UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Tesis

Para optar al Grado Académico de

Doctor en Ciencias Agrarias

# APLICACIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES OBTENIDAS DE PLANTAS PARA EL BIOCONTROL DE PATÓGENOS FÚNGICOS DE CÍTRICOS

**Ing. Agr. (Msc.) Norma Hortensia Alvarez**

**Director**: Dr. Marcos G. Derita

**Co-Directora**: Dra. María Alejandra Favaro

**Jurado Evaluador:**

Dra. Andrea G. Reutemann

Dra. Victoria A. Vaillard

Dra. Maria Eugenia Sesto Cabral

Esperanza (Santa Fe), 2024

- **PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS**

Stegmayer, M.I.; Seimandi, G.; **Alvarez, N.H**.; Moreno, M.J.; Ruiz, V.; Reutemann, A.G.; Favaro, M.A; Derita, M.G. (2023). Evaluación del aceite esencial de *Pelargonium graveolens* para prevenir la podredumbre morena en durazno. *Investigación Joven*, 10(2), 246-252.

**Alvarez, N**., Stegmayer, M.I., Seimandi, G., Pensiero, J.F., Zabala, J.M., Favaro, M.A., Derita, M.G. Natural Products Obtained from Argentinean Native Plants Are Fungicidal against Citrus Postharvest Diseases. *Horticulturae*, 9, (5), 562, 2023.

Martin, M., Castro, D. C., Gabriel, P. M., Micheloud, N. G., **Alvarez, N. H**., & Buyatti, M. A. (2023). Effect of fertilization and container size on the quality of "Sangre de Drago" (*Croton urucurana* Baill.) seedlings in a plug+ 1 production system. New Forests; 1(1) 1-35.

Stegmayer, M.I., **Alvarez, N.H**., Sager, N., Buyatti, M., Derita, M.G. Evaluation of *Pelargonium graveolens* essential oil to prevent gray mold in rose flowers. *Journal of Plant Protection Research*, 62, (2), 145-152, 2022. DOI: 10.24425/jppr.2022.141353.

Stegmayer, M.I., Fernández, L., **Alvarez, N**., Seimandi, G., Reutemann, A., Derita, M. *In Vitro* antifungal screening of Argentine native or naturalized plants against the phytopathogen *Monilinia fructicola*. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 25, (7), 1158-1166, 2022.

Seimandi, G., **Alvarez, N**., Stegmayer, M.I., Fernández, L., Ruiz, V., Favaro, M.A., Derita, M.G**.** An update on phytochemicals and pharmacological activities of the genus *Persicaria* and *Polygonum*. Molecules, 26, 5956. 2021.

Stegmayer, M.I., Fernández, L., **Alvarez, N.**, Olivella, L., Gutiérrez, H., Favaro, M.A., Derita, M. Aceites esenciales provenientes de plantas nativas para el control de hongos fitopatógenos que afectan a frutales. Revista FAVE - Ciencias Agrarias 20, (1). 2021.

- **CAPÍTULOS DE LIBROS**

Derita, M. Stegmayer, M.I., **Alvarez, N.H**. Productos naturales para el control de enfermedades fúngicas. En: Desarrollo sostenible en el centro norte de la Provincia de Santa Fe. Canals, A. (Ed.). UNL Ediciones, Argentina, 2021, en prensa, ISBN 978-987-749-281-1.

**Alvarez, N. H**., Fernández, L. N., Seimandi, G. M., Stegmayer, M. I., Ruiz, V. E., Derita, M. G. Antifungal activity validation of wild plants used in Argentine ethnomedicine. A revision of *Polygonum*. En: *Ethnopharmacology of Wild Plants*. Rai, M., Bhattarai, S., Feitosa, C. (Eds.). CRC Press/Taylor & Francis Group, U.S.A., 2021, pp 110-127, ISBN 978-0-367-51202-6 (hbk), ISBN: 978-1-003-05281-4 (ebk).

Stegmayer, M. I., **Alvarez, N**., Favaro, M. A., Fernández, L., Carrizo, M. E., Reutemann, A., Derita, M. Argentinian Wild Plants as Controllers of Fruits Phytopathogenic Fungi: Trends and Perspectives. En: *Wild Plants: The Treasure of Natural Healers*. Rai, M., Shandesh, B., Feitosa, C. (Eds.). CRC Press/Taylor & Francis Group, U.S.A., 2020, pp 120-137, ISBN 978-0-3678-2087-9.

Stegmayer, M. I., **Alvarez, N**., Di Liberto, M., Daurelio, L., Derita, M. Knowledge of the ethnomedicinal plants used by Tobas and Mocovíes tribes in the Central-North of Argentina. En: *Ethnobotany: Local Knowledge & Traditions*. Martinez, J., Muñoz-Acevedo, A., Rai, M. (Eds.). CRC Press/Taylor & Francis Group, U.S.A., 2019, pp 187-212, ISBN 978-1-1383-8898-7.

