

# Actividad antimicrobiana de cáscaras y semillas de *Citrus limonia* y *Citrus sinensis*

## Antimicrobial activity of peels and seeds of *Citrus limonia* and *Citrus sinensis*

Laura D. Rodríguez-Rodríguez<sup>1</sup>, Ángel A. Jiménez-Rodríguez<sup>1</sup>, Walter Murillo-Arango<sup>1, 2</sup>, Ever A. Rueda-Lorza<sup>1</sup>, Jonh J. Méndez-Arteaga<sup>1</sup>

### Resumen

Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y fracciones en n-hexano, acetato de etilo, diclorometano y agua-etanol obtenidos a partir de semillas y cáscaras de *Citrus sinensis* y *Citrus limonia*, sobre los fitopatógenos *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamoni* y *Rhizopus oryzae*. El efecto inhibitorio de los diferentes extractos se midió sobre el crecimiento micelial, la esporulación y sobre los daños en la micromorfología de los microorganismos por los métodos densidad óptica y difusión en agar; los extractos fueron caracterizados por cromatografía de capa delgada, verificándose la presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, alcaloide y limonoide. Se presentó un comportamiento diferencial en cuanto a la actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos siendo los más activos los diclorometánicos de las cáscaras, y en este orden con mayor actividad en la fracción diclorometánica de *C. limonia*. Se observó efecto inhibitorio sobre los microorganismos, el cual fue dependiente de la concentración, apreciándose daños micromorfológicos sobre hifas y estructuras reproductivas, como esporangios y conidios a concentraciones cercanas a los 7 mg/ml. Los resultados sugieren que residuos de la agroindustria de cítricos como las cáscaras son fuente de metabolitos, con potencial antimicrobiano en el control de fitopatógenos de importancia agrícola.

**Palabras clave:** bio-plaguicidas, metabolitos secundarios, microorganismos fitopatógenos, residuos cítricos

### Abstract

The antimicrobial activity of ethanol extracts and fractions in n-hexane, ethyl acetate, dichloromethane, and water-ethanol obtained from seeds and peels of *Citrus limonia* and *Citrus sinensis*, against *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamoni*, and *Rhizopus oryzae* was evaluated. The inhibitory effect of various extracts was measured on mycelial growth, sporulation, and damage on microscopic morphology of microorganisms by the following methods: optical density and agar diffusion, determining the inhibitory effect on mycelial growth, sporulation, and microscopic morphology of plant pathogens; the extracts were characterized by thin layer chromatography, verifying the presence of secondary metabolites of flavonoid type, alkaloid, and limonoids. A differential behavior arises in the antimicrobial activity of different treatments, being the most active dichloromethane shells extracts, and in this order with increased activity in the dichloromethane fraction of *C. limonia*. The inhibitory effect on the microorganisms tested was observed at concentrations close to 7 mg/ml, the result of micromorphological damage on hyphae and reproductive structures such as sporangia and conidia, which were dependent on the extracts concentration. The results suggest that residues as agribusiness citrus peels are a source of metabolites with antimicrobial potential in controlling agriculturally important plant pathogens.

**Key words:** biopesticides, citrus waste, phytopathogenic microorganisms, secondary metabolites

---

Recibido: agosto 2015; aceptado: marzo 2016.

<sup>1</sup> Universidad del Tolima. Ibagué (Tolima), Colombia.

<sup>2</sup> Correo electrónico: <wmurillo@ut.edu.co>.

## INTRODUCCIÓN

El control de fitopatógenos en frutales y cereales, así como en otros cultivos es un problema que demanda el uso de antimicrobianos sintéticos de uso agrícola que ocasionan problemas toxicológicos y ambientales que han llevado a la búsqueda de nuevos métodos para la protección de los cultivos (Del Río et al. 2007). En frutales como el aguacate, el ataque de *Phytophthora cinnamoni* es considerado actualmente como una de las principales limitantes de la producción de aguacate (Mahomed y van den Berg 2011), mientras que *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus oryzae* se presentan de manera diferencial en cultivos de fresas, mora, uvas, entre otros frutales, así como en hortalizas (Hadian et al. 2008, Serey et al. 2007). Entre las alternativas que se han venido explorando para el control de fitopatógenos se ha destacado el uso de algunos extractos vegetales, tales como los de ají, ajo, cebolla y los aceites esenciales extraídos del limón, mandarina, naranja y algunas especies de eucalipto, los cuales contienen metabolitos secundarios bioactivos que permitirían un manejo sostenible de hongos fitopatógenos, por lo menos a nivel de agricultura orgánica (da Cruz et al. 2013, Gurjar et al. 2013). La diversidad estructural y los modos de acción son característicos de estos extractos, lo cual podría retrasar la aparición de cepas resistentes, además de ofrecer alta eficacia y probable baja toxicidad para el hombre, los organismos no blanco y el ambiente (Feliziani et al. 2013).

