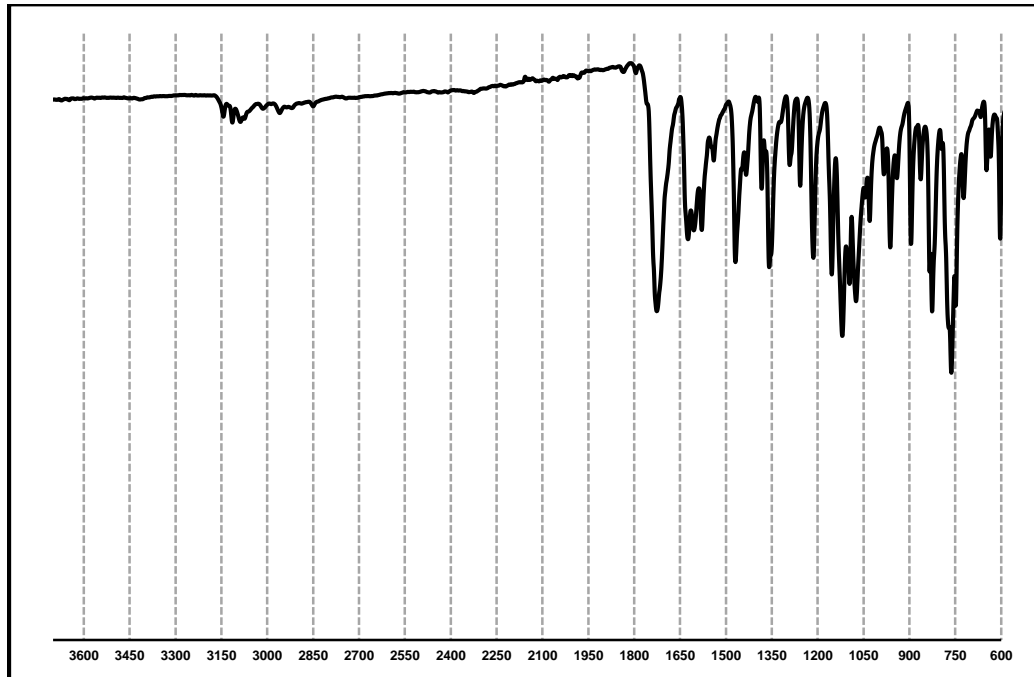
Espectro de IR de la 5,7-dimetoxicumarina



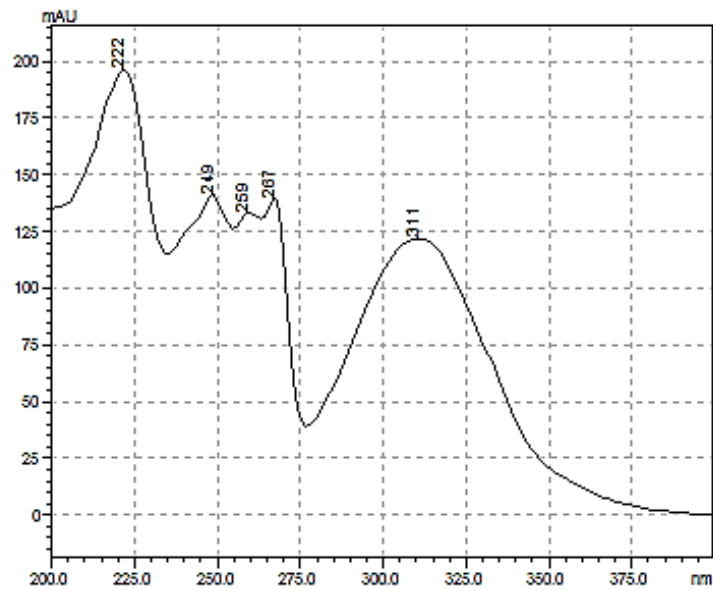
Espectro UV de la 5,7-dimetoxicumarina

## Compuesto(III): 5,8-dimetoxipsoraleno

Espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5,8-dimetoxipsoraleno

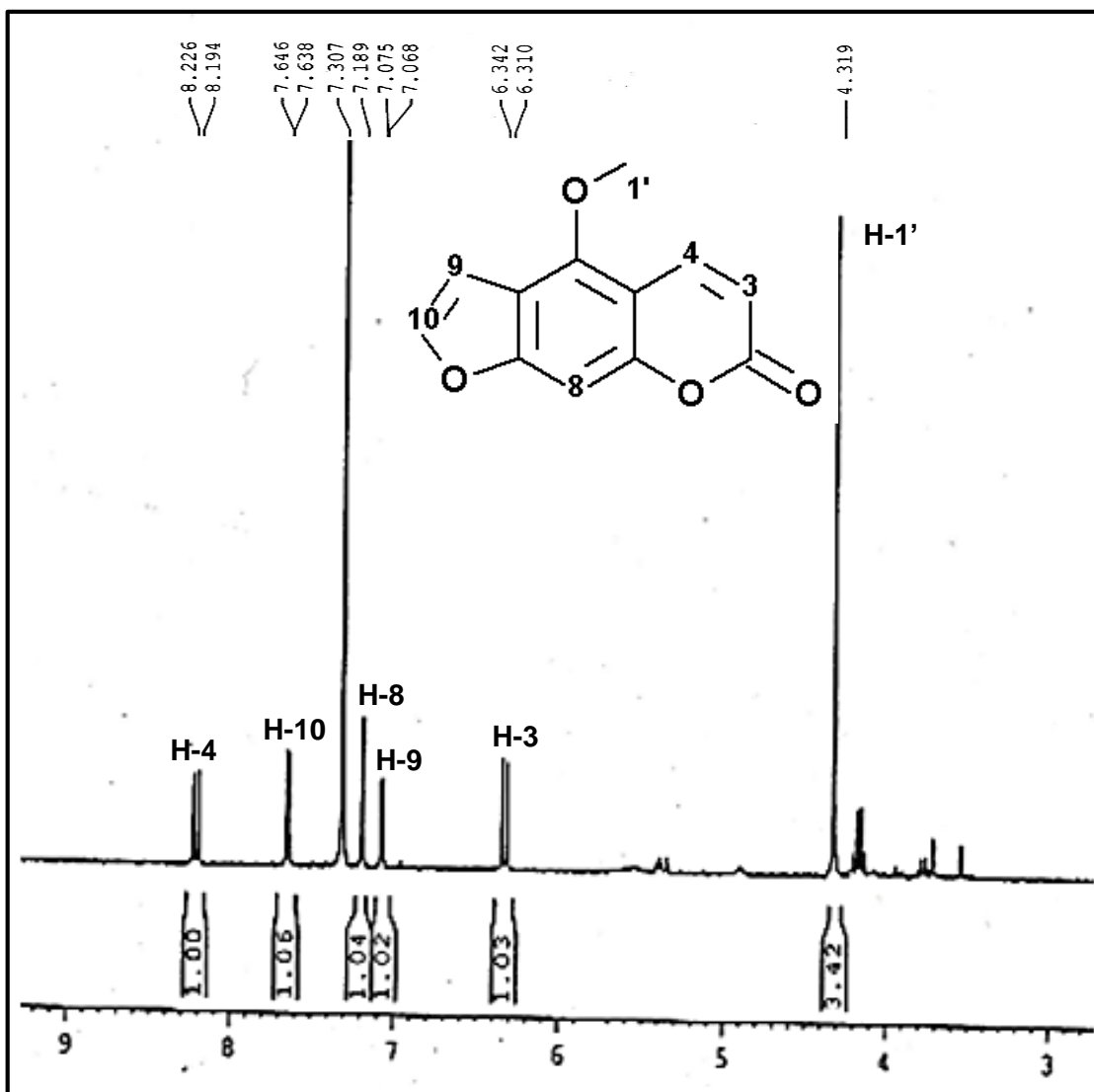


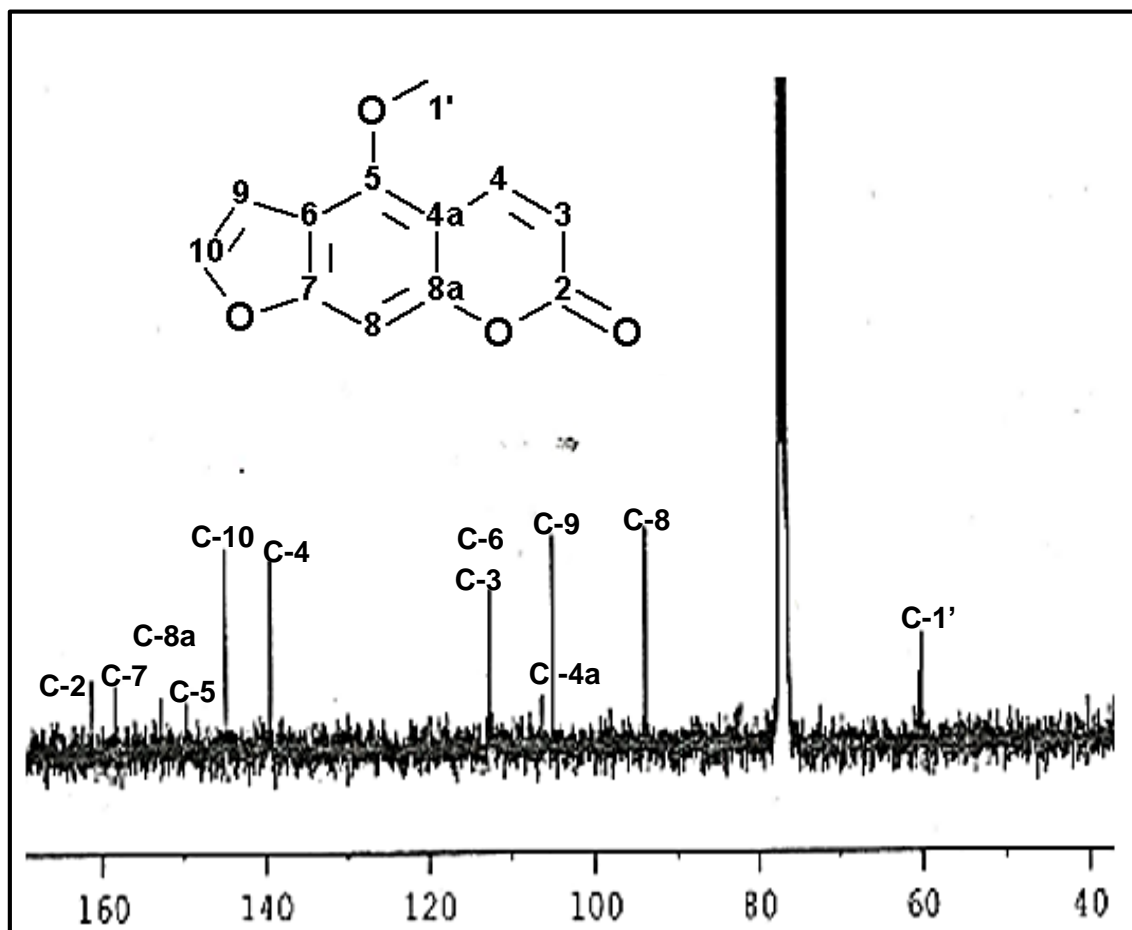
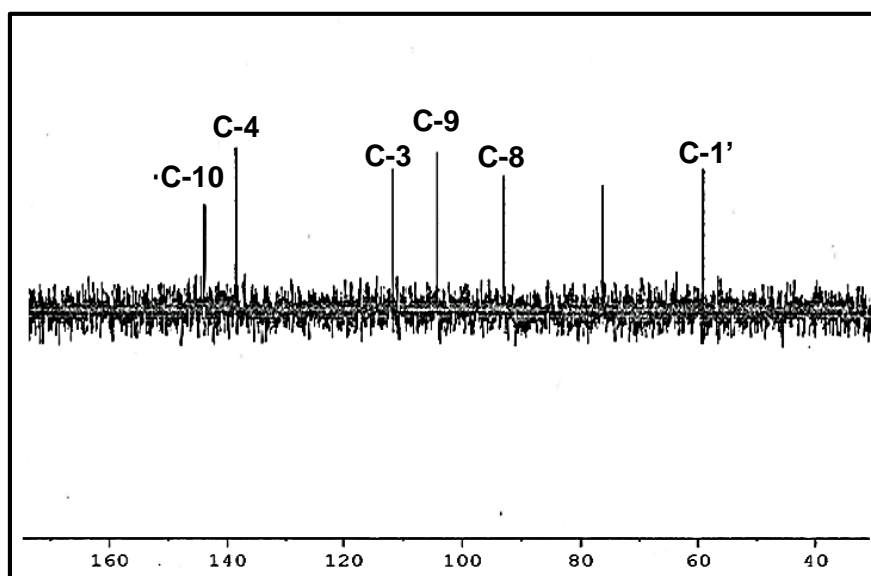
Espectro IR del 5,8-dimetoxipsoraleno