- **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores, Dr. Marcos Derita y Dra. María Alejandra Favaro, por su acompañamiento, orientación académica y dedicación a lo largo de este proceso formativo. Su compromiso con la enseñanza y la investigación ha sido fundamental para el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes de la Cátedra de Cultivos Intensivos de la Facultad de Ciencias Agrarias, por su permanente disposición y apoyo.

A mis amigos y compañeros: Marianela P., Alejandra L., María Inés S., Laura O., Anita S., Pamela B., Federico T. y Gisela S., que han contribuido a mi sostenimiento personal y académico.

A la Universidad Nacional del Litoral y al Instituto de Ciencias Agropecuarias del Litoral (ICiAgro), por promover y facilitar mi formación de posgrado, brindando el marco institucional necesario para la realización del Doctorado en Ciencias Agrarias.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de la beca de posgrado.

A mis hermanas, María y Mónica y a mis sobrinas, Juliana y Francesca, por su constante apoyo, comprensión y acompañamiento durante toda esta etapa.

A mis padres, Eduardo y Tomasa, cuya memoria me acompaña y guía cada día; quienes con su ejemplo de vida me enseñaron que el trabajo, la perseverancia y la humildad son los pilares sobre los que se construyen los verdaderos logros. Este logro también les pertenece.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

**INDICE**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS ..... 1

RESUMEN ..... 2

ABSTRACT ..... 3

Introducción general, Hipótesis, Objetivos y Esquema de la Tesis ..... 4

Hipótesis y objetivos de trabajo: ..... 7

Esquema de la tesis ..... 8

Capítulo I: Caracterización productiva de naranjo. Identificación de los hongos fitopatógenos en estudio y su resistencia a fungicidas. ..... 10

Introducción ..... 10

Producción nacional e internacional de cítricos ..... 10

Principales patógenos que afectan la producción cítrica a campo y en la poscosecha ..... 11

Materiales y Métodos ..... 15

Análisis de la producción citrícola ..... 15

Aislamiento, caracterización y depósito de cepas fúngicas ..... 16

Identificación molecular ..... 16

Análisis bibliográfico de fungicidas aplicados a casos relacionados con esta tesis ..... 18

Resultados ..... 18

Producción mundial ..... 18

Producción sudamericana ..... 20

Producción nacional ..... 22

Caracterización morfológica, depósito y conservación de las cepas fúngicas ..... 24

Identificación molecular ..... 25

Aplicación actual de fungicidas en los cultivos de interés ..... 26

Discusión ..... 29

Conclusión ..... 34

Capítulo II: Extracción de metabolitos secundarios de las especies vegetales seleccionadas para ser evaluados como fungicidas. ..... 35

Introducción ..... 35

Materiales y Métodos ..... 36
Preparación de extractos fijos ..... 39
Obtención de Aceites esenciales ..... 41
Resultados ..... 41
Selección de las especies vegetales ..... 41
Rendimientos ..... 41
Obtención de Aceites esenciales ..... 43
Discusión ..... 44
Conclusión ..... 45
Capítulo III: Ensayos *in vitro* de los extractos y aceites esenciales obtenidos a partir de las especies vegetales seleccionadas, por su capacidad antifúngica contra los fitopatógenos en estudio. ..... 46
Introducción ..... 46
Materiales y Métodos ..... 47
Obtención de suspensiones fúngicas ..... 47
Bioensayo de susceptibilidad *in vitro* para extractos fijos ..... 47
Ensayo de volátiles para determinación de la actividad de aceites esenciales ..... 48
Resultados ..... 49
Actividad antifúngica de extractos fijos ..... 49
Análisis de los porcentajes de extractos activos, moderadamente activos e inactivos ..... 53
Determinación del porcentaje de inhibición fúngica mediante bioensayo de volátiles para las especies productoras de aceites esenciales ..... 55
Discusión ..... 57
Conclusión ..... 62
Capítulo IV: Ensayos *in vivo* en naranjas var. ´Salustiana´ ..... 64
Introducción ..... 64
Materiales y Métodos ..... 65
Ensayo de inhibición de patógenos de poscosecha en naranjas var. ´Salustiana´ ..... 65
Calidad de fruta ..... 66

Resultados ..... 67
Características externas de calidad ..... 67
Calidad de fruta ..... 70
Discusión ..... 77
Conclusión ..... 80
Capítulo V: Caracterización fitoquímica de los aceites esenciales obtenidos y evaluados por su acción fungicida ..... 82
Introducción ..... 82
Materiales y Métodos ..... 83
Caracterización de los perfiles químicos de los AE por CG-EM ..... 83
Resultados ..... 84
Composición química mayoritaria de los AE obtenidos y evaluados ..... 84
Discusión ..... 86
Conclusión ..... 87
DISCUSIÓN GENERAL ..... 88
Anexo I Especies vegetales presentadas en orden alfabético de las familias botánicas. ..... 92
BIBLIOGRAFÍA CITADA ..... 117