Algunas investigaciones científicas han registrado la recuperación de compuestos antimicrobianos a partir de una variedad de residuos agroindustriales, tales como cáscaras de vegetales, semillas, cereales, residuos de frutas y aceites esenciales de las cáscaras de diversas frutas (Negi 2014). Los residuos agroindustriales cítricos que corresponden a la cáscara, pulpa y semillas son abundantes y representan aproximadamente el 60% del peso de la fruta. Dichos residuos no son aprovechados, puesto que se desechan después de la extracción del jugo. Solo para el año 2013, Colombia tuvo una producción de cítricos que ascendió a 1.151.121,9 toneladas (Agronet 2016). Se ha señalado que estos residuos contienen metabolitos bioactivos tales como flavonoides, lactonas y triterpenoides con acción fungicida e insecticida (Del Río et al. 2004, Macias et al. 2005, Rezzadori et al. 2012), pudiéndose emplear para la elaboración de extractos con potencial antimicrobiano. Por tal razón, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y fracciones de subproductos de dos especies de cítricos: *Citrus sinensis* (L) Osbeck. y *Citrus limonia* (L) Osbeck. (Rutaceae), frente a los fitopatógenos: *Aspergillus*

*niger*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamoni* y *Rhizopus oryzae*, y además profundizar en la generación de conocimiento de la actividad biológica de los metabolitos presentes en los residuos de cáscara y semillas de estas dos especies de cítricos, como fundamento para la generación de alternativas de control de problemas fitosanitarios, basadas en la formulación de productos naturales a partir de residuos agroindustriales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección del material vegetal.** Cáscaras y semillas de dos especies de cítricos, *Citrus sinensis* variedad Valencia fueron recolectadas de las ventas de jugos de la zona urbana de Ibagué (Tolima), Colombia; y las de *Citrus limonia* fueron obtenidas de un cultivo en el municipio de Prado (Tolima), a 300 m. s. n. m. Cada tipo de residuo (cáscaras y semillas) se sometió a secado a 45 °C durante 72 h para luego ser molido en un molino eléctrico de aspas Thomas Wiley y homogenizado con un tamiz de malla de 2 mm.

**Extracción y fraccionamiento.** Se empacaron 170 g de cada tipo de material vegetal seco y molido en un dedal de interlón y se les realizó un desengrasado con n-hexano en un equipo Soxhlet hasta el agotamiento. El material se secó a 35 ± 2 °C eliminando los excesos de n-hexano para posteriormente someterlo nuevamente a reflujo en Soxhlet con etanol al 96%. En un embudo de separación se realizó un fraccionamiento líquido-líquido tomando 50 ml de cada extracto etanólico y mezclándolo con 50 ml de n-hexano, acetato de etilo, diclorometano, dejando el residuo etanol-agua al final (Jiménez et al. 2013). Los extractos etanólicos (crudos) y sus respectivas fracciones fueron concentrados a presión reducida en un rotavapor BÜCHI R114® y almacenados a 4 °C.

**Análisis fitoquímico.** A los extractos etanólicos y fracciones obtenidas con cada solvente, se le identificaron los principales núcleos de metabolitos secundarios mediante pruebas fitoquímicas y de cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida, utilizando patrones como limonina (Rodríguez et al. 2014). Adicionalmente, se determinó la presencia de flavonoides tipo aglicona por CCD usando una fase móvil éter de petróleo-acetato de etilo en proporciones 7:3 y revelado bajo luz ultravioleta a 365 nm. Como referencia se usó un patrón de naringenina (Wagner y Bladt 1996).