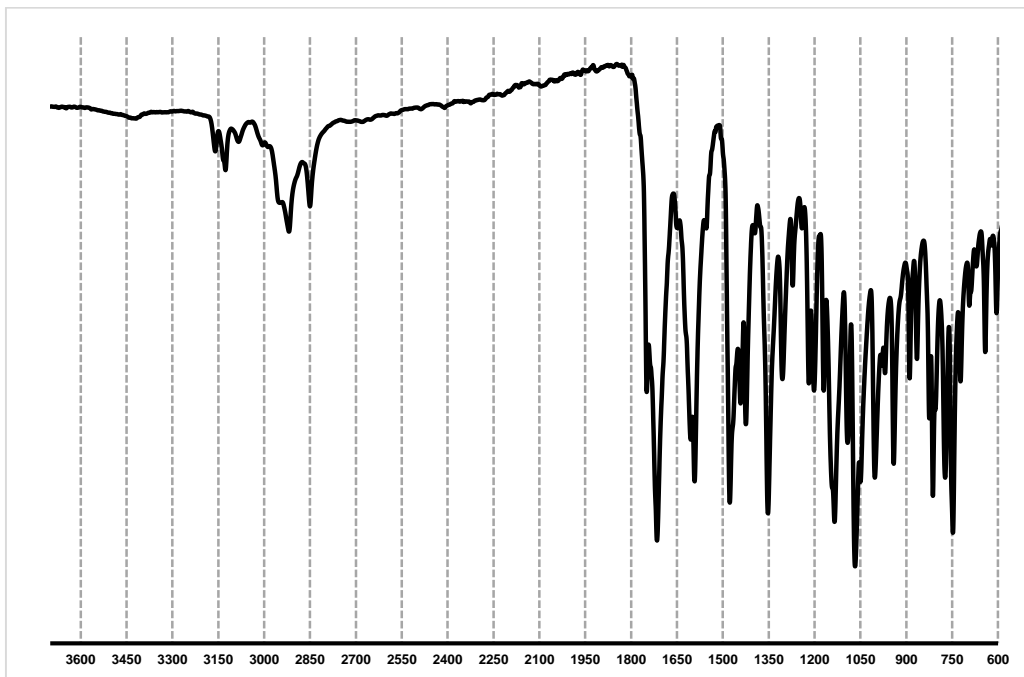


Espectro UV del 5,8-dimetoxipsoraleno

## Compuesto (IV): 5-metoxipsoraleno

Espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5-metoxipsoraleno

Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5-metoxipsoralenoEspectro de RMN (DEPT 135) en  $\text{CDCl}_3$  de 5-metoxipsoraleno

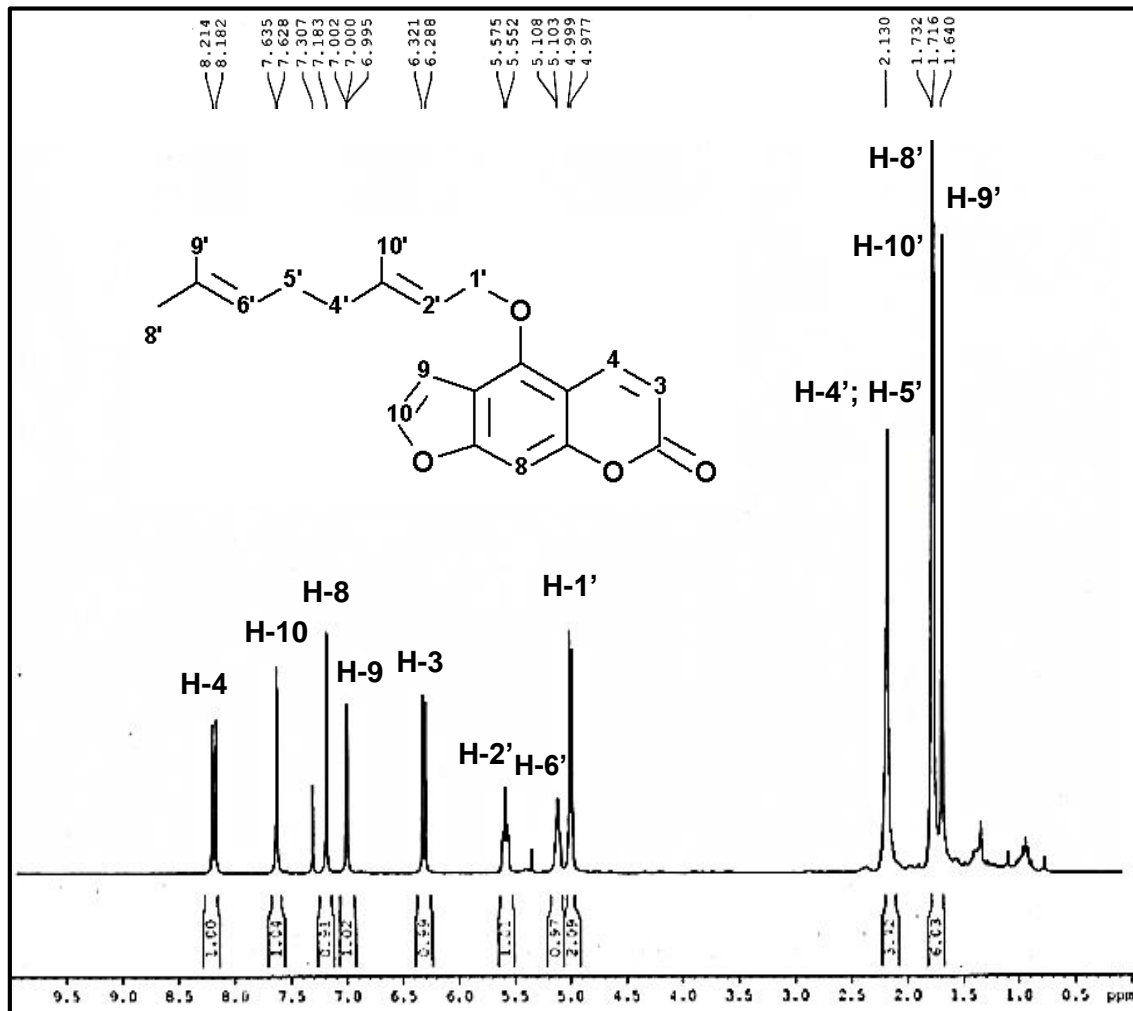


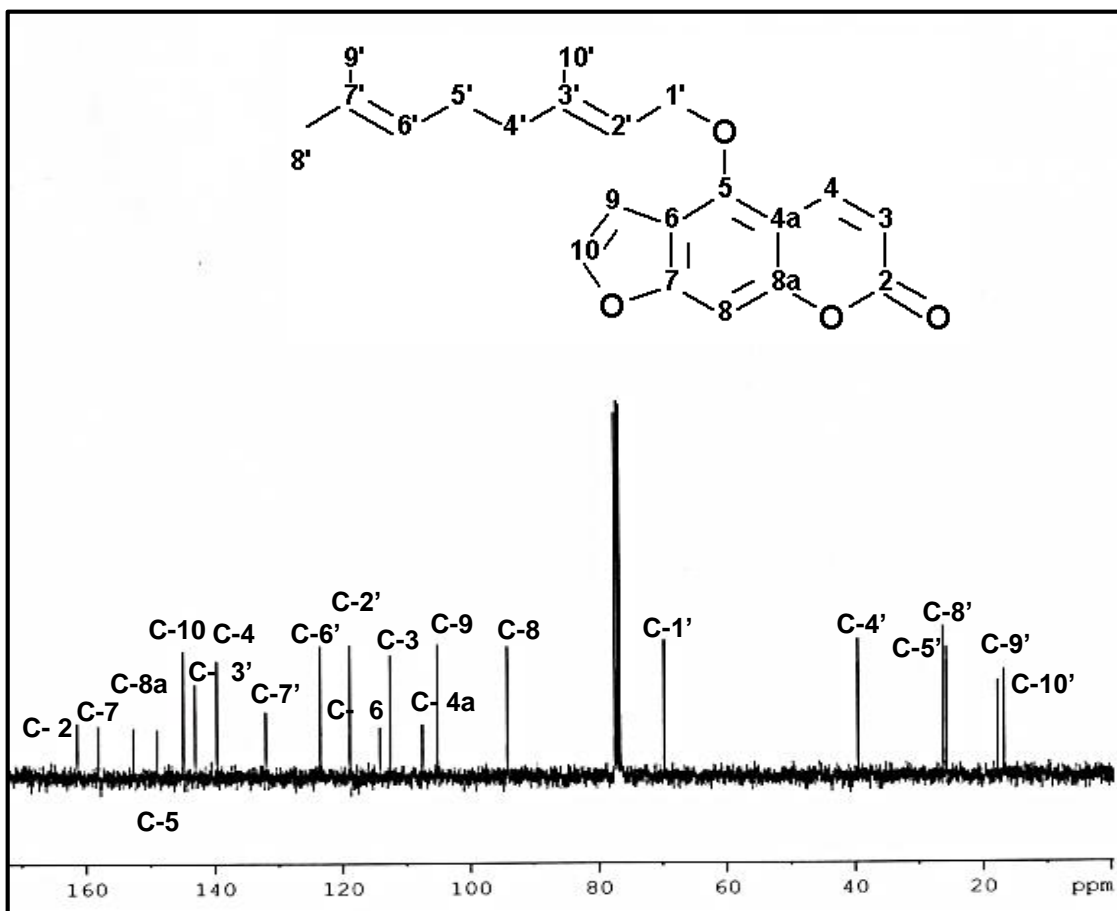
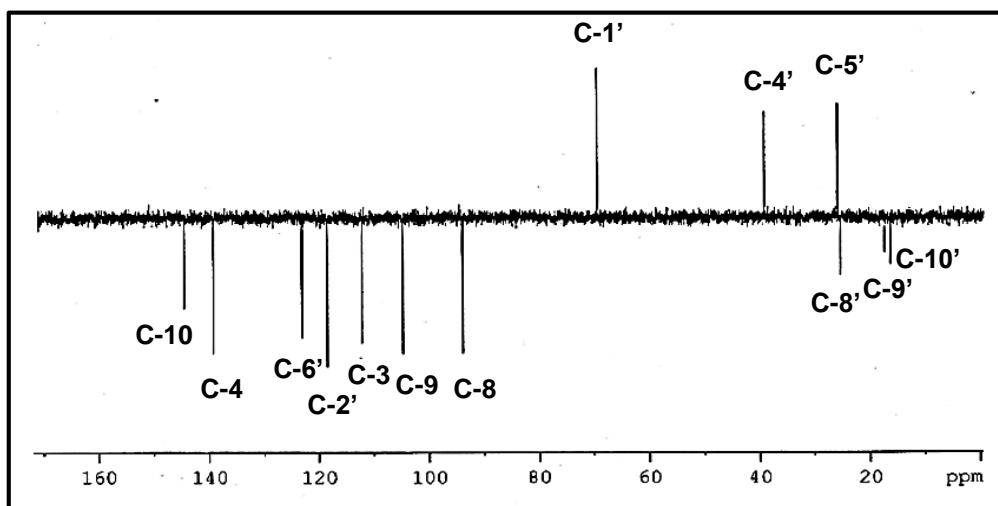
Espectro IR del 5-metoxipsoraleno