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**Ac**, acetona/acetónico

**ADNr**, ácido desoxirribonucleico ribosómico

**AE**, aceite esencial

**APD**, Agar-Papa-Dextrosa

**β**, beta

**CCD**, cromatografía en capa delgada

**CCPR**, Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas

**CG-EM**, cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

**CLSI**, *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**DCM**, diclorometano/ diclorometánico

**DMSO**, dimetilsulfóxido

**dNTPs**, desoxirribonuclétidos trifosfato

**EDTA**, *Ethylenediaminetetraacetic acid solution*; ácido etilendiaminotetraacético

**EEUU,** Estados Unidos

**$FeCl_3$**, Cloruro férrico

**fl**, flores

**FRAC**, Comité de Acción de Resistencia de Fungicidas

**g**, gramos

**°C**, grados Celsius

**H**, hexánico

**ha**, hectárea

**HCl,** ácido clorhídrico

**hj**, hojas

**ITS**, *Internal Transcribed Spacer*; espaciador transcrito interno

**kg**, kilogramos

**L**, luminosidad

**LMR**, Límite Máximo de Residuos

**M,** molar

**MCBA**, Mercado Central de Buenos Aires

**MeOH**, metanol/metanólico

**$MgCl_2$**, cloruro de magnesio

**mg**, miligramo

**mL**, mililitro

**mM**, milimolar

**nm**, nanómetro

**ng**, nanogramo

**ONU**, Organización de las Naciones Unidas

**pa**, parte aérea

**PCR**, *Polymerase chain reaction*; Reacción en Cadena de la Polimerasa

**pH,** potencial de hidrógeno

**ppm**, parte por millón

**% P/V**, porcentaje peso en volumen

**rpm**, revoluciones por minuto

**SDS**, *sodium dodecyl sulphate*; dodecilsulfato sódico

**sp**., especie

**SST**, Sólidos Solubles Totales

**TA**, Acidez Titulable

**tn**, tonelada

**Tris**, Tris(hidroximetil) aminometano

**µL**, microlitro

**UFC**, Unidades Formadoras de Colonias

**UV**, ultravioleta

**RESUMEN**

Los cítricos representan una parte importante de la dieta diaria y son susceptibles de enfermedades de campo y poscosecha causadas por hongos fitopatógenos como *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum, Geotrichum citri-aurantii* y *Phyllosticta citricarpa*. Para su control se emplean fungicidas, pero se han observado incrementos en las poblaciones de patógenos capaces de resistir las dosis comerciales, por lo que se busca acceder a alternativas naturales para este fin. Inicialmente en esta tesis, se caracterizó la producción mundial, sudamericana y nacional de naranjas, indicando la baja incidencia mundial de la producción argentina y la necesidad de reposicionarla. Luego, se aislaron los principales patógenos de cítricos para las pruebas de susceptibilidad posteriores y se los identificó morfológica y molecularmente. Se realizó la búsqueda de reportes de resistencia y de los fungicidas comerciales utilizados actualmente (dosis, asociaciones, grupos químicos, sitio de acción). Se elaboraron fichas descriptivas de las 26 especies vegetales seleccionadas, y se obtuvieron 42 extractos fijos y 5 aceites esenciales. Los extractos que resultaron más activos *in vitro* fueron los de *Orthosia virgata*, *Petiveria alliacea*, *Funastrum clausum*, *Albizia inundata*, *Solanum caavurana*, *Solanum pilcomayense* y *Persicaria acuminata*, que inhibieron el 100% del crecimiento de al menos uno de los cuatro fitopatógenos estudiados. Los aceites esenciales obtenidos de *Pelargonium graveolens*, *Melaleuca linearis* y *Lippia turbinata* demostraron un buen desempeño frente a dos de los patógenos estudiados (*P. digitatum* y *P. italicum*). En los ensayos de poscosecha con naranjas var. ´Salustiana´, los extractos diclorometánico de *S. pilcomayense* y de *P. acuminata* redujeron considerablemente la incidencia y severidad de la enfermedad causada por *P. digitatum*; el extracto diclorometánico de *S. pilcomayense* y el aceite esencial de *L. turbinata* fueron capaces de controlar la enfermedad causada por *P. italicum*; mientras que el extracto diclorometánico de *P. acuminata* no redujo la incidencia, pero sí la severidad de la enfermedad causada por *G. citri-aurantii*. Los parámetros de calidad (pérdida de peso, porcentaje de jugo, SST y acidez titulable) de las frutas tratadas con estos productos naturales, no presentaron diferencias significativas relevantes respecto al control con agua, indicando que los mismos no afectarían los aspectos de calidad de las naranjas. Finalmente, mediante la técnica CG-EM se describió la fitoquímica de los aceites esenciales obtenidos, y entre los más activos se halló la presencia de D-limoneno, 1,8-cineol, isómeros de terpineol y geraniol como principales componentes. Se concluye que los productos naturales evaluados en esta tesis, provenientes de especies vegetales nativas, controlan algunos patógenos de cítricos *in vitro* y en la etapa de poscosecha.