**Evaluación de la actividad antimicrobiana.** Por su actividad antimicrobiana representativa (inhibición >

50%) se seleccionaron los siguientes extractos: semilla de limón, fracción en diclorometano (SLD); semilla de naranja, fracción en diclorometano (SND); cáscara de limón, fracción en diclorometano (CLD) y extracto etanólico total de cáscara de limón (CLE). Se emplearon, el oomycete *P. cinnamomi*, suministrado por la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), y los hongos fitopatógenos *A. niger*, *B. cinerea* y *R. oryzae* obtenidos del cepario de microorganismos del Grupo de investigación en productos naturales (GIPRONUT) de la Universidad del Tolima. Los bioensayos con *P. cinnamomi* se realizaron midiendo la cinética crecimiento del oomyceto en medio líquido a 27 °C, en función de los cambios turbidimétricos, en un lector de microplacas Bio-Rad 680, a longitud de onda de 492 nm (Niuurka et al. 2007). El inóculo se preparó a partir de fragmentos de micelio, suspendidos en un tubo falcón con 10 ml de agua peptonada estéril, previamente macerados con perlas de vidrio estériles en vórtex durante cinco minutos y filtrados a 45 µm. La concentración se ajustó a 1 a 9 x 10<sup>4</sup> fragmentos de micelio/ml (Mandalari et al. 2007). Cada unidad experimental consistió en 200 µl, conformados por: 50 µl inóculo, 100 µl de medio sabouraud líquido y 50 µl de una solución de cada uno de los extractos, preparados para su evaluación a concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 y 10 mg/ml y agua como control negativo.

A partir del crecimiento poblacional en función del tiempo, se obtuvo el área bajo la curva en pixeles para cada tratamiento, asistido con el programa de fotografía ImageJ versión 1,45 (Abramoff et al. 2004). El porcentaje de inhibición se calculó a partir del área bajo la curva obtenida de la cinética de crecimiento de cada tratamiento de *P. cinnamomi* respecto al área bajo la curva del control no tratado (Sanmartín et al. 2012).

La susceptibilidad de los fitopatógenos *A. niger*, *B. cinerea* y *R. oryzae*, fue evaluada por el método de difusión en agar (Torres et al. 2011), agregando los tratamientos que consistieron en los extractos y las fracciones en diclorosemillas y cáscaras a concentración final de 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 y 10 mg/ml, incluyendo un control absoluto y un control positivo (medio de cultivo más Ketoconazol a 2 mg/ml). Cada tratamiento se desarrolló con un disco de agar de 0,5 cm de diámetro con el hongo a evaluar, ubicándolo en la parte central de una caja de Petri. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición, calculado a partir del crecimiento micelial de cada hongo frente al crecimiento total del control absoluto. Posteriormente, en una cámara de Neubauer se comparó

la cantidad de esporas por ml del control respecto a cada tratamiento (Bautista et al. 2003).

#### Identificación y evaluación del daño micromorfológico.

Se seleccionaron muestras de estructuras vegetativas y germinativas de los hongos objeto de estudio con 72 h de incubación, se montaron y fijaron con azul de lactofenol en portaobjetos que se observaron y analizaron en un microscopio óptico Olympus, a 40X equipado con una cámara digital (Motic images). El área (µm<sup>2</sup>) de los esporangios se determinó utilizando el software Motic Imag Es Plus versión 2.0 (Angulo 2009).

**Análisis estadísticos.** Los ensayos de actividad sobre *A. niger*, *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *R. oryzae* se realizaron bajo un diseño experimental completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento. A partir de estos resultados se calcularon las CI<sub>50</sub>, obtenidas por interpolación de las curvas de los análisis de regresión generados de los microorganismos tratados y no tratados, usando el programa Statgraphics Centurion. Los datos de área del esporangio, obtenidos de los tratamientos más activos (CLE y CLD) sobre *A. niger* y *R. oryzae*, se compararon mediante un análisis de varianza a un nivel de significancia de 0,05 usando la prueba de comparación de medias Tukey.

## RESULTADOS

**Evaluación de la actividad antimicrobiana.** En los ensayos de actividad sobre *P. cinnamomi* se observó para todos los tratamientos un efecto dosis-respuesta frente a la inhibición del microorganismo, y a concentraciones de 5 a 6 mg/ml, los extractos de cáscara de las especies evaluadas fueron los de mayor actividad, mientras las semillas y sus fracciones fueron menos activas (figura 1). CLD fue el tratamiento con mayor actividad frente a *P. cinnamomi*, registrando inhibición del 57,3% a 0,5 mg/ml y del 99,9% a 5 mg/ml. CLE tuvo inhibición máxima del 100% a concentración de 8 mg/ml.