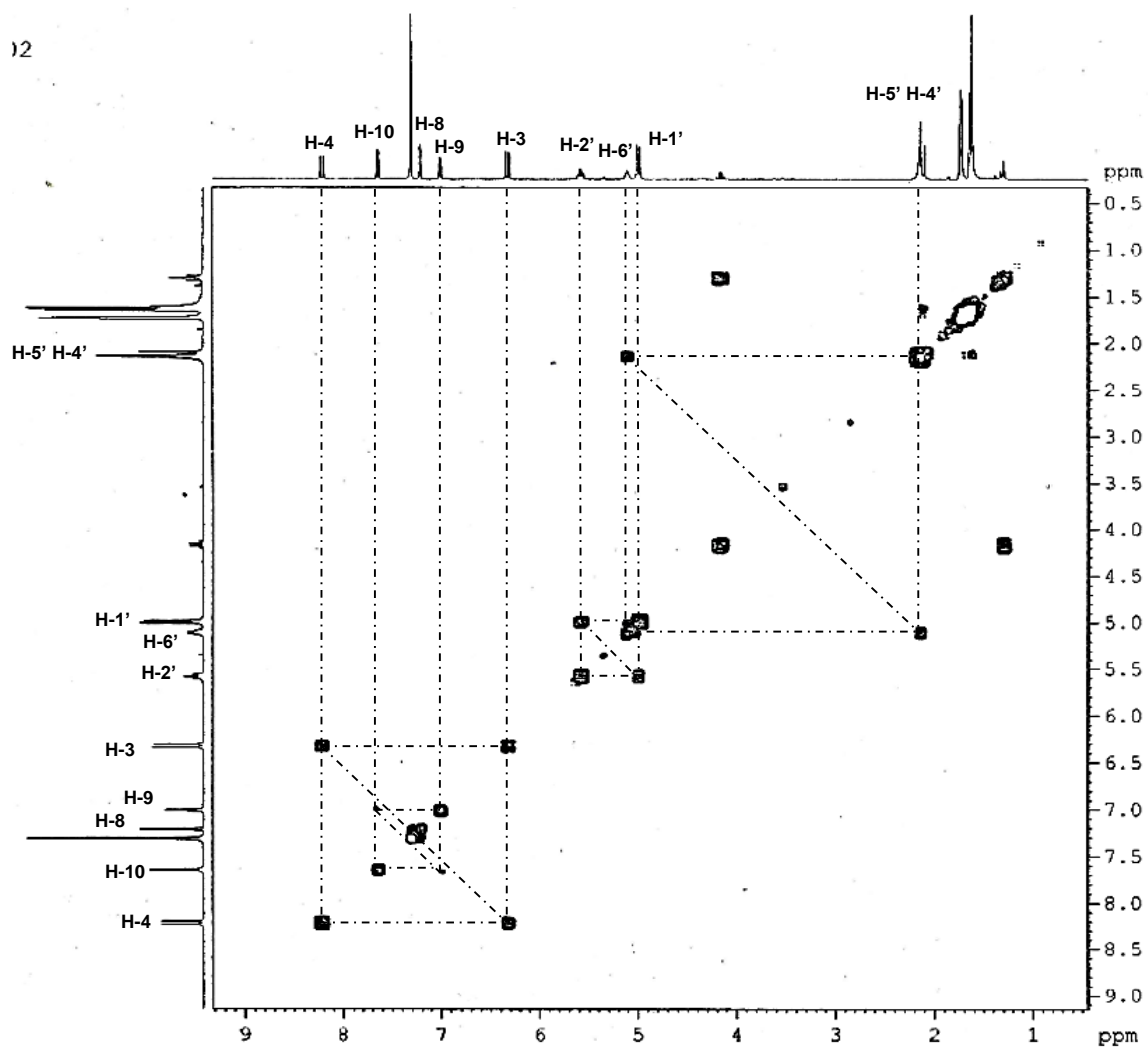


Espectro UV del 5-metoxipsoraleno

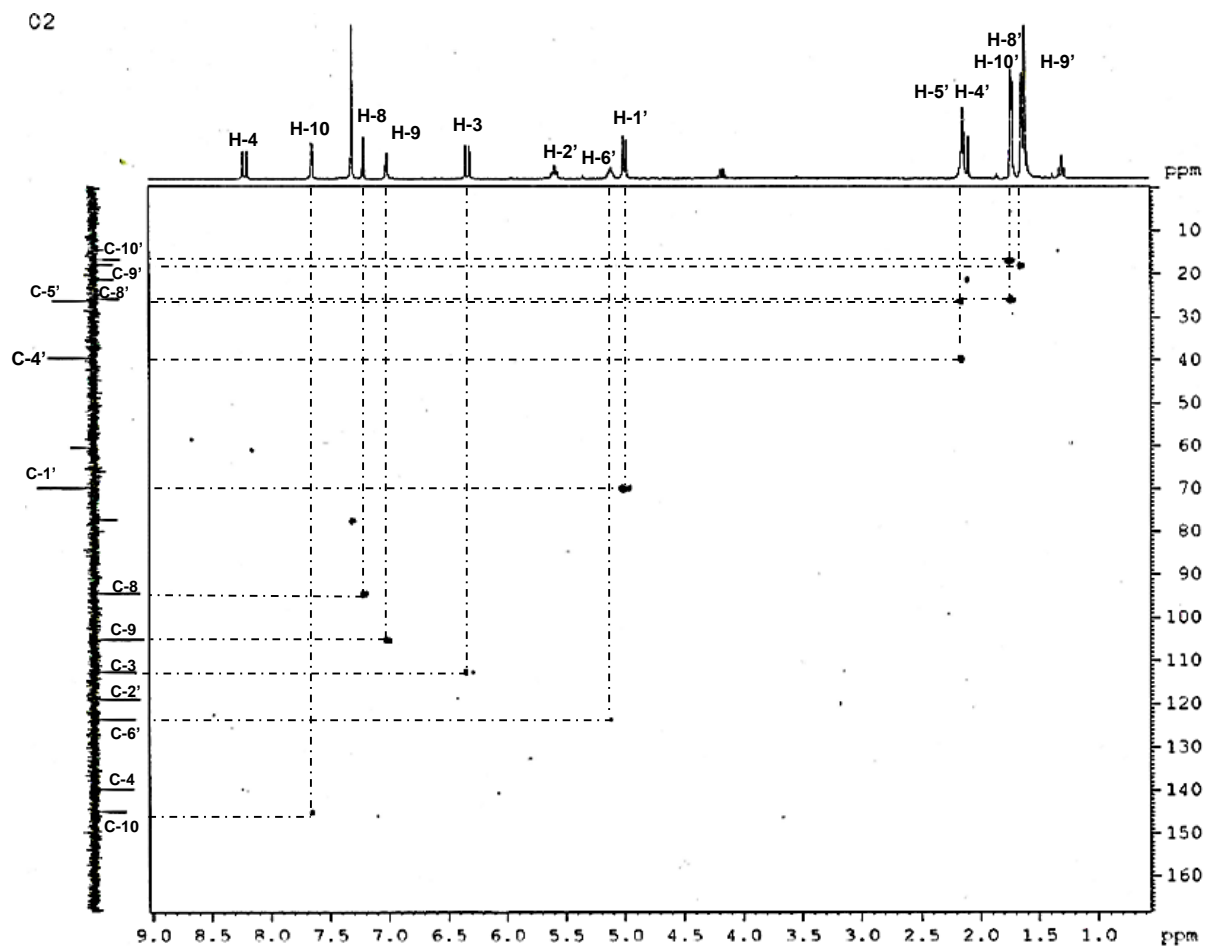
## Compuesto (V): 5-geranoxipsoraleno

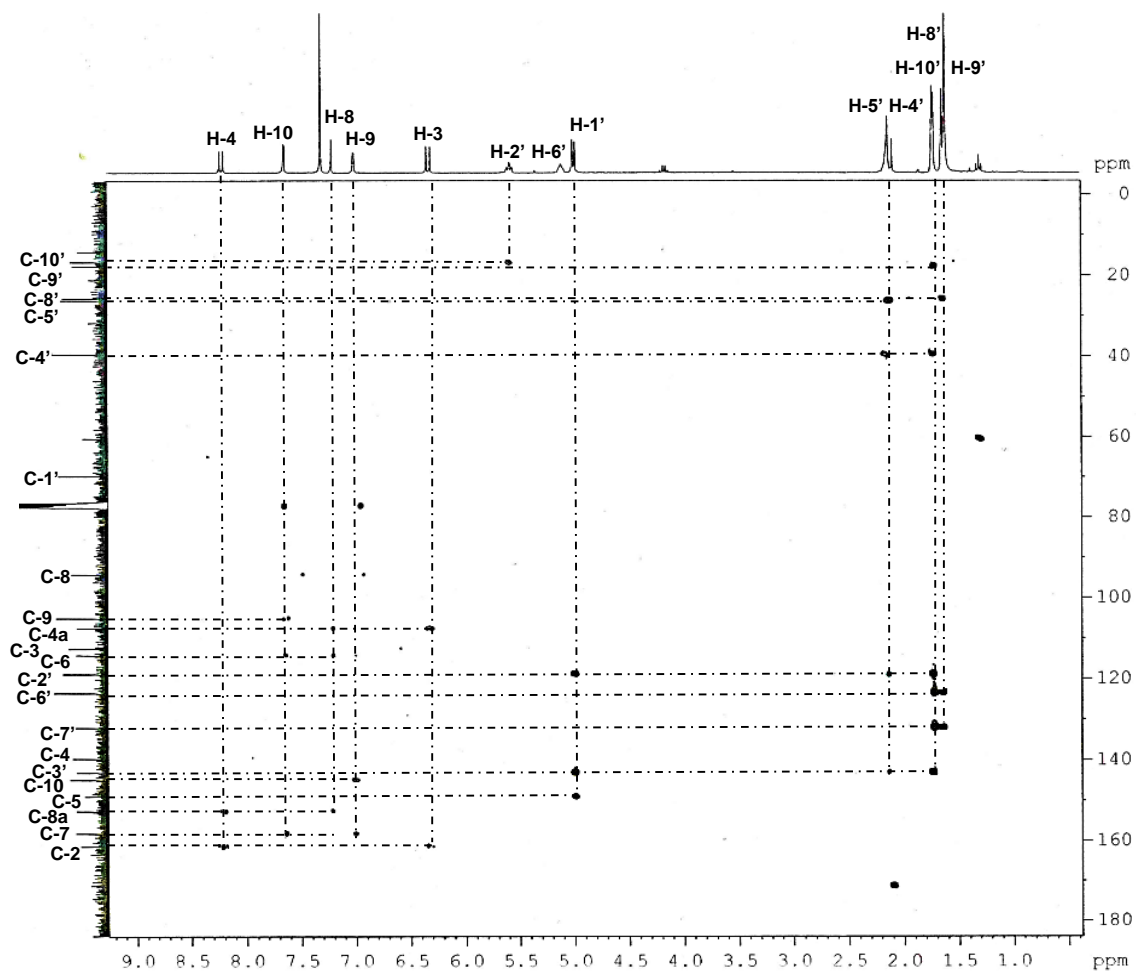
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5-geranoxipsoraleno

Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5-geranoxipsoralenoEspectro de J-mod RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5-geranoxipsoraleno