**Palabras claves**: Productos Naturales, Especies nativas, Fungicidas, Poscosecha, Cítricos.

**ABSTRACT**

*Citrus* fruits are an important component of the daily diet. They are vulnerable to field and postharvest diseases caused by phytopathogenic fungi such as *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum citri-aurantii*, and *Phyllosticta citricarpa*. While fungicides are commonly used for their control, there has been an increase in pathogen populations resistant to standard commercial doses, driving the search for new natural alternatives for disease management. In this thesis, the global, South American, and national production of oranges was characterized, highlighting the low global contribution of Argentina's production and the need for its repositioning in the market. The main citrus pathogens were then isolated for subsequent susceptibility testing and identified morphologically and molecularly. A review was conducted on the resistance reports and commercial fungicides currently in use, including their dosages, chemical groups, and modes of action. Descriptive sheets were prepared for 26 selected species, from which 42 extracts and 5 essential oils were obtained. The most active extracts *in vitro* were those from *Orthosia virgata*, *Petiveria alliacea*, *Funastrum clausum*, *Albizia inundata*, *Solanum caavurana*, *Solanum pilcomayense*, and *Persicaria acuminata*, which inhibited 100% of the growth of at least one of the four studied phytopathogens. Among the essential oils, those obtained from *Pelargonium graveolens*, *Melaleuca linearis*, and *Lippia turbinata* demonstrated good efficacy against two of the studied pathogens (*P. digitatum* and *P. italicum*). In postharvest trials with *Citrus sinensis* cv. 'Salustiana', the dichloromethane extracts of *S. pilcomayense* and *P. acuminata* significantly reduced the incidence and severity of *P. digitatum* infection, while the dichloromethane extract of *S. pilcomayense* and the essential oil of *L. turbinata* effectively controlled *P. italicum*. Although the dichloromethane extract of *P. acuminata* did not reduce the incidence of *G. citri-aurantii*, it did decrease the severity of the disease. Quality parameters (weight loss, juice percentage, total soluble solids, and titratable acidity) of the treated fruits showed no significant differences compared to the water control, indicating that the natural products did not adversely affect the quality of the oranges. Finally, the phytochemical profile of the obtained essential oils was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), revealing that the most active oils contained D-limonene, 1,8-cineole, terpineol isomers, and geraniol as their main components. In conclusion, the natural products evaluated in this thesis, derived from native plant species, effectively control certain *citrus* pathogens both *in vitro* and during the postharvest stage.

**Keywords**: Natural products, Native Species, Fungicides, Postharvest, *Citrus*.

**Introducción general, Hipótesis, Objetivos y Esquema de la Tesis**

Los cítricos forman parte de la familia botánica Rutaceae, la cual está compuesta por alrededor de 160 géneros que incluyen más de 1600 especies, que comprenden esencialmente árboles o arbustos adaptados a las regiones tropicales y subtropicales. Son cultivos frutales muy apreciados en todo el mundo (Talón *et al*., 2020). China, Brasil y Estados Unidos son los mayores productores de cítricos, seguidos por México, India y España (Ma *et al*., 2020).

Los cítricos representan una parte importante de la dieta diaria, son populares en todo el mundo y se consumen principalmente como frutas frescas o procesados en jugos y mermeladas (Ma *et al*., 2020). El jugo de naranja (*Citrus sinensis*) es la bebida de jugo preferida en todo el mundo, su aceite esencial natural es utilizado comercialmente para dar sabor a alimentos, productos de tocador, cosméticos y perfumes; esto se debe a que los cítricos presentan una mezcla compleja en bajas concentraciones de compuestos volátiles (Wang *et al*., 2020).

Los cítricos también son beneficiosos para la salud humana por la amplia gama de compuestos que poseen (Lv *et al*., 2015). Los fitoquímicos de los cítricos, especialmente los flavonoides y los carotenoides, tienen una amplia gama de actividades farmacológicas y juegan un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estilo de vida (Ma *et al*., 2020). En particular, las naranjas son una excelente fuente de ácido ascórbico (vitamina C), que es un poderoso antioxidante y adecuado para la salud humana (Ma *et al*., 2020).

Las frutas son organismos vivos que se mantienen a humedades relativas altas para protegerlas de la deshidratación y de la pérdida de peso (Belay *et al*., 2019). El transcurso de la vida comercializable se ve afectada por la temperatura, humedad relativa, composición de la atmósfera durante y después de la cosecha, entre otras condiciones. Las frutas son susceptibles a infección por diversos microorganismos e insectos (Shuping y Eloff, 2017); es por ello que deben prepararse adecuadamente y someterse a tratamientos poscosecha adecuados para soportar un transporte y almacenamiento prolongados que pueden exceder la tolerancia fisiológica a estas condiciones extremas (Zacarias *et al*., 2020). En esta etapa de poscosecha, se pueden presentar diferentes enfermedades si no se realiza un adecuado acondicionamiento.