Para los hongos *A. niger*, *B. cinerea* y *R. oryzae*, CLD fue el tratamiento más activo (figura 2), mostrando aumento en el porcentaje de inhibición del micelio y de la esporulación de manera dependiente con la concentración, además se observó que la esporulación de *R. oryzae* se inhibió en 100% a concentración de 7 mg/ml, mientras que el crecimiento micelial a esta misma concentración solo se inhibió 47%. En cuanto a *A. niger* y *B. cinerea* CLD a 7 mg/ml se presentó porcentaje de inhibición del micelio del 59 y 65%, respectivamente.

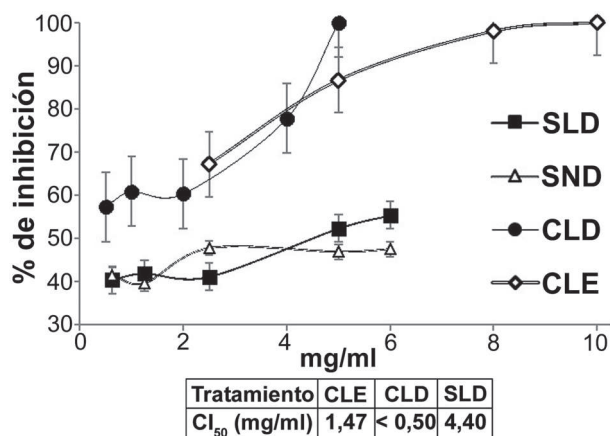


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi* tratado con diferentes extractos y fracciones de *Citrus limonia* y *Citrus sinensis*.

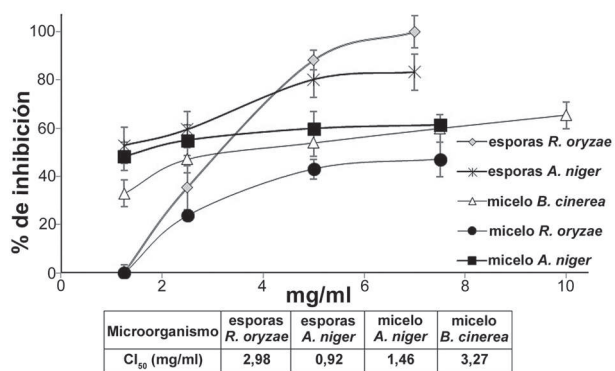


Figura 2. Inhibición del crecimiento del micelio y esporulación ocasionada por el extracto de cáscara de limón en diclorometano (CLD) sobre *Botrytis cinerea*, *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus niger*.

Los tratamientos que presentaron mayor inhibición de la esporulación fueron seleccionados para evaluar el daño micromorfológico; de esta manera montajes de *A. niger* y *R. oryzae* tratados con CLE y CLD se compararon con un control sin tratamiento a razón de: tamaño de sus estructuras reproductivas, el área y la presencia de daño en sus esporangios (figura 3). El tamaño de las estructuras reproductivas de *R. oryzae* mostró correlación inversa con los tratamientos de forma dosis dependiente, asimismo, CLD, a concentración de 7 mg/ml fue significativamente más activa que CLE y el control ( $p < 0,05$ ).