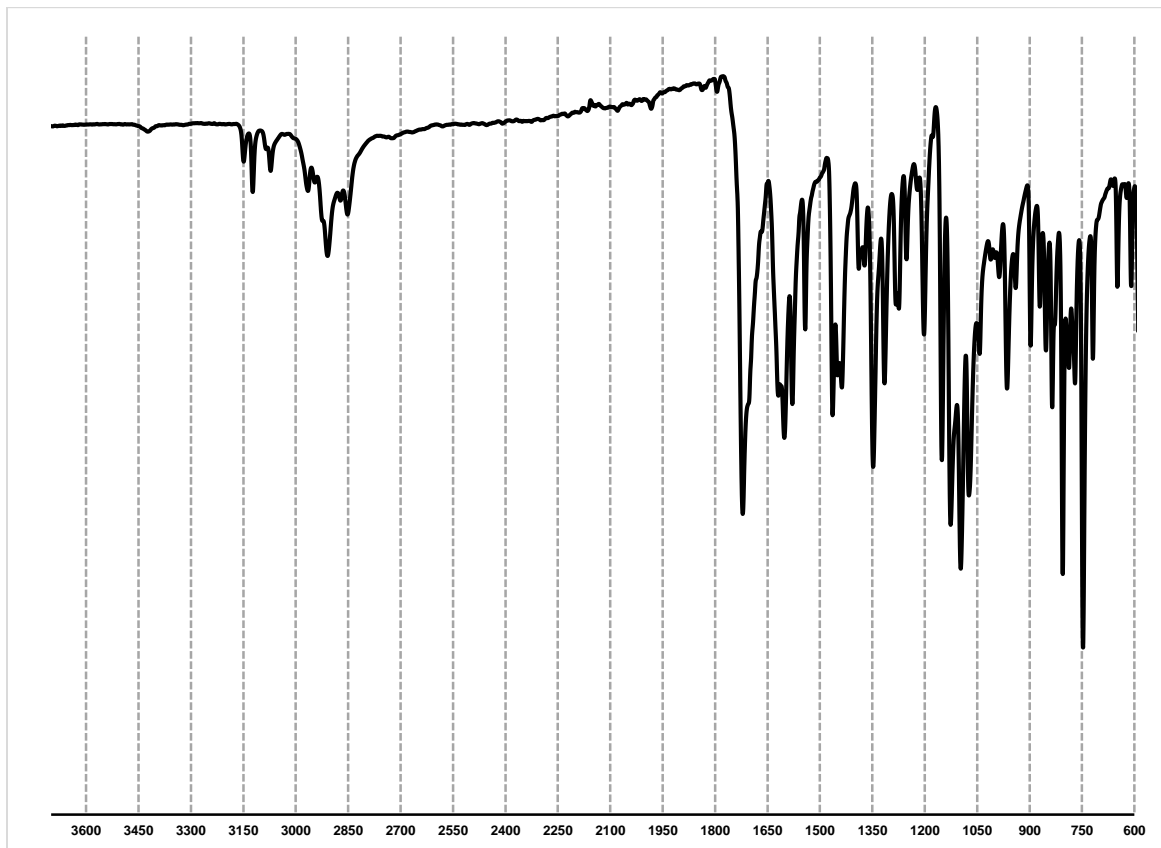


Espectro de RMN COSY en  $\text{CDCl}_3$  de 5-geranoxipsoraleno

Espectro de RMN HSQC en  $\text{CDCl}_3$  de 5-geranoxipsoraleno

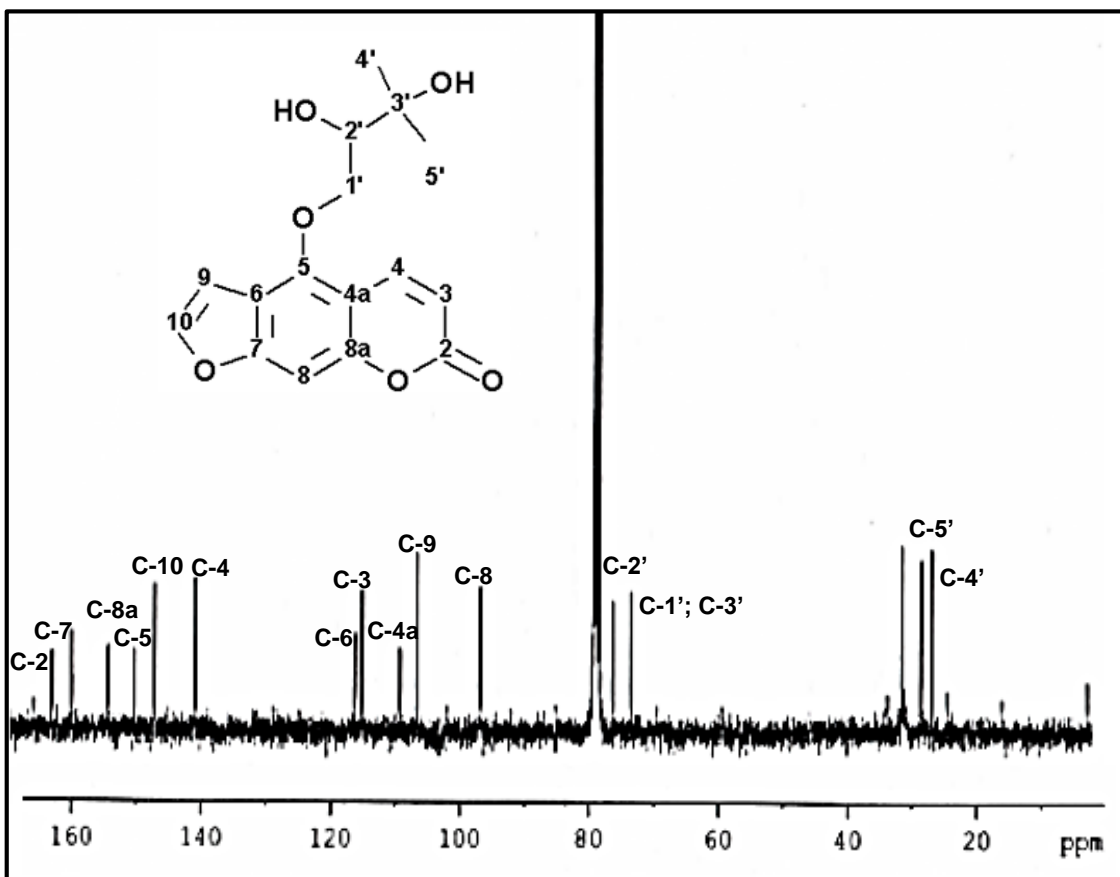
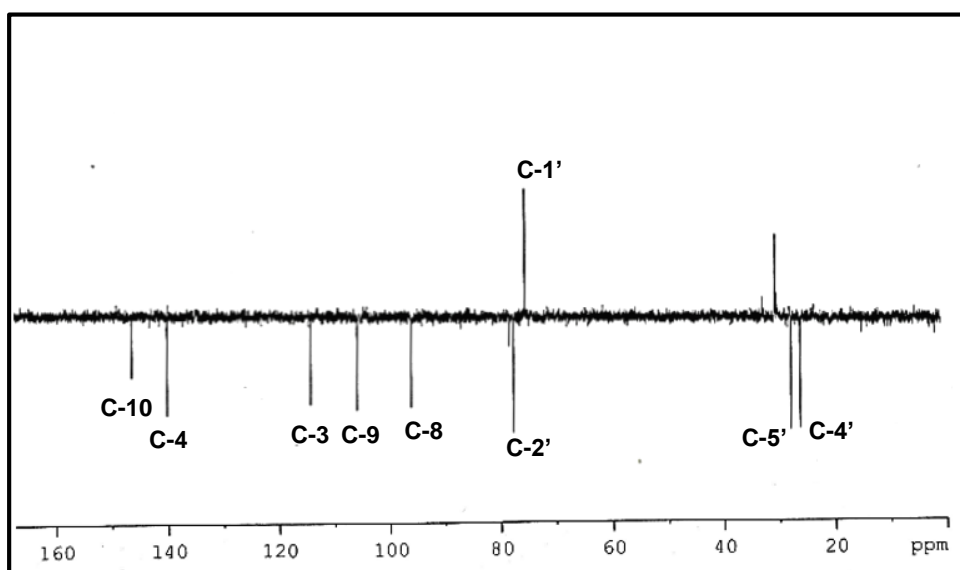
Espectro de RMN HMBC en  $\text{CDCl}_3$  de 5-geranoxipsoraleno

Espectro IR del 5-geranoxipsoraleno

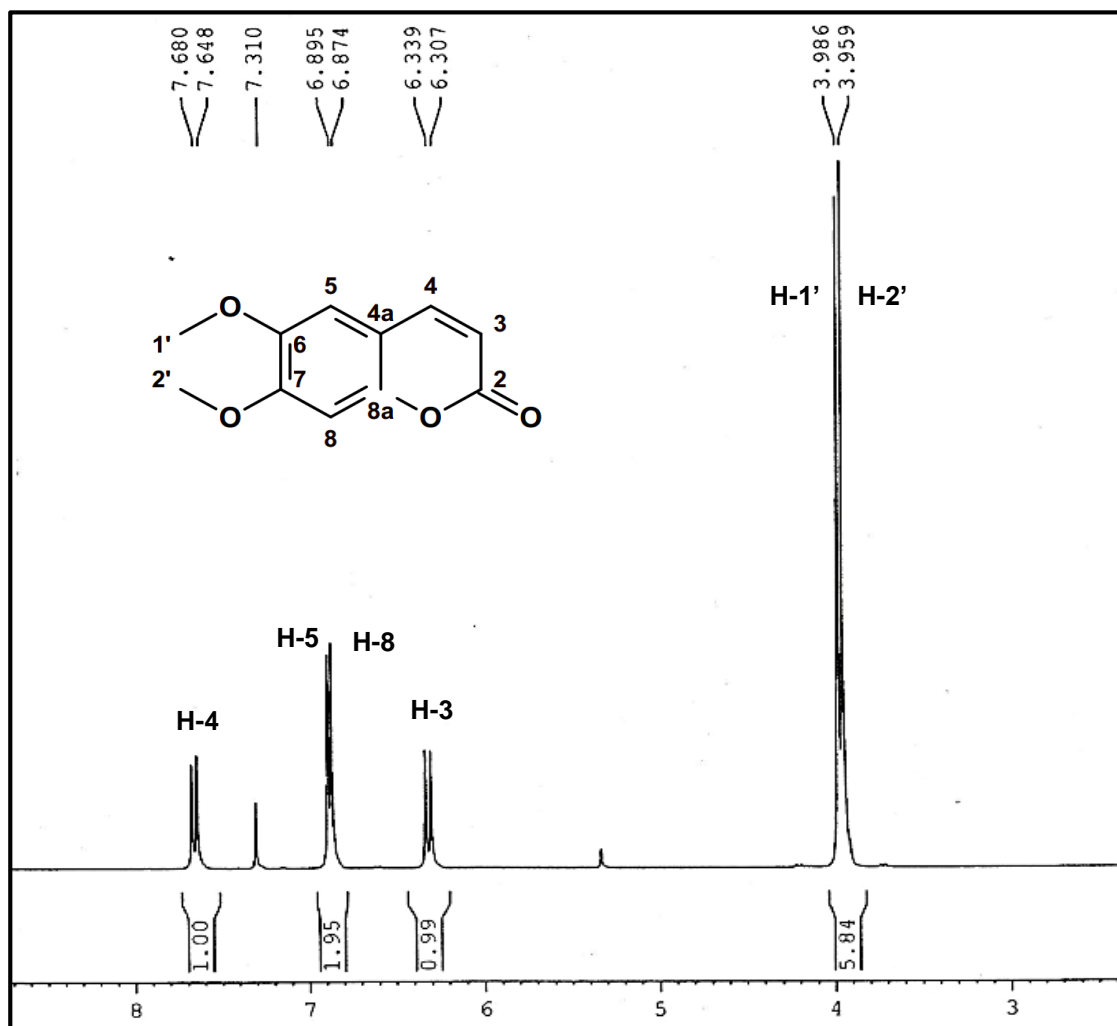


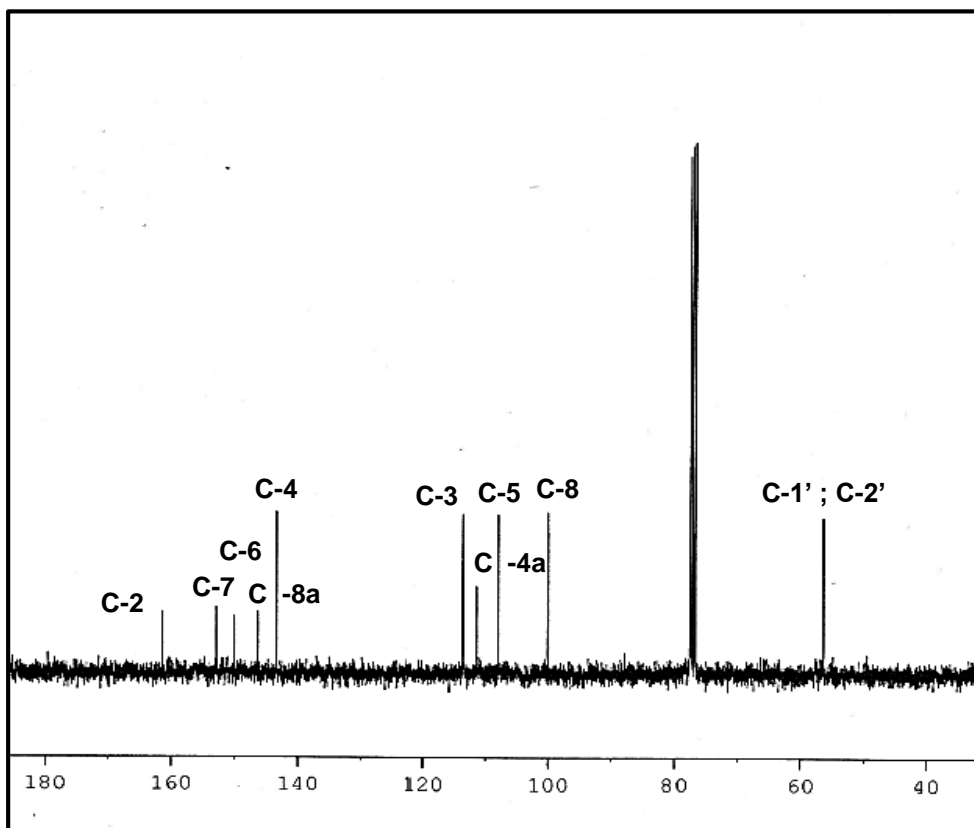
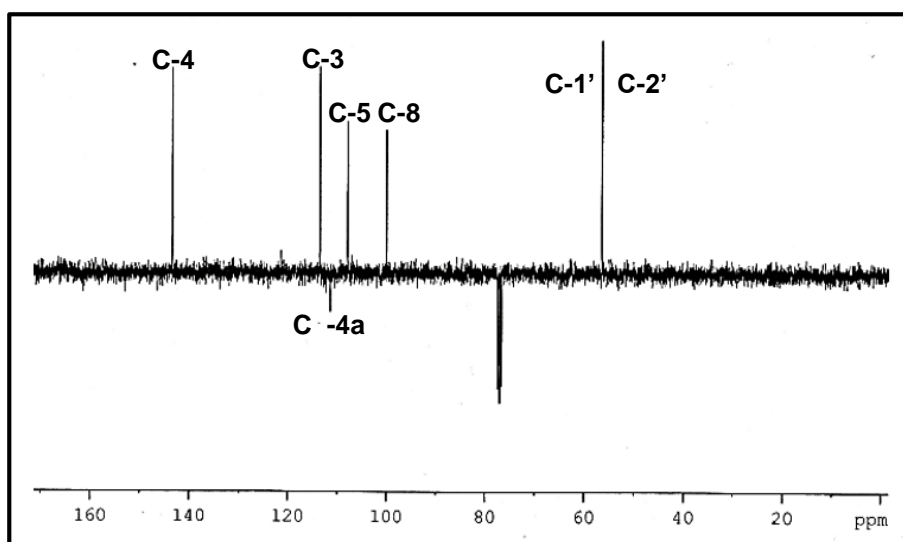
Espectro UV del 5-geranoxipsoraleno