Las enfermedades de poscosecha, son aquellas alteraciones provocadas por factores bióticos. En el caso de los cítricos, estas suelen ser causadas por hongos filamentosos (Zacarias *et al*., 2020; Dean *et al*., 2012).

Los hongos fitopatógenos infectan la fruta a través de heridas en la cáscara o lesiones ocasionadas durante la cosecha, el transporte y el manejo de poscosecha. Los agentes más

importantes desde el punto de vista económico por las pérdidas cuantiosas que producen son los denominados patógenos de heridas constituidos por los mohos verde y azul (*Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. y *Penicillium italicum* Wehme), respectivamente (Figura 1.A y 1.B); *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris), que causa la podredumbre amarga (Figura 1.C); *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. y *Mucor piriformis* A. Fisch, que causan la pudrición por *Rhizopus* y de Mucor, respectivamente. Los dos últimos patógenos son similares y se conocen comúnmente como podredumbre blanda o podredumbre acuosa (Dean *et al*., 2012).

**Figura 1: A**. Fruta cubierta de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc (Moho verde) y en menor proporción por *Penicillium italicum* Wehmer (Moho azul); **B.** *Penicillium italicum* Wehmer (Moho azul); **C.** *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) (Podredumbre amarga).

Otros patógenos de poscosecha importantes, llamados patógenos latentes, infectan la fruta en el campo durante la temporada de crecimiento y permanecen latentes o inactivos hasta que reanudan su crecimiento después de la cosecha. Las principales especies de este grupo incluyen: *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. y *Phomopsis citri* H.S. Fawc., que causan las enfermedades conocidas como pudriciones del pedúnculo; *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., que causa la antracnosis; *Phytophthora* spp., que causa la podredumbre parda; *Alternaria* spp., que causa la mancha marrón; y *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., que causa el moho gris (Zacarias *et al*., 2020). Otros patógenos latentes poco frecuentes son *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Fusarium oxysporum* Schltdl., y *Trichothecium roseum* (Pers.) Link (Smilanick *et al*., 2006).

*Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*) es un patógeno que causa la enfermedad conocida como mancha negra y puede manifestarse tanto a campo como en la poscosecha. El hongo puede multiplicarse sobre frutos secos, hojas y ramas de la planta y en hojas caídas en el suelo. Las lesiones afectan únicamente la piel del fruto, no alteran la calidad del jugo. La mancha negra, además de provocar la caída del fruto, le otorga un aspecto

manchado (Figura 2), lo que dificulta su comercialización en el mercado fresco. Se trata de una enfermedad cuarentenaria y, por tanto, los frutos de zonas contaminadas no pueden exportarse a zonas libres de la enfermedad (Silva Júnior, 2019).

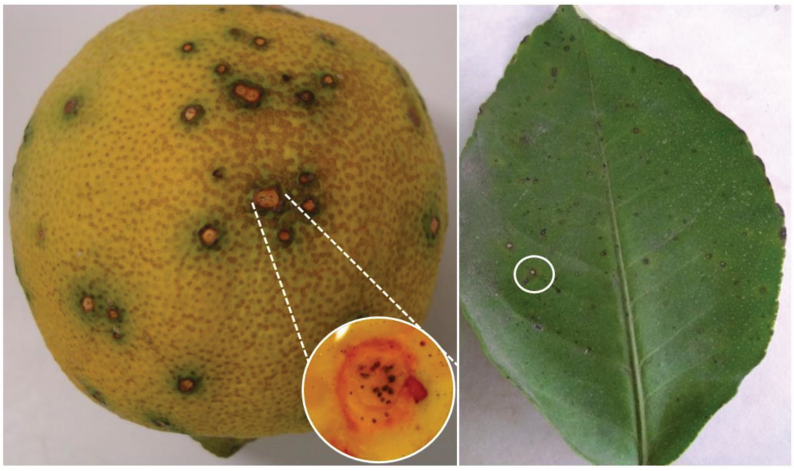


**Figura 2**: Síntoma típico de mancha negra (*Phyllosticta citricarpa*) en frutos y hojas de limonero. En detalle se observa una ampliación de los picnidios que conforman el signo del patógeno.

Las pérdidas económicas por las enfermedades de almacenamiento podrían exceder a aquellas causadas a campo (Harvey, 1978). En países desarrollados, esta pérdida puede representar hasta el 25%; en tanto que en los países en desarrollo es a menudo más alta, excediendo el 50% (Eckert y Ogawa, 1985; Priyadarshi *et al*., 2020).