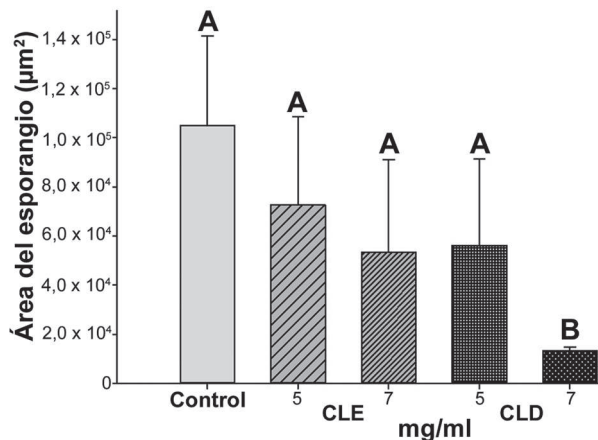
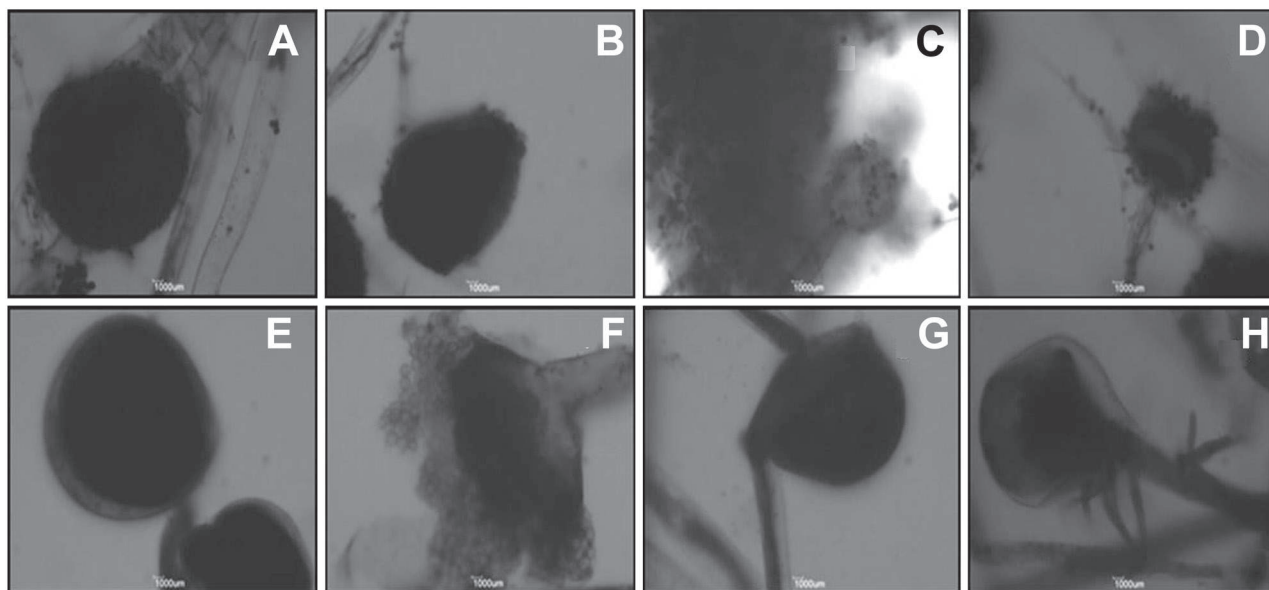


Figura 3. Efecto sobre el tamaño de esporangios de *Rhizopus oryzae* ocasionado por el extracto de cáscara de limón en etanol (CLE) y el extracto de cáscara de limón en diclorometano (CLD) a concentraciones de 5 y 7 mg/ml.

La exposición de *A. niger* y *R. oryzae* a CLE y CLD ocasionó alteraciones en sus estructuras vegetativas y germinativas; estas se presentaron con mayor intensidad cuando el hongo fue expuesto a CLD presentándose un efecto dosis dependiente. Los cambios que se observaron en *A. niger* consistieron principalmente en la disminución del tamaño y color de los esporangios, tal como se evidencia en la figura 4B. CLE a 7 mg/ml ocasionó malformaciones en los esporangios, mientras que CLD a la misma concentración causó daños tales como puntas sin cerrar con vaciado de líquido citoplasmático y falta de pigmentación (figuras 4C y 4D). En *R. oryzae*, CLE originó la ruptura de los esporangios (figuras 4F), y CLD causó desorganización de la pared celular en los esporangióforos (figuras 4G y 4H).

**Actividad biológica y composición química.** La identificación de los principales núcleos secundarios representativos de los metabolitos, para los extractos crudos de cáscara y semillas de las dos especies realizado mostró que las semillas de ambas especies contienen aminoácidos, saponinas y taninos condensados mientras que los extractos de cáscaras presentaron mayor cantidad de azúcares reductores y flavonoides. El revelado bajo luz ultravioleta a 365 nm mostró bandas prominentes de color azul brillante tanto en CND como en CLD que podrían asociarse con la presencia de cumarinas, no obstante, no se confirmó su presencia mediante otras pruebas. Tanto en cáscaras como en semillas se detectaron núcleos relacionados estructuralmente con polifenoles y polisacáridos.