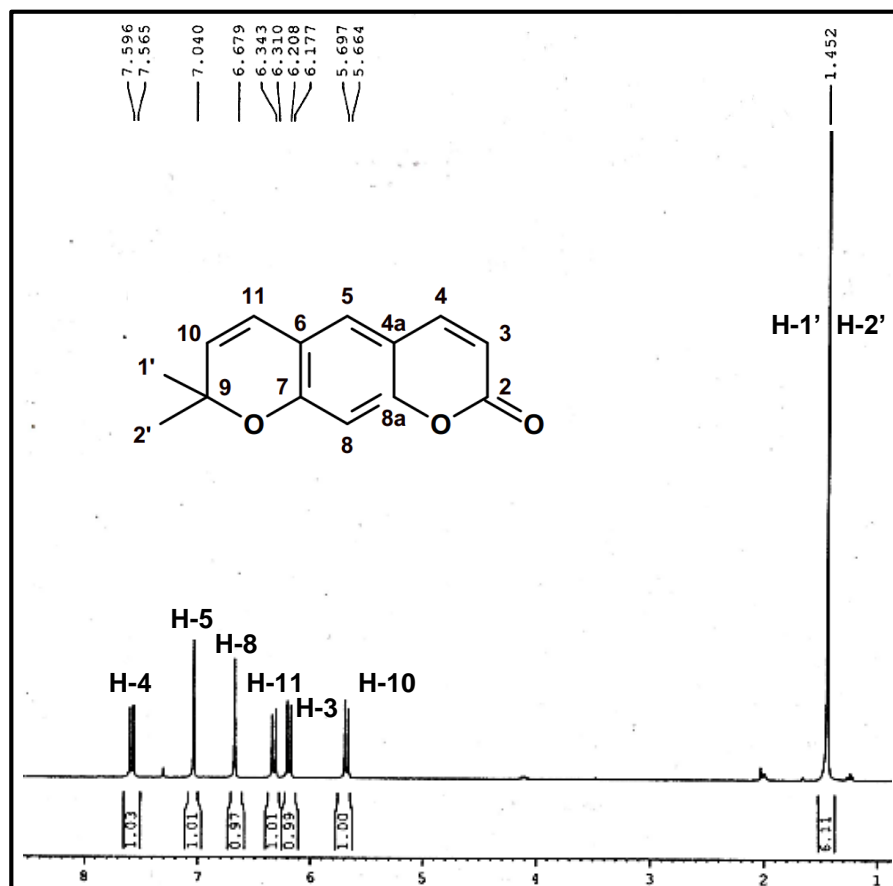
Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxi) psoralenoEspectro de J-mod RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxi) psoraleno

## Compuesto (VII): 6,7-dimetoxicumarina

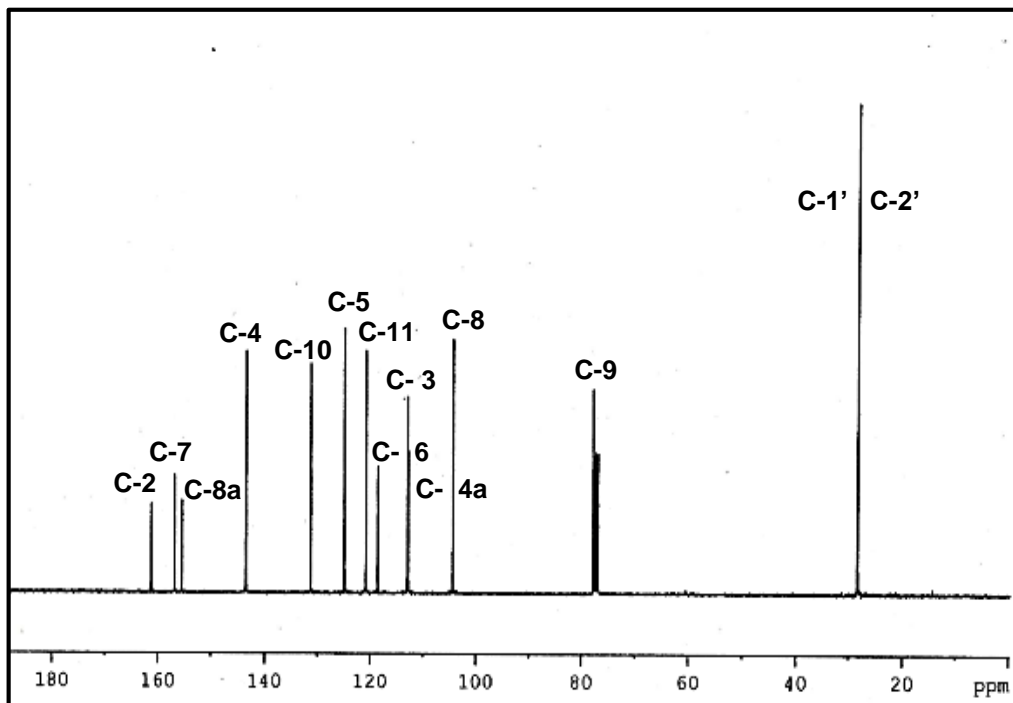
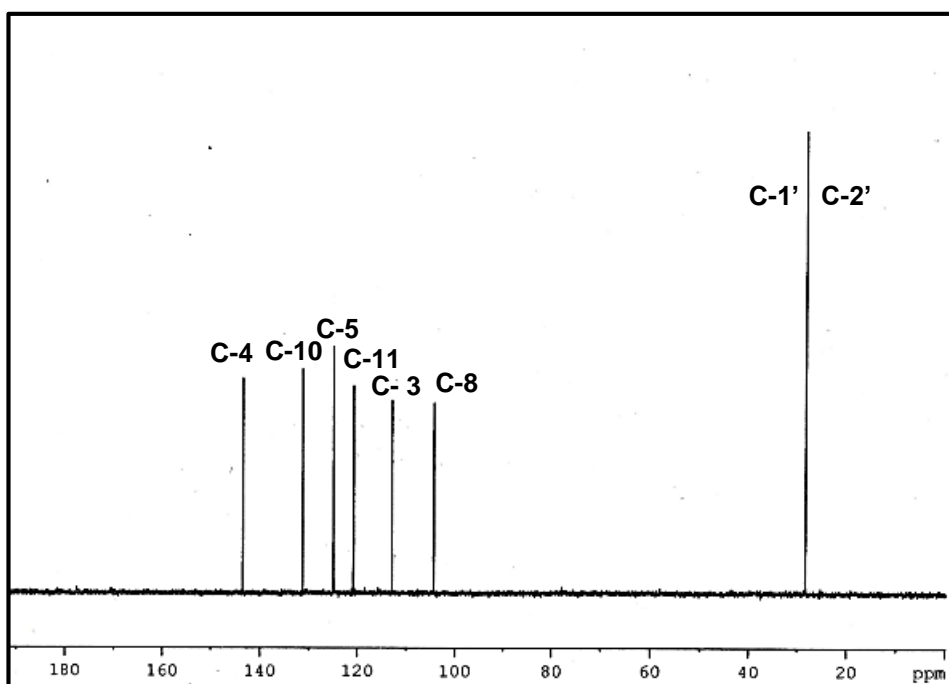
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 6,7 -dimetoxicumarina

Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 6,7 -dimetoxicumarinaEspectro de APT RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la 6,7 -dimetoxicumarina

Compuesto (X): Xantiletina.



Espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la Xantiletina.

Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  de la XantiletinaEspectro de RMN (DEPT 135) en  $\text{CDCl}_3$  de Xantiletina

## 6.Anexo B: Tablas de resultados

Cuantificación y análisis de varianza de los compuestos.

Compuesto (I)

Tratamiento	Días							
	0	2	4	6	8	10	13	16
<b>C1</b>	0,392	0,711	0,749	0,895	0,885	0,795	0,541	0,655
<b>T1</b>	0,392	0,649	0,552	0,430	0,502	0,678	0,694	0,669
<b>T2</b>	0,392	0,862	0,883	0,660	0,770	0,787	1,146	0,646
<b>T3</b>	0,392	0,717	0,590	0,699	0,732	0,863	0,795	0,938
<b>T4</b>	0,392	0,805	0,451	0,799	0,986	0,697	1,106	0,829
<b>T5</b>	0,392	0,702	0,480	0,489	0,660	0,686	1,089	0,914
<b>T6</b>	0,392	0,700	0,705	0,881	0,677	0,746	0,820	0,874

Cuantificación del compuesto (I): Media de cuatro réplicas de la concentración mg/g material vegetal.

Resumen	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<b>C1</b>	8	5,624	0,703	0,029
<b>T1</b>	8	4,565	0,571	0,014
<b>T2</b>	8	6,147	0,768	0,048
<b>T3</b>	8	5,726	0,716	0,028
<b>T4</b>	8	6,065	0,758	0,059
<b>T5</b>	8	5,412	0,676	0,055
<b>T6</b>	8	5,795	0,724	0,024
<b>Día 0</b>	7	2,744	0,392	0,000
<b>Día 2</b>	7	5,146	0,735	0,005
<b>Día 4</b>	7	4,411	0,630	0,024
<b>Día 6</b>	7	4,853	0,693	0,033
<b>Día 8</b>	7	5,211	0,744	0,025
<b>Día 10</b>	7	5,252	0,750	0,005
<b>Día 13</b>	7	6,190	0,884	0,054
<b>Día 16</b>	7	5,526	0,789	0,017

Análisis de varianza: cuantificación del compuesto (I)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	V. crítico para F
Tratamiento	0,209	6	0,035	1,901	2,324
Días	1,032	7	0,147	8,036	2,237
Error	0,771	42	0,018		
Total	2,013	55			

Compuesto (II)

Tratamiento	Días							
	1	2	4	6	8	10	13	16
<b>C1</b>	0,183	0,330	0,348	0,358	0,416	0,342	0,221	0,290
<b>T1</b>	0,183	0,308	0,248	0,199	0,216	0,307	0,277	0,304
<b>T2</b>	0,183	0,345	0,421	0,263	0,317	0,354	0,528	0,275
<b>T3</b>	0,183	0,368	0,305	0,344	0,316	0,417	0,398	0,458
<b>T4</b>	0,183	0,417	0,220	0,366	0,442	0,296	0,445	0,407
<b>T5</b>	0,183	0,302	0,224	0,265	0,312	0,361	0,411	0,428
<b>T6</b>	0,183	0,361	0,327	0,394	0,326	0,337	0,352	0,370

Cuantificación del compuesto (II): Media de cuatro réplicas de la concentración mg/g material vegetal.

Resumen	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<b>C1</b>	8	2,487	0,311	0,006
<b>T1</b>	8	2,042	0,255	0,003
<b>T2</b>	8	2,687	0,336	0,011
<b>T3</b>	8	2,791	0,349	0,007
<b>T4</b>	8	2,777	0,347	0,010
<b>T5</b>	8	2,487	0,311	0,007
<b>T6</b>	8	2,651	0,331	0,004
<b>Día 0</b>	7	1,283	0,183	0,000
<b>Día 2</b>	7	2,431	0,347	0,002
<b>Día 4</b>	7	2,094	0,299	0,005
<b>Día 6</b>	7	2,191	0,313	0,005
<b>Día 8</b>	7	2,344	0,335	0,006
<b>Día 10</b>	7	2,415	0,345	0,002
<b>Día 13</b>	7	2,632	0,376	0,011
<b>Día 16</b>	7	2,531	0,362	0,005

Análisis de varianza: cuantificación del compuesto (II)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	V. crítico para F
Tratamiento	0,050	6	0,008	2,202	2,324
Días	0,179	7	0,026	6,717	2,237
Error	0,160	42	0,004		
Total	0,390	55			

Compuesto (V)

Tratamiento	Días							
	1	2	4	6	8	10	13	16
<b>C1</b>	0,349	0,699	0,648	0,815	0,785	0,750	0,491	0,593
<b>T1</b>	0,349	0,770	0,605	0,442	0,567	0,710	0,732	0,740
<b>T2</b>	0,349	0,716	0,734	0,498	0,649	0,723	0,998	0,743
<b>T3</b>	0,349	0,856	0,660	0,720	0,887	0,816	0,899	0,973
<b>T4</b>	0,349	0,718	0,503	0,818	0,797	0,623	1,011	0,710
<b>T5</b>	0,349	0,688	0,590	0,639	0,792	0,813	1,003	0,918
<b>T6</b>	0,349	0,757	0,796	0,924	0,787	0,788	0,913	0,870

Cuantificación del compuesto (V): Media de cuatro réplicas de la concentración mg/g material vegetal.