Para prevenir las infecciones de hongos fitopatógenos, se requiere un amplio conocimiento de la epidemiología de las principales enfermedades que pueden manifestarse a campo y sus estrategias de manejo, así como una cuidadosa manipulación de las frutas durante la cosecha y almacenamiento, y la aplicación de medidas de higiene en los galpones de empaque. Las reducciones de las enfermedades en frutas, se realizan principalmente utilizando fungicidas (Tripathi y Dubey, 2004). El uso reiterativo en el campo y en los galpones de empaque de ciertos fungicidas como los benzimidazoles o estrobilurinas, tienden rápidamente a generar resistencia en los patógenos (Agostini, 2008; Whiteside, 1980; Stammler *et al*., 2013; Hincapie *et al*., 2014).

Por otro lado, a pesar de la eficacia de las medidas preventivas de limpieza y desinfección de equipos e instalaciones para la reducción de la población patógena, es la propia fruta la que generalmente llega contaminada del campo, por lo que se hace necesario realizar tratamientos dirigidos a controlar de forma activa las podredumbres mediante productos químicos. No obstante, en ambientes donde se ha hecho un uso continuo de ellos, se han

observado incrementos en las poblaciones de los patógenos, capaces de resistir las dosis comerciales de estos fungicidas, provocando una pérdida en la efectividad comercial del producto (Delgado *et al*., 1997; Lado y Pérez, 2009).

Investigar y experimentar nuevas técnicas que mejoren la calidad de las frutas frescas para mercado interno o para la industria y especialmente la destinada a exportaciones, es una prioridad fundamental para el desarrollo frutícola de nuestro país, sobre todo si contribuyen a mantener muy bajo el grado de contaminación ambiental. En este contexto, una de las defensas más importantes de las plantas, es la producción de metabolitos secundarios que poseen un amplio rango de actividades biológicas. Los productos naturales de plantas ofrecen un conjunto de agentes antifúngicos estructuralmente diferentes que podrían representar una alternativa a los fungicidas sintéticos para el control de hongos fitopatógenos (Singh *et al*., 2003). Estos compuestos son selectivamente activos frente a distintas especies fúngicas, biodegradables, y potencialmente adecuados para ser usados como agroquímicos en programas integrados de control de enfermedades (Kim *et al*., 2004).

## Hipótesis y objetivos de trabajo

### Hipótesis

Los productos naturales provenientes de plantas nativas controlan a patógenos de cítricos en la etapa de poscosecha.

### Objetivo general

Evaluar potenciales fungicidas naturales como alternativas al uso de productos de síntesis en la poscosecha de cítricos, a través del uso de extractos o aceites esenciales vegetales que resulten ambientalmente amigables.

### Objetivos específicos

1) Aislar y caracterizar morfológica y molecularmente las cepas fúngicas que provocan mayores pérdidas económicas en la industria citrícola del Litoral.

2) Obtener extractos y/o aceites esenciales de las especies vegetales nativas seleccionadas, utilizando solventes de distintas polaridades y métodos extractivos que aseguren la extracción diferencial de todos sus metabolitos secundarios bioactivos.

3) Evaluar la capacidad antifúngica "*in vitro*" de todos los productos naturales obtenidos, frente a las especies de hongos fitopatógenos aislados previamente.

4) Evaluar la capacidad antifúngica en modelos "*in vivo*" de aquellos productos que resultaron activos en la etapa "*in vitro*" y determinar su influencia en los parámetros de calidad de los frutos.

5) Caracterizar químicamente los aceites esenciales activos, con el fin de detectar los compuestos responsables de la actividad antifúngica.

**Esquema de la tesis**

Con el fin de responder a los objetivos mencionados, el presente trabajo se organizó de la siguiente manera:

En el capítulo I se analizó la situación actual de la producción mundial, sudamericana y nacional de naranjas. Para ello, se realizaron regresiones de los datos obtenidos de fuentes internacionales y nacionales. Se describió el aislamiento y caracterización de los patógenos fúngicos que provocan las mayores pérdidas económicas en la poscosecha de naranjas. Además, se realizó la identificación morfológica y molecular de los patógenos y el depósito de las cepas en el CEREMIC (Centro de Referencia en Micología de la UNR). Se analizaron los principios activos de síntesis química recomendados actualmente, y los casos correspondientes de resistencias reportadas en cultivos varios y en los de interés (naranjas).

En el capítulo II se describió la selección, recolección e identificación de las especies vegetales a evaluar. También, se explicaron las técnicas extractivas para la obtención de los productos naturales de distinta naturaleza química que fueron evaluados por su capacidad fungicida.

En el capítulo III se describió la evaluación *in vitro* de los productos naturales obtenidos de las especies vegetales seleccionadas. Se utilizaron distintos bioensayos de acuerdo a la naturaleza química de cada producto, utilizando controles positivos (de crecimiento) y negativos (de inhibición con fungicidas comerciales).