**Figura 4.** Tamaño y apariencia de esporangios. A y E. Testigo de *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae*; B. *Aspergillus niger* expuesto al extracto de cáscara de limón en etanol (CLE) a 7 mg/ml; C y D. *Aspergillus niger* tratado con el extracto de cáscara de limón en diclorometano (CLD) a 7 mg/ml; F. *Rhizopus oryzae* tratado con el extracto de cáscara de limón en etanol (CLE) a 5 mg/ml; G y H. *Rhizopus oryzae* con el extracto de cáscara de limón en diclorometano (CLD) a 7 mg/ml.

La identificación de triterpenoides tipo limonoide por CCD y cromatografía líquida, realizado previamente y comunicado por Rodríguez et al. (2014), mostró la presencia de limonoides relacionados estructuralmente con la limonina principalmente en las semillas, las cuales no parecen tener efecto antimicrobiano sobre los organismos evaluados. Del mismo modo los extractos etanólicos de cáscaras mostraron contener mayor cantidad de flavonoides tipo aglicona, de acuerdo con la identificación que se realizó con un patrón de naringenina. Estos dos tipos de compuestos bioactivos se detectaron en mayor concentración en las fracciones en diclorometano de las cáscaras.

## DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que, de todos los extractos y fracciones evaluadas, los de cáscaras, y en especial los de *C. limonia* y su fracción diclorometánica, están asociados con el potencial antimicrobiano observado sobre *A. niger*, *B. cinerea*, *P. cinnamomi* y *R. oryzae*. Los efectos se manifestaron a través de la disminución en el crecimiento del micelio, la capacidad de esporulación y los daños micromorfológicos en sus estructuras, lo que afectó de manera diferencial el crecimiento, ocasionando incluso la

inhibición completa en su desarrollo. La disminución en el tamaño de los esporangios afecta la capacidad reproductiva del hongo, ya que se albergan menor cantidad de esporas, las cuales ofrecen resistencia a estos organismos en condiciones desfavorables (Evans 2007).

Daños micromorfológicos, como los que se observaron en los organismos evaluados (figuras 4A y 4H), fueron evidenciados por Angulo et al. (2009) en *Rhizopus stolonifer* tratado con extracto metanólico de semillas de *Swietenia humilis*. Alteraciones como desorganización en la pared celular de los esporangióforos, puntas sin cerrar con vaciado de líquido citoplasmático fueron observadas al aumentar la concentración del extracto metanólico de semillas hasta en 7,5%, impidiendo el desarrollo adecuado de esporangios y zigospangios. La especie *S. humilis* contiene diversos limonoides a los que se le atribuye su acción esporicida y a nivel micromorfológico. Sin embargo, en el presente estudio fueron más activos los tratamientos provenientes de cáscaras y no de semillas, residuo en el cual se encuentra mayor concentración de compuestos de tipo limonoide.

El fraccionamiento de los extractos etanólicos crudos mostró ser un factor importante en la actividad, que se evidencia al fraccionar CLE y obtener fracciones de menor

polaridad como CLD. Comportamientos semejantes se han observado en estudios con epicarpio de *Citrus aurantifolia* *swingle* realizados por Duarte y Ramírez en el 2006, en el que se mostró que las fracciones etéreas y clorofórmicas inhiben por completo el desarrollo de *B. cinerea* a 200 mg/ml, lo cual estaría asociado a la presencia de compuestos como terpenos, flavonoides y otros de polaridad media, que se concentraron aumentando el nivel de la actividad; asimismo, la mezcla o su combinación de diferentes compuestos de estas características podría implicar un comportamiento sinérgico en la actividad biológica (Mandalari et al. 2007).

La detección por CCD de compuestos que estarían relacionados con flavonoides de tipo aglicona en CLE y CLD concuerda con lo registrado previamente para agliconas metoxiladas, especialmente flavanonas, que se extraen en solventes de baja polaridad (Khan et al. 2014). Los flavonoides cítricos de tipo aglicona son más activos que los glicosilados, y la desglicosilación aumenta el potencial antimicrobiano. Igualmente, las combinaciones de algunos flavonoides como eriodictiol, naringenina y hesperetina pueden actuar de manera sinérgica, incrementando el potencial antimicrobiano (Mandalari et al. 2007).