Resumen	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<b>C1</b>	8	5,130	0,641	0,025
<b>T1</b>	8	4,915	0,614	0,024
<b>T2</b>	8	5,411	0,676	0,036
<b>T3</b>	8	6,160	0,770	0,039
<b>T4</b>	8	5,530	0,691	0,041
<b>T5</b>	8	5,792	0,724	0,042
<b>T6</b>	8	6,183	0,773	0,033
<b>Día 0</b>	7	2,444	0,349	0,000
<b>Día 2</b>	7	5,204	0,743	0,003
<b>Día 4</b>	7	4,536	0,648	0,009
<b>Día 6</b>	7	4,856	0,694	0,031
<b>Día 8</b>	7	5,264	0,752	0,011
<b>Día 10</b>	7	5,223	0,746	0,005
<b>Día 13</b>	7	6,047	0,864	0,037
<b>Día 16</b>	7	5,548	0,793	0,018

Análisis de varianza: cuantificación del compuesto (V)

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>V. crítico para F</b>
Tratamiento	0,177	6	0,030	2,439	2,324
Compuesto	1,176	7	0,168	13,849	2,237
Error	0,509	42	0,012		
Total	1,863	55			

Como hay diferencias entre tratamientos se realiza la comparación de medias.

Diferencia mínima significativa (LSD).

<b>Diferencia de medias</b>	<b>LSD Calculado</b>	<b>Valor crítico LSD</b>
<b>C1 - T3</b>	0.129	0.119
<b>C1 - T6</b>	0.132	0.119

El valor LSD fue determinado con un  $\alpha = 0.05$

## Compuesto (III y IV)

Tratamiento	Días							
	1	2	4	6	8	10	13	16
<b>C1</b>	0,117	0,198	0,196	0,224	0,242	0,236	0,167	0,187
<b>T1</b>	0,117	0,247	0,181	0,146	0,188	0,219	0,225	0,243
<b>T2</b>	0,117	0,231	0,227	0,170	0,203	0,239	0,333	0,224
<b>T3</b>	0,117	0,281	0,232	0,221	0,240	0,250	0,300	0,303
<b>T4</b>	0,117	0,261	0,189	0,226	0,249	0,207	0,276	0,237
<b>T5</b>	0,117	0,205	0,190	0,220	0,261	0,290	0,273	0,295
<b>T6</b>	0,117	0,244	0,244	0,274	0,234	0,249	0,266	0,261

Cuantificación del compuesto (III y IV): Media de cuatro réplicas de la concentración mg/g material vegetal.

Resumen	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<b>C1</b>	8	1,565	0,196	0,002
<b>T1</b>	8	1,566	0,196	0,002
<b>T2</b>	8	1,745	0,218	0,004
<b>T3</b>	8	1,943	0,243	0,004
<b>T4</b>	8	1,763	0,220	0,003
<b>T5</b>	8	1,850	0,231	0,004
<b>T6</b>	8	1,889	0,236	0,003
<b>Día 1</b>	7	0,817	0,117	0,000
<b>Día 2</b>	7	1,668	0,238	0,001
<b>Día 4</b>	7	1,459	0,208	0,001
<b>Día 6</b>	7	1,482	0,212	0,002
<b>Día 8</b>	7	1,617	0,231	0,001
<b>Día 10</b>	7	1,689	0,241	0,001
<b>Día 13</b>	7	1,840	0,263	0,003
<b>Día 16</b>	7	1,749	0,250	0,002

Análisis de varianza: cuantificación del compuesto (III y IV)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	V. crítico para F
Filas	0,017	6	0,003	3,074	2,324
Columnas	0,102	7	0,015	15,993	2,237
Error	0,038	42	0,001		
Total	0,157	55			

Como hay diferencias entre tratamientos se realiza la comparación de medias.

Diferencia mínima significativa (LSD).

<b>Diferencia de medias</b>	<b>LSD Calculado</b>	<b>Valor crítico LSD</b>
<b>C1 - T3</b>	0.047	0.032
<b>C1 - T5</b>	0.035	0.032
<b>C1 - T6</b>	0.040	0.032

El valor LSD fue determinado con un  $\alpha = 0.05$

Resultados de actividad antifúngica de los diferentes compuestos a diferentes concentraciones.

Delta del Crecimiento Radial acumulado						
Compuesto Tiempo (Horas)	Crecimiento (mm)					
	24	48	72	96	120	144
BK	8,0	19,7	32,3	45,3	59,0	75,7
BK-DMSO	8,3	18,3	31,3	42,7	57,7	72,7
I (0,25)	6,7	16,3	27,3	38,7	51,0	64,7
I (0,50)	7,7	17,3	29,3	40,3	52,0	66,3
I (1,0)	7,7	18,3	29,3	39,3	52,7	68,7
V (0,25)	7,7	17,3	28,7	41,3	54,3	68,7
V (0,50)	6,7	18,3	29,7	41,0	54,3	69,3
V (1,0)	6,7	18,3	28,0	42,7	54,3	72,3
II (0,25)	6,3	13,3	24,3	35,7	46,0	56,7
II (0,50)	7,3	14,3	26,3	38,0	48,7	62,3
II (1,0)	7,0	18,0	28,7	42,0	54,0	70,3
III (0,25)	6,7	15,3	26,7	37,3	49,3	60,7
III (0,50)	7,3	15,3	28,7	39,3	51,0	65,3
III (1,0)	8,0	17,7	29,7	41,7	52,7	69,0
IV (0,25)	6,3	14,7	25,7	36,7	48,0	58,3
IV (0,50)	7,0	16,0	27,7	38,3	49,7	63,3
IV (1,0)	7,0	16,7	28,0	40,3	52,0	69,7
VI (1,0)	7,7	13,0	29,7	43,3	55,0	66,7
XI (1,0)	0,7	8,3	16,3	26,7	36,7	45,0
VII (1,0)	7,7	16,7	27,3	39,3	50,7	62,3
XII (1,0)	0,3	6,3	13,7	24,3	34,7	44,0
X (1,0)	2,0	11,0	20,3	30,3	43,0	53,7
VIII (1,0)	2,7	10,7	19,7	29,7	42,7	53,3
IX (1,0)	4,3	11,7	21,0	31,7	44,3	55,3
T1 (0,05)	1,0	3,7	3,7	2,0	2,7	3,7

Evaluación de la actividad antifúngica: Media de tres réplicas del diámetro de la colonia mm. Entre paréntesis, las diferentes concentraciones (mM).

## Análisis de varianza de la actividad antifúngica

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<b>BK</b>	6	240,0	40,0	631,6
<b>Siv</b>	6	231,0	38,5	584,0
<b>I (0,25)</b>	6	204,7	34,1	471,0
<b>I (0,50)</b>	6	213,0	35,5	477,8
<b>I (1,0)</b>	6	216,0	36,0	503,1
<b>V (0,25)</b>	6	218,0	36,3	527,2
<b>V (0,50)</b>	6	219,3	36,6	536,6
<b>V (1,0)</b>	6	222,3	37,1	586,1
<b>II (0,25)</b>	6	182,3	30,4	373,7
<b>II (0,50)</b>	6	197,0	32,8	436,5
<b>II (1,0)</b>	6	220,0	36,7	551,0
<b>III (0,25)</b>	6	196,0	32,7	419,2
<b>III (0,50)</b>	6	207,0	34,5	477,1
<b>III (1,0)</b>	6	218,7	36,4	511,6
<b>IV (0,25)</b>	6	189,7	31,6	393,9
<b>IV (0,50)</b>	6	202,0	33,7	443,4
<b>IV (1,0)</b>	6	213,7	35,6	537,2
<b>VI (1,0)</b>	6	215,3	35,9	545,4
<b>XI (1,0)</b>	6	133,7	22,3	287,9
<b>VII (1,0)</b>	6	204,0	34,0	429,5
<b>XII (1,0)</b>	6	123,3	20,6	284,3
<b>X (1,0)</b>	6	160,3	26,7	380,6
<b>VIII (1,0)</b>	6	158,7	26,4	371,4
<b>IX (1,0)</b>	6	168,3	28,1	380,6
<b>24 horas</b>	24	147,7	6,2	5,5
<b>48 horas</b>	24	363,0	15,1	11,9
<b>72 horas</b>	24	629,7	26,2	22,2
<b>96 horas</b>	24	906,0	37,8	29,6
<b>120 horas</b>	24	1193,7	49,7	36,1
<b>144 horas</b>	24	1514,3	63,1	69,8

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	V. crítico para F
<b>Compuestos</b>	3393,87	23,00	147,56	26,74	1,62
<b>Horas</b>	55068,97	5,00	11013,79	1995,97	2,29
<b>Error</b>	634,57	115,00	5,52		
<b>Total</b>	59097,41	143,00			

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizaron comparaciones de múltiples rangos por el método de Diferencia Mínima Significativa (LSD). El valor LSD, con un  $\alpha = 0.05$ , fue de 2.94.

Curvas de Calibrado de los diferentes compuestos cuantificados.

Curva de Calibrado 5-Geranyloxy-7-methoxycoumarin

Concentración (ppm)	Área			
0,4	36699			
1,1	86543			
3,2	302537			
4,6	427076			
9,3	812002			
<b>Coefficiente de determinación</b>		0.997		
Parámetro	Estimación	Erro estándar	Estadístico	V. crítico para t
<b>Pendiente</b>	87889,0	2335,7	37,62	3,18

El área de los estándares se muestra como la media de tres réplicas.

Curva de Calibrado 5-Geranoxypsoralen

Concentración (ppm)	Área			
1,6	307066			
2,4	449154			
4	792108			
7,0	1460492			
10,2	2080395			
<b>Coefficiente de determinación</b>		0.999		
Parámetro	Estimación	Erro estándar	Estadístico	V. crítico para t
<b>Pendiente</b>	207993	3145,6	66,12	3,18

El área de los estándares se muestra como la media de tres réplicas.

## Curva de Calibrado 5,7-Dimethoxycoumarin

Concentración (ppm)	Área			
1,0	168988,3			
2,1	307741,7			
3,1	439285,3			
5,1	735424,3			
10,2	1520417,7			
<b>Coefficiente de determinación</b>		0.998		
<b>Parámetro</b>				
	<b>Estimación</b>	<b>Erro estándar</b>	<b>Estadístico</b>	<b>V. crítico para t</b>
<b>Pendiente</b>	148321,6	2956,61	50,16	3,18

El área de los estándares se muestra como la media de tres réplicas.

## Curva de Calibrado 5, 8-dimethoxypsoralen + 5-Methoxypsoralen

Concentración (ppm)	Área			
0,5	176007,7			
1,0	352716,0			
1,4	530498,7			
2,8	1039648,7			
5,9	2403369,3			
<b>Coefficiente de determinación</b>		0.997		
<b>Parámetro</b>				
	<b>Estimación</b>	<b>Erro estándar</b>	<b>Estadístico</b>	<b>V. crítico para t</b>
<b>Pendiente</b>	414826,8	12914,4	32,12	3,18

El área de los estándares se muestra como la media de tres réplicas.