En el capítulo IV, se informó la capacidad fungicida *in vivo* en poscosecha de aquellos productos naturales que resultaron más activos en la evaluación *in vitro*. Se evaluaron parámetros de calidad de las frutas tratadas con los fungicidas alternativos.

Finalmente, en el capítulo V, se describió la caracterización química de los aceites esenciales que presentaron mayor actividad fungicida en las etapas anteriores. Se utilizaron técnicas de CG-EM y se analizaron los perfiles químicos.

Cada capítulo contiene una breve introducción, la metodología aplicada, los resultados obtenidos y las respectivas discusiones y conclusiones. Al final de la tesis se incorpora una discusión general y conclusiones.

# Capítulo I: Caracterización productiva de naranjo. Identificación de los hongos fitopatógenos en estudio y su resistencia a fungicidas

## Introducción

### Producción nacional e internacional de cítricos

Los cítricos (Rutaceae) se cultivan en más de cien países y sus frutos son ampliamente consumidos en todo el mundo.

A nivel mundial, los cítricos son los frutales de mayor producción y comercialización; las naranjas representan 47.215.000 toneladas, los limones 9.557.000 toneladas, las mandarinas 32.871.000 toneladas y los pomelos 6.992.000 toneladas. La producción de frutos cítricos es liderada por China y le siguen en orden de importancia Brasil, Estados Unidos, España, México Turquía y Argentina (Federcitrus, 2022).

En cuanto al mercado de exportación de frutas frescas, Argentina cuenta con la ventaja de producir en contra estación respecto al hemisferio norte, donde se encuentran los países de mayor demanda, pero a su vez de mayor exigencia en calidad e inocuidad alimentaria. Otros países productores y exportadores del hemisferio sur son Sudáfrica, Australia, Uruguay, Chile, Bolivia y Perú (Federcitrus, 2022).

Las principales zonas de producción a nivel nacional son el noreste (NEA) constituida por las provincias de Entre Ríos, Misiones, Corrientes, Buenos Aires y Formosa; y el noroeste (NOA) integrada por las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca. La localización de la producción citrícola Argentina se encuentra en el NEA (35,13%) y en el NOA (64,87%). La especie de mayor producción es el limón (2.062.000 tn) localizado en su mayoría en la provincia de Tucumán. El segundo cultivo en el país es el de naranjas (1.038.168 tn) y el tercero es el de mandarinas (421000 tn), ambas especies son de importancia en Entre Ríos y Corrientes, ocupando cada una de ellas una superficie cercana a las 20.000 ha. En cuarto lugar, se encuentra el cultivo de pomelo (115000 tn) que es significativo en Salta y Formosa (Federcitrus, 2022).

La producción del sector citrícola argentino genera un valor económico de aproximadamente 1119 millones de dólares anuales, considerando mercado interno y exportación; de los cuales el 53% corresponden a frutas frescas, el 13% a jugos concentrados, el 14% a los aceites esenciales y el 20% a cáscara (INDEC, 2022).

Los cítricos producidos en Argentina se comercializan en más de 50 mercados, siendo los principales: Países Bajos (19,56%), Rusia (18,69%) y Estados Unidos (17,95%) (FEDERCITRUS, 2022).

En cuanto a la región central del país, la producción se localiza en el sector limítrofe entre las provincias de Buenos Aires y Santa Fe (San Pedro, San Nicolás, Ramallo y Baradero). Si bien su importancia nacional es poco significativa, presenta ventajas comparativas como la cercanía a los grandes mercados consumidores (Buenos Aires, Rosario, Santa Fe y Córdoba) y posee muy buena infraestructura comercial (rutas, autopistas, galpones de empaque). Como desventaja, constituye un área de riesgo por heladas que pueden comprometer la calidad de la fruta y la vida de la planta (Palacios, 2005).

La importancia de la actividad está dada no solo por la superficie que ocupa sino por el nivel tecnológico desarrollado, las industrias instaladas, la generación de empleo, la cantidad de galpones de empaques y las empresas exportadoras (MCBA, 2018).

El productor obtiene mayor rentabilidad en el mercado de exportación; es el mercado más exigente en cuanto a la calidad de fruta, siendo una condición necesaria para poder producir y vender (MCBA, 2018). Es por ello que el manejo de poscosecha trata de lograr frutos con la más alta calidad, aumentando su vida poscosecha y reduciendo las pérdidas de producción, obteniendo frutos comercialmente aptos (Palou, 2014).