Otros estudios resaltan la capacidad de flavonoides presentes en cítricos para inhibir o estimular el crecimiento de hongos. Al respecto, Weidenbörner y Jha (1994) encontraron que a 0,2 mM de naringina y hesperidina se reducía el crecimiento micelial de *Spicellum roseum*, sin embargo, la naringina a la misma concentración estimuló el crecimiento de *Alternaria tenuissima*. Ortuño et al. (2006), evidenciaron algunas modificaciones en hifas de *Penicillium digitatum* y la inhibición en la producción de esporas causada por neohesperidina y naringenina. Por otro lado, Salas et al. (2011) mostraron un efecto sinérgico de la mezcla de flavonoides cítricos, sin embargo, los autores concluyen que los mecanismos comunes que reducen el crecimiento del micelio todavía no están claros. Comportamientos semejantes se apreciaron en este estudio, ya que en ocasiones un mismo extracto mostró efectos diferenciales sobre los hongos *A. niger* y *R. oryzae*, observándose mayor efecto sobre *A. niger* en relación con la esporulación y el crecimiento micelial.

Los ensayos in vitro llevados a cabo demostraron que el extracto de cáscaras de *C. limonia* tuvo mayor actividad ya que puede actuar como agente fungitóxico frente a los hongos evaluados, tanto a nivel del crecimiento del micelio como en la esporulación, causando alteraciones a nivel de morfología y ultra-estructura de las hifas, así como sobre

las estructuras reproductivas. Lo anterior podría deberse a la composición química, la cantidad y las características estructurales de los metabolitos secundarios mencionados, tales como: las flavonas a nivel de flavedo y las flavanonas a nivel de albedo tal como lo describieron Del Río et al. (2007), en un estudio en el que se mostró que los niveles de flavonoides de *Citrus limon* y la resistencia a *Penicillium digitatum* tienen correlación directa, no obstante es necesario realizar estudios posteriores que permitan elucidar las estructuras de los compuestos bioactivos relacionados con la actividad antimicrobiana evidenciada en este tipo de matrices residuales.

Lo anterior muestra que los residuos agroindustriales de estas especies de cítricos pueden ser una fuente disponible para la obtención de metabolitos secundarios activos frente a microorganismos fitopatógenos de interés, que además contribuye a un mejor aprovechamiento y disposición, disminuyendo los problemas asociados con su impacto ambiental negativo. Los resultados de esta investigación representan una base para la realización de próximos trabajos, dirigidos a ampliar el conocimiento de la composición química, desarrollo de formulaciones, escalado y estudios de viabilidad económica para determinar la factibilidad de obtener una formulación comercial para el control de problemas fitosanitarios, basada en productos naturales obtenidos a partir de residuos agroindustriales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su gratitud a la Universidad del Tolima y a la Corporación para las Investigaciones Biológicas (CIB) por su apoyo para la elaboración de este proyecto.

## REFERENCIAS

- Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11 (7): 36-42.
- Agronet. 2016. Producción agrícola departamental en la cadena productiva de cítricos en el año 2013. [Internet] Fecha de acceso: 10 de febrero de 2016. Disponible en: <<http://www.agronet.gov.co/Paginas/Agrocadenas.aspx>>.
- Angulo-Escalante MÁ, Armenta-Reyes E, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, Salazar-Villa E, Valdéz-Torres JB. 2009. Extractos de semilla de *Swietenia humilis* Zucc. con actividad antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27 (2): 84-92.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Barrera-Necha LL. 2000. Antifungal screening of plants of the State of Morelos, Mexico against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18 (1): 36-41.

- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, Wilson, CL. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22 (9): 1087-1092.
- Da Cruz-Cabral L, Pinto VF, Patriarca A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166 (1): 1-14.
- Del Río JA, Gómez P, Baidez GA, Arcas MC, Botía JM, Ortuño A. 2004. Changes in the level of polymethoxyflavones and flavones as part of the defence mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (7): 1913-1917.
- Del Río JA, Porras I, Martínez D, Gómez P, Díaz L, García LA, Riquelme F, Ortuño A. 2007. Efecto de la conservación en frío y manipulación postcosecha de frutos de *Citrus limon* (cv. Fino-49) sobre los niveles de flavonoides y resistencia a *Penicillium digitatum*. En: Artés Calero F, editor. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones: Cartagena (Murcia): Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha (AITEP). p. 299-304.
- Duarte YA, Ramírez MB. 2006. Acción antifúngica del extracto etanólico y sus fracciones de polaridad creciente del epicarpio de lima (*Citrus aurantifolia* Swingle) aplicada a *Botrytis cinerea* y *Monilia fructicola* causantes de la podredumbre gris en la uva (*Vitis vinifera*), y la podredumbre morena en el durazno (*Prunus serotina* Ehrh). *Revista Nova Scientia*, 2: 56-63.
- Evans H. 2007. Cacao diseases. The trilogy revisited. *Phytopathology*, 97 (12):1640-1643.
- Feliziani E, Santini M, Landi L, Romanazzi G. 2013. Pre-and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 78: 133-138.
- Gurjar MS, Ali S, Akhtar M, Singh KS. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*, 3 (3): 425-433.
- Hadian J, Ghasemnezhad M, Ranjbar H, Frazane M, Ghorbanpour M. 2008. Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11 (5): 553-562.
- Jiménez AA, Rodríguez LD, Murillo AW, Méndez JJ, Rueda LA. 2013. Actividad anti-alimentaria de metabolitos secundarios de residuos cítricos sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39 (1): 113-119.
- Khan MK, Dangles O. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33 (1): 85-104.
- Macías FA, Torres A, Maya CC, Fernández B. 2005. Natural biocides from citrus waste as new wood preservatives. En: Harper JDI, An M, Wu H, Kent JH, editors. Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy, "Establishing the Scientific Base", Aug. 21-26, 2005. New South Wales (Australia): Charles Sturt University, Wagga. p. 426-429.
- Mandalari G, Bennett RN, Bisignano G, Trombetta D, Saija A, Faulds CB, Gasson MJ, Narbad A. 2007. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6): 2056-2064.
- Mahomed W, van den Berg N. 2011. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biology*, 11 (1): 167.
- Negi S. 2014. Exploring Plant and Agro-industrial Wastes for Antimicrobial Biochemicals. Chapter 14. En: Brar SK, Dhillon GS, CR Soccol, editores. Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals. New York (USA): Springer. p. 335-365.
- Niurka LA, Hernández MM, Velázquez MG, Guerra MG, Melo GE. 2007. Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. y *Mucor* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25 (2): 109-113.
- Ochoa JL, Hernández-Montiel LG, Latisnere-Barragán H, León-de-La Luz JL, Larralde-Corona CP. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Journal of Food*, 5 (5): 352-359.
- Okwu DE, Awurum AN, Okoronkwo JI. 2007. Phytochemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of extracts from citrus plants against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*). *African Crop Science Society*, 8: 1755-1758.
- Ortuño A, Báidez A, Gómez P, Arcas MC, Porras I, García LA, Del Río JA. 2006. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 98 (2): 351-358.
- Rezzadori K, Benedetti S, Amante ER. 2012. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing*, 90 (4): 606-614.
- Rodríguez LDR, Jiménez AAR, Rueda EAL, Méndez JJA, Murillo WA. 2014. Relación entre contenido de limonina en residuos cítricos y actividad antialimentaria sobre *Spodoptera frugiperda*. *Revista Colombiana de Entomología*, 40 (2): 164-169.
- Salas MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M, Resnik S. 2011. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124: 1411-1415.
- Sanmartín NP, López X, Rueda, Ever A. 2012. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagonista de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga*, 2 (7): 29-49.
- Serey RA, Torres R, Latorre BA. 2007. Pre-and post-infection activity of new fungicides against *Botrytis cinerea* and other fungi causing decay of table grapes. *Ciencia e Investigación Agraria*, 34 (3): 215-224.
- Torres J, Romero H, Santiago A, Apitz CR. 2011. Susceptibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26 (1): 42-47.
- Wagner H, Blatt S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2<sup>da</sup> ed. New York (USA): Springer-Verlag. p. 384.
- Weidenbömer M, Jha, HC. 1994. Antifungal activity of flavonoids in relation to degree of hydroxylation, methylation and glycosidation. *Acta Horticulturae*, 381: 702-708.