## Bibliografía

- [1] Organización de las Unidas para la Alimentación y la Agricultura -FAO, "FAOSTAT-Statistics Database." [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. [Accessed: 13-Jun-2018].
- [2] Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), "Tercer Censo Nacional Agropecuario - Novena entrega de resultados," 2014. [Online]. Available: <https://www.dane.gov.co/files/CensoAgropecuario/entrega-definitiva/Boletin-9-cultivos/9-Boletin.pdf>. [Accessed: 14-Jun-2018].
- [3] Aguilar Niño Pedro, Escobar Quijano Manuel José, and Pássaro Carvalho Catarina Pedro, "Situación actual de la cadena de cítricos en Colombia: limitantes y perspectivas," in *Cítricos cultivo, poscosecha e industrialización*, Luis Fernando Garcés Giraldo and Catarina Pedro Pássaro Carvalho, Eds. Caldas (Colombia): Corporación Universitaria Lasallista, 2012, pp. 9–47.
- [4] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, "Agronet - Estadísticas." [Online]. Available: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>. [Accessed: 13-Jun-2018].
- [5] I. Bernabò, A. Guardia, R. Macirella, S. Sesti, A. Crescente, and E. Brunelli, "Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 172, pp. 56–66, Mar. 2016.
- [6] S. Weichenthal, C. Moase, and P. Chan, "A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort.," *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 8, pp. 1117–25, Aug. 2010.
- [7] D. W. Hollomon, "Do we have the tools to manage resistance in the future?," *Pest Manag. Sci.*, vol. 68, no. 2, pp. 149–154, Feb. 2012.
- [8] F. E. Dayan, J. G. Romagni, and S. O. Duke, "Investigating the mode of action of natural phytotoxins," *J. Chem. Ecol.*, vol. 26, no. 9, pp. 2079–2094, 2000.
- [9] A. C. Matheyambath, P. Padmanabhan, and G. Paliyath, "Citrus Fruits," in *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, pp. 136–140.
- [10] R. R. Krueger and L. Navarro, "Citrus germplasm resources.," in *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, I. A. Khan, Ed. Wallingford: CABI, 2007, pp. 45–140.
- [11] E. Nicolosi, "Origin and taxonomy.," in *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, Iqar Ahmad Khan, Ed. Wallingford: CABI, 2007, pp. 19–43.

- [12] M. S. Ladaniya, "Commercial fresh citrus cultivars and producing countries," in *Citrus Fruit*, 1st ed., Elsevier, 2008, pp. 13–65.
- [13] G. A. Moore, "Oranges And Lemons: Clues To The Taxonomy Of Citrus From Molecular Markers," *Trends Genet.*, vol. 17, no. 9, pp. 536–540, Sep. 2001.
- [14] J. H. Crane, J. L. Osborne, and S. E. Malo, "Growing 'Tahiti' Limes in the Home Landscape," *Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida*, 01-Jul-2013. [Online]. Available: <http://edis.ifas.ufl.edu/ch093>. [Accessed: 21-May-2016].
- [15] F. Curk, F. Ollitrault, A. Garcia-Lor, F. Luro, L. Navarro, and P. Ollitrault, "Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers.," *Ann. Bot.*, vol. 117, no. 4, pp. 565–83, Apr. 2016.
- [16] H. R. de M. Barros, T. A. P. de C. Ferreira, and M. I. Genovese, "Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil," *Food Chem.*, vol. 134, no. 4, pp. 1892–1898, Oct. 2012.
- [17] S. Rafiq, R. Kaul, S. A. Sofi, N. Bashir, F. Nazir, and G. Ahmad Nayik, "Citrus peel as a source of functional ingredient: A review," *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, Aug. 2016.
- [18] R. E. Berry, "Limes," in *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2nd ed., B. Caballero, P. Finglas, and F. Toldra, Eds. Academic Press, 2003, pp. 1368–1371.
- [19] United States Department of Agriculture (USDA) - Foreign Agricultural Service, "Citrus: World Markets and Trade." [Online]. Available: <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. [Accessed: 13-Jun-2018].
- [20] Sistema de Información de Precios - DANE, "Cultivo del limón o lima Tahití frente a los efectos de las condiciones climáticas adversas," *Boletín Mensual Insumos y Factores Asociados a La Producción Agropecuaria - Noviembre*. Bogota, 2015.
- [21] UTEPI and Unidad Técnica de Estudios para la Industria, "Lima y Limón. Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la Cadena de Valor y Perspectivas de Mercado." Programa Integrado entre el Ministerio de Industrias y Competitividad y la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial, Quito – Ecuador., 2006.
- [22] M. J. Escobar, "Los Cítricos frente a los tratados de libre Comercio," *Frutas y Hortalizas Revista De La Asociación Hortofrutícola de Colombia, ASOHOFRUCOL*, Bogotá, pp. 8–11, 2012.
- [23] M. Ismail and J. Zhang, "Post-harvest citrus diseases and their control," *Outlooks Pest Manag.*, vol. 15, no. 1, pp. 29–35, Feb. 2004.
- [24] B. L. Castro Caicedo, L. W. Timmer, J. E. Leguizamón Caycedo, G. W. Müller, and J. A. Corrales Giraldo, "Enfermedades de los Cítricos en Colombia," *Fondo Nac. Fom. Hortifrutícola*, pp. 13–97, 2000.

- [25] P. Tripathi and N. . Dubey, "Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 32, no. 3, pp. 235–245, Jun. 2004.
- [26] G. Reboledo, R. del Campo, A. Alvarez, M. Montesano, H. Mara, and I. Ponce de León, "*Physcomitrella patens* Activates Defense Responses against the Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 9, pp. 22280–22298, Sep. 2015.
- [27] Holmes Gerald, "Blue mold (*Penicillium italicum*) on lemon (*Citrus x limon*) - 1578579." California, United States , 2010.
- [28] Holmes Gerald, "Gray mold (*Botrytis cinerea*) on lemon (*Citrus x limon*) - 1570468." California, United States, 2009.
- [29] Florida Division of Plant Industry, "Sour orange scab (*Elsinoe fawcettii*) on orange (*Citrus x sinensis*) - 5268037." United States, 2007.
- [30] S. Freeman, T. Katan, and E. Shabi, "Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits," *Plant Dis.*, vol. 82, no. 6, pp. 596–605, Jun. 1998.
- [31] R. P. O'Quinn, J. L. Hoffmann, and A. S. Boyd, "*Colletotrichum* species as emerging opportunistic fungal pathogens: A report of 3 cases of phaeohyphomycosis and review," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 45, no. 1, pp. 56–61, Jul. 2001.
- [32] Alarcón Restrepo John Jairo, Arévalo Peñaranda Emilio, Díaz Jimenez Ana Luisa, Galindo Álvarez José Roberto, and Rivero Cruz María Rosmira, "Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos - Medidas para la temporada invernal," *Instituto Colombiano Agropecuario - ICA*, 2012. [Online]. Available: <https://www.ica.gov.co/Publicaciones.aspx?page=2>. [Accessed: 15-Jun-2018].
- [33] Pássaro Carvalho Catarina, Nunes Carla, and Palou Lluís, "Control de enfermedades de poscosecha," in *Cítricos cultivo, poscosecha e industrialización*, Luis Fernando Garcés and Catarina Pedro Pássaro Carvalho, Eds. Caldas (Colombia): Corporación Universitaria Lasallista, 2012, pp. 285–305.
- [34] A. Caicedo Arana, H. Carmen Carrillo, and J. Jaramillo Vásquez, "Patrones para la producción de cítricos en Colombia.," *CORPOICA - Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*. p. 31, 2006.
- [35] Caicedo Arana Álvaro and Gómez B. Carlos Octavio, "Portainjertos para la producción de cítricos en colombia," *CORPOICA - Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 2006. [Online]. Available: [http://bdigitalagropecuaria.corpoica.org.co/R/C8VQP7DDHRDANTLRP58BN8GP12RT8DG1LG823G7TRRJ2MXX1D6-00833?func=results-jump-full&set\\_entry=000042&set\\_number=000747&base=GEN03](http://bdigitalagropecuaria.corpoica.org.co/R/C8VQP7DDHRDANTLRP58BN8GP12RT8DG1LG823G7TRRJ2MXX1D6-00833?func=results-jump-full&set_entry=000042&set_number=000747&base=GEN03). [Accessed: 15-Jun-2018].
- [36] K. Härkönen, "Pesticides and the induction of aneuploidy in human sperm.,"

- Cytogenet. Genome Res.*, vol. 111, no. 3–4, pp. 378–83, 2005.
- [37] J. Zhou, K. Xiong, Y. Yang, X. Ye, J. Liu, and F. Li, “Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells,” *Reprod. Toxicol.*, vol. 51, pp. 64–71, Jan. 2015.
- [38] L. E. Gray, J. Ostby, R. Linder, J. Goldman, G. Rehnberg, and R. Cooper, “Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster,” *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 15, no. 2, pp. 281–297, Aug. 1990.
- [39] R. Paro *et al.*, “The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 260, no. 2, pp. 155–161, Apr. 2012.
- [40] P. Koch, “Occupational allergic contact dermatitis and airborne contact dermatitis from 5 fungicides in a vineyard worker. Cross-reactions between fungicides of the dithiocarbamate group? \*,” *Contact Dermatitis*, vol. 34, no. 5, pp. 324–329, May 1996.
- [41] R. Montes-Belmont, “Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos,” *Rev. Mex. Micol.*, vol. 29, pp. 73–82, 2009.
- [42] M.-A. Newman, T. Sundelin, J. T. Nielsen, and G. Erbs, “MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants,” *Front. Plant Sci.*, vol. 4, no. May, pp. 1–15, 2013.
- [43] S. Abera Gebrie, “Biotrophic Fungi Infection and Plant Defense Mechanism,” *J. Plant Pathol. Microbiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 1–6, Sep. 2016.
- [44] X. Wang, N. Jiang, J. Liu, W. Liu, and G.-L. Wang, “The role of effectors and host immunity in plant–necrotrophic fungal interactions,” *Virulence*, vol. 5, no. 7, pp. 722–732, Oct. 2014.
- [45] Freeman Brian C. and Beattie Gwyn A., “An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores,” *Plant Heal. Instr.*, 2008.
- [46] K. Mendgen, M. Hahn, and H. Deising, “Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi,” *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 34, no. 1, pp. 367–386, Sep. 1996.
- [47] G. De Lorenzo and S. Ferrari, “Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 295–299, Aug. 2002.
- [48] U. Wittstock and J. Gershenzon, “Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 300–307, Aug. 2002.
- [49] W. Underwood, “The plant cell wall: A dynamic barrier against pathogen invasion,” *Front. Plant Sci.*, vol. 3, p. 85, 2012.

- [50] E. Luna, V. Pastor, J. Robert, V. Flors, B. Mauch-Mani, and J. Ton, "Callose deposition: A multifaceted plant defense response.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 24, no. 2, pp. 183–93, Feb. 2011.
- [51] K. Dadakova *et al.*, "Proteome and transcript analysis of *Vitis vinifera* cell cultures subjected to *Botrytis cinerea* infection," *J. Proteomics*, vol. 119, pp. 143–153, Apr. 2015.
- [52] R. B. Ferreira *et al.*, "Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection," *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 25, no. 6, pp. 505–524, Dec. 2006.
- [53] G. J. M. Beckers and S. H. Spoel, "Fine-Tuning plant defence signalling: salicylate versus Jasmonate," *Plant Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2006.
- [54] K. Jamwal, S. Bhattacharya, and S. Puri, "Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants," *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, vol. 9, pp. 26–38, May 2018.
- [55] H. D. VanEtten, J. W. Mansfield, J. A. Bailey, and E. E. Farmer, "Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus 'Phytoanticipins,'" *Plant Cell*, vol. 6, no. 9, pp. 1191–1192, Sep. 1994.
- [56] A. Piasecka, N. Jedrzejczak-Rey, and P. Bednarek, "Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals," *New Phytol.*, vol. 206, no. 3, pp. 948–964, May 2015.
- [57] J. P. Morrissey and A. E. Osbourn, "Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 63, no. 3, pp. 708–24, Sep. 1999.
- [58] D. Prusky and N. T. Keen, "Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay," *Plant Dis.*, vol. 77, no. 2, p. 114, 1993.
- [59] T. S. Yam, J. M. Hamilton-Miller, and S. Shah, "The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 42, no. 2, pp. 211–6, Aug. 1998.
- [60] M. Hirasawa and K. Takada, "Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 53, no. 2, pp. 225–229, Jan. 2004.
- [61] Y. Cohen, H. Eyal, Z. Goldschmidt, and B. Sklarz, "A preformed chemical inhibitor of tobacco powdery mildew on leaves of *Nicotiana glutinosa*," *Physiol. Plant Pathol.*, vol. 22, no. 2, pp. 143–IN2, Mar. 1983.
- [62] M. Reuveni, S. Tuzun, J. S. Cole, M. R. Siegel, W. C. Nesmith, and J. Kuć, "Removal of divatrienediols from the surface of tobacco leaves increases their susceptibility to blue mold," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 30, no. 3, pp. 441–451, May 1987.

- [63] R. J. Grayer and J. B. Harborne, "A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993," *Phytochemistry*, vol. 37, no. 1, pp. 19–42, Jan. 1994.
- [64] D. C. Baldoqui, M. J. Kato, A. J. Cavalheiro, V. da S. Bolzani, M. C. M. Young, and M. Furlan, "A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*," *Phytochemistry*, vol. 51, no. 7, pp. 899–902, Aug. 1999.
- [65] A. L. Okunade, C. D. Hufford, A. M. Clark, and D. Lentz, "Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum*," *Phyther. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 142–144, Mar. 1997.
- [66] S. Ben-Yehoshua, V. Rodov, J. J. Kim, and S. Carmeli, "Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 40, no. 7, pp. 1217–1221, Jul. 1992.
- [67] A. Ortuño, L. Díaz, N. Alvarez, I. Porras, A. García-Lidón, and J. A. Del Río, "Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different citrus species and their susceptibility to *Penicillium digitatum*," *Food Chem.*, vol. 125, no. 1, pp. 232–239, Mar. 2011.
- [68] S. W. Jeong *et al.*, "Variation in flavonoid levels in *Citrus benikoji* Hort. ex. Tan. infected by *Colletotrichum gloeosporioides*," *Food Chem.*, vol. 148, pp. 284–288, 2014.
- [69] J. W. Mansfield, "Antimicrobial compounds and resistance," in *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, A. J. Slusarenko and R. S. Fraser, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000, pp. 325–370.
- [70] A. E. Osbourn, "Saponins in cereals," *Phytochemistry*, vol. 62, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2003.
- [71] M. Friedman and C. E. Levin, "Alpha-Tomatine content in Tomato and tomato products determined by HPLC with pulsed amperometric detection," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 43, no. 6, pp. 1507–1511, Jun. 1995.
- [72] E. A. Keukens *et al.*, "Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1240, no. 2, pp. 216–28, Dec. 1995.
- [73] V. Simons *et al.*, "Dual Effects of Plant Steroidal Alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 8, pp. 2732–2740, Aug. 2006.
- [74] I. F. Bolarinwa, M. O. Oke, S. A. Olaniyan, and A. S. Ajala, "A review of cyanogenic glycosides in edible plants," in *Toxicology - New aspects to this scientific conundrum*, Larramendy Marcelo L., Ed. InTech, 2016, pp. 179–192.
- [75] A. E. Osbourn, "Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack," *Plant Cell*, vol. 8, no. 10, pp. 1821–1831, Oct. 1996.
- [76] B. A. Halkier and J. Gershenzon, "Biology and biochemistry of glucosinolates,"

- Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 57, no. 1, pp. 303–333, Jun. 2006.
- [77] M. Iriti and F. Faoro, “Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 8, pp. 3371–99, Oct. 2009.
- [78] R. Mithen, “Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape,” *Euphytica*, vol. 63, no. 1–2, pp. 71–83, 1992.
- [79] J. Borlinghaus, F. Albrecht, M. Gruhlke, I. Nwachukwu, and A. Slusarenko, “Allicin: Chemistry and biological properties,” *Molecules*, vol. 19, no. 8, pp. 12591–12618, Aug. 2014.
- [80] S. Ankri and D. Mirelman, “Antimicrobial properties of allicin from garlic.,” *Microbes Infect.*, vol. 1, no. 2, pp. 125–9, Feb. 1999.
- [81] J. Kuc, “Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants,” *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 33, no. 1, pp. 275–297, Sep. 1995.
- [82] T. Kuniga and R. Matsumoto, “Comparative study of scoparone accumulation in various citrus species after inoculation with Gray Mold,” *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.*, vol. 75, no. 5, pp. 379–384, Sep. 2006.
- [83] U. Afek and A. Szejnberg, “Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*.,” *Phytopathology*, vol. 78, no. 12, II, pp. 1678–1682, 1988.
- [84] E. E. Rogers, J. Glazebrook, and F. M. Ausubel, “Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in Arabidopsis-pathogen interactions.,” *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 9, no. 8, pp. 748–57, Nov. 1996.
- [85] V. Pont and R. Pezet, “Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*.,” *J. Phytopathol.*, vol. 130, no. 1, pp. 1–8, Sep. 1990.
- [86] D. I. Guest, “Phytoalexins, natural plant protection,” in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd ed., B. Thomas, D. J. Murphy, and B. G. Murray, Eds. Academic Press, 2017, pp. 124–128.
- [87] I. Ahuja, R. Kissen, and A. M. Bones, “Phytoalexins in defense against pathogens.,” Feb. 2012.
- [88] S. J. Jadhav, G. Mazza, and D. K. Salunkhe, “Terpenoid phytoalexins in potatoes: A review,” *Food Chem.*, vol. 41, no. 2, pp. 195–217, Jan. 1991.
- [89] Vernenghi Annie, Ramiandrasoa Florence, Chuilon Sylvaine, and Ravisé André., “Citrus phytoalexins: seselin biological activity and in vivo synthesis stimulation,” *Fruits (France)*, vol. 42, no. 2, pp. 103–111, 1987.
- [90] Khan A.J., Kunesch G., Chuilon S., and A. Ravise, “Structure and biological activity of Xanthyletin, a new phytoalexin of citrus,” *Fruits (France)*, vol. 40, no. 12, pp.

- 807–811, 1985.
- [91] V. Rodov, S. Ben-Yehoshua, D. Fang, G. D'hallewin, and T. Castia, "Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments," in *ISHS. Acta Horticulturae*, 1994, no. 381, pp. 517–525.
- [92] U. Afek, J. Orenstein, S. Carmeli, V. Rodov, and M. B. Joseph, "Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*," *Phytochemistry*, vol. 50, no. 7, pp. 1129–1132, 1999.
- [93] M. G. Hahn, "Microbial elicitors and their receptors in plants," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 34, no. 1, pp. 387–412, Sep. 1996.
- [94] J. Eder and E. G. Cosio, "Elicitors of plant defense responses," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 148, pp. 1–36, Jan. 1994.
- [95] C. Y. Chen and M. C. Heath, "Features of the rapid cell death induced in cowpea by the monokaryon of the cowpea rust fungus or the monokaryon-derived cultivar-specific elicitor of necrosis," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 44, no. 3, pp. 157–170, Mar. 1994.
- [96] M. D. Brownleader, P. E. McNally, G. E. A. Davies, M. Trevan, and P. M. Dey, "Elicitor-induced extensin insolubilization in suspension-cultured tomato cells," *Phytochemistry*, vol. 46, no. 1, pp. 1–9, Sep. 1997.
- [97] C. P. Woloshuk, J. S. Meulenhoff, M. Sela-Buurlage, P. J. van den Elzen, and B. J. Cornelissen, "Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*," *Plant Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 619–28, Jun. 1991.
- [98] T. Boller, "Chemoperception of microbial signals in plant cells," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 46, no. 1, pp. 189–214, Jun. 1995.
- [99] J. J. Cheong and M. G. Hahn, "A specific, high-affinity binding site for the hepta-beta-glucoside elicitor exists in soybean membranes," *Plant Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 137–47, Feb. 1991.
- [100] K. Toyoda, N. Shirashi, H. Yoshioka, T. Yamada, Y. Ichinose, and H. Oku, "Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*," *Plant Cell Physiol.*, vol. 33, no. 4, pp. 445–452, Jun. 1992.
- [101] M. Yoshikawa, N. Yamaoka, and Y. Takeuchi, "Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions," *Plant Cell Physiol.*, vol. 34, no. 8, pp. 1163–1173, Dec. 1993.
- [102] M. Thakur and B. S. Sohal, "Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review," *ISRN Biochem.*, vol. 2013, p. 762412, 2013.
- [103] Z. Angelova, S. Georgiev, and W. Roos, "Elicitation of plants," *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 20, no. 2, pp. 72–83, Jan. 2006.

- [104] P. M. Naik and J. M. Al-Khayri, "Abiotic and biotic elicitors—Role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants," in *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, S. Arun and S. Chitra, Eds. InTech, 2016, pp. 247–278.
- [105] T. Waldmuller, E. Cosio, H. Grisebach, and J. Ebel, "Release of highly elicitor-active glucans by germinating zoospores of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*," *Planta*, vol. 188, no. 4, pp. 498–505, Nov. 1992.
- [106] M. Yoshikawa, Y. Takeuchi, and O. Horino, "A mechanism for ethylene-induced disease resistance in soybean: enhanced synthesis of an elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 37, no. 5, pp. 367–376, Nov. 1990.
- [107] E. E. Farmer, R. R. Johnson, and C. A. Ryan, "Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic Acid.," *Plant Physiol.*, vol. 98, no. 3, pp. 995–1002, Mar. 1992.
- [108] F. Cervone, M. G. Hahn, G. De Lorenzo, A. Darvill, and P. Albersheim, "A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses.," *Plant Physiol.*, vol. 90, no. 2, pp. 542–8, Jun. 1989.
- [109] G. Pearce, D. Strydom, S. Johnson, and C. A. Ryan, "A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins.," *Science*, vol. 253, no. 5022, pp. 895–7, Aug. 1991.
- [110] † Mourad Daoubi *et al.*, "Antifungal activity and biotransformation of Diisophorone by *Botrytis cinerea*," 2005.
- [111] S. Sardari and S. Nishibe, "Coumarins, the bioactive structures with antifungal property," *Stud. Nat. Prod. Chem.*, vol. 23, pp. 335–393, 2000.
- [112] R. H. Abu-Eittah and B. A. H. El-Tawil, "The electronic absorption spectra of some coumarins. A molecular orbital treatment," *Can. J. Chem.*, vol. 63, no. 6, pp. 1173–1179, Jun. 1985.
- [113] K. V. Masrani, H. S. Rama, and S. L. Bafna, "Ultraviolet absorption spectra: Some substituted coumarins," *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, vol. 24, no. 6, pp. 331–341, Apr. 2007.
- [114] H. Matsumoto and Y. Ohkura, "Studies of the absorption spectra of some psoralens.," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*, vol. 26, no. 11, pp. 3433–3439, Nov. 1978.
- [115] O. Gökay, D. Kühner, M. Los, F. Götz, U. Bertsche, and K. Albert, "An efficient approach for the isolation, identification and evaluation of antimicrobial plant components on an analytical scale, demonstrated by the example of *Radix imperatoriae*," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 5, pp. 2039–2047, Nov. 2010.
- [116] N.-I. Baek, E.-M. Ahn, H.-Y. Kim, and Y.-D. Park, "Furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 23, no. 5, pp. 467–470, Oct. 2000.

- [117] D. McHale and J. B. Sheridan, "The oxygen heterocyclic compounds of citrus peel oils," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 1, no. 4, pp. 139–149, Jul. 1989.
- [118] J. H. Tatum and R. E. Berry, "Coumarins and psoralens in grapefruit peel oil," *Phytochemistry*, vol. 18, no. 3, pp. 500–502, 1979.
- [119] A. Dugrand, A. Olry, T. Duval, A. Hehn, Y. Froelicher, and F. Bourgaud, "Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 45, pp. 10677–10684, Nov. 2013.
- [120] A. Dugrand-Judek *et al.*, "The distribution of coumarins and furanocoumarins in Citrus species closely matches Citrus phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways," *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. e0142757, 2015.
- [121] H. N. Nigg, H. E. Nordby, R. C. Beier, A. Dillman, C. Macias, and R. C. Hansen, "Phototoxic coumarins in limes," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 31, no. 5, pp. 331–335, 1993.
- [122] G. D'Hallewin, M. Schirra, E. Manueddu, A. Piga, and S. Ben-Yehoshua, "Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date," *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, vol. 124, no. 6, pp. 702–707, 1999.
- [123] C. de M. Cazal *et al.*, "Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 19, pp. 4307–4312, May 2009.
- [124] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology," *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, 2005. [Online]. Available: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. [Accessed: 03-Aug-2018].
- [125] P. J. Chien, F. Sheu, and H. R. Lin, "Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life," *Food Chem.*, vol. 100, no. 3, pp. 1160–1164, 2007.
- [126] J. K. Akhtar, A. Vernenghi, and A. Ravise, "Incidence of Fosetyl Al and elicitors on the defence reactions of Citrus attacked, by *Piiytophthora* spp," *Fruits*, vol. 41, p. 595, 1986.
- [127] C. Montagner, S. M. de Souza, C. Groposo, F. Delle Monache, E. F. A. Smânia, and A. Smânia Jr, "Antifungal activity of coumarins," *Zeitschrift für Naturforsch. C*, vol. 63, no. 1–2, pp. 21–28, Jan. 2008.
- [128] H. T. Simonsen, A. Adsersen, P. Bremner, M. Heinrich, U. Wagner Smitt, and J. W. Jaroszewski, "Antifungal constituents of *Melicope borbonica*," *Phyther. Res.*, vol. 18, no. 7, pp. 542–545, Jul. 2004.
- [129] A. Angioni, P. Cabras, G. D'Hallewin, F. M. Pirisi, F. Reniero, and M. Schirra,

- “Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in Citrus fruit,” *Phytochemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 1521–1525, Apr. 1998.
- [130] M. P. Calcagno, J. Coll, J. Lloria, F. Faini, and M. E. Alonso-Amelot, “Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 28, no. 1, pp. 175–91, Jan. 2002.