**Principales patógenos que afectan la producción cítrica a campo y en la poscosecha**

Los hongos son microorganismos que habitan en diferentes ambientes como suelo, plantas, fuentes de agua y alimentos (Maheswari y Komalavalli, 2013; Sartori *et al.*, 2013). Existen numerosas especies de hongos responsables de pérdidas en poscosecha de frutas y verduras (Udoh *et al*., 2015) de las cuales sólo el 5-13% del total han sido caracterizadas (Maheswari y Komalavalli, 2013). Es por ello, que es importante el reconocimiento e identificación de más especies, para realizar controles biológicos, ecológicos, así como también, tener en cuenta aspectos industriales (Blackwell, 2011). Las identificaciones morfológicas y bioquímicas de los hongos requieren de tiempo y de gran habilidad. La generación de varios morfo/biotipos dentro de una especie, podría generar una designación incorrecta debido a que los patógenos pueden presentar alta variabilidad intraespecífica o comprender especies crípticas que pueden diferir fuertemente de la especie supuesta (Al-Fadhal *et al*., 2018). Por lo cual, además del uso de la identificación morfológica, es necesaria la identificación molecular que puede proveer alta especificidad para distinguir entre las especies y subespecies de hongos, a diferencia de las pruebas morfológicas y bioquímicas utilizadas en el diagnóstico de laboratorio (Saad *et al*., 2004). Las técnicas de identificación molecular basadas en el análisis estandarizado de fragmentos de ADN cortos y de fácil amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proporcionan un código de barras único para la determinación e identificación de diferentes aislamientos fúngicos hasta un nivel de especie (Landeweert *et al*., 2003).

En el cultivo de los cítricos se consideran de importancia económica las pérdidas poscosecha producidas por origen fitopatógeno (aproximadamente el 30% de la producción). Los mohos verdes y azules, causados por *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. y *Penicillium italicum* Wehmer, respectivamente, y la podredumbre ácida causada por *Geotrichum citri-aurantii* Ferraris, son las enfermedades de poscosecha de mayor importancia económica, ya que afectan no solo a la cantidad sino también a la calidad de los frutos cítricos que, una vez infectados, deben desecharse del lote de producción (Smilanick *et al.,* 2008; Palou, 2014). Además, *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa es un hongo de suma importancia para el área citrícola, ya que es el responsable de la enfermedad denominada Mancha Negra de los Cítricos (MNC). Este patógeno produce manchas en las hojas y en los frutos, con la consecuente depreciación de la misma, aunque las pérdidas más importantes surgen de las restricciones cuarentenarias impuestas por el mercado internacional. Debido a que *P. citricarpa* está clasificada como una enfermedad cuarentenaria por la Unión Europea, esto significa que no está permitido el ingreso de fruta infectada a dicha región, lo cual causa importantes pérdidas económicas a los países exportadores de fruta fresca (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002; Kotzé, 2000).

A continuación, se realiza una breve descripción de los hongos fitopatógenos mencionados anteriormente, los cuales son objeto de estudio en esta tesis.

***Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc.**

El género *Penicillium* pertenece a la familia Aspergillaceae, orden Eurotiales (Mycobank, 2022) causante del moho verde de las naranjas y cítricos en general, es uno de los hongos que mayores pérdidas económicas produce, tanto luego de la cosecha como durante el tiempo de estantería de la fruta (Delgado *et al*., 1997; Lado y Pérez, 2009). Este patógeno ingresa por heridas, causando infecciones dentro de las 48 h a temperaturas óptimas de 20 a 25 ºC (Eckert y Eaks, 1989) (Figura 3). Los conidios son producidos en grandes cantidades, se dispersan con el viento y generalmente son muy abundantes en los empaques y también en los huertos (Palou *et al.,* 2008). Por ello, la contaminación con este hongo puede presentarse en el campo, estando todavía el fruto en el árbol, durante la cosecha y transporte, en el empaque, o durante el período de distribución y venta en los mercados (Tuset, 1987).

La especie *P. digitatum* crece rápidamente en agar de extracto de malta (AEM) y agar papa dextrosa (APD) en forma de colonias planas. El anverso de la colonia es de color verde oliva y el reverso incoloro a amarillo crema, de textura aterciopelada. El hongo puede germinar en medios artificiales a 25 °C y, en algunos casos, puede producir colonias de hasta 3 mm de diámetro. No hay crecimiento a 37 °C (Palou, 2014).

***Penicillium italicum* Wehmer**

*P. italicum* es el causante del moho azul de las naranjas y cítricos en general, también produce grandes pérdidas y se han encontrado biotipos resistentes a los fungicidas comerciales (Delgado *et al*., 1997; Lado y Pérez, 2009). Tal como ocurre con *P. digitatum*, los conidios se dispersan con el viento y generalmente son muy abundantes en los empaques y también en los huertos (Palou *et al.,* 2008). La infección ocurre a través de heridas en la cáscara de la fruta y se desarrolla en 48 h a temperaturas óptimas de 20 a 25 °C (Plaza *et al.*, 2003; Palou *et al.*, 2008). Las colonias crecen rápidamente AEM y APD a 25 °C, son planas, con muchas esporas de color azul o gris verdoso y el reverso es incoloro o gris a marrón amarillento. El aparato conidial consta de cadenas enredadas de conidios, los conidióforos se originan en el sustrato u ocasionalmente en hifas superficiales (Palou, 2014).

*P. digitatum* y *P. italicum* generan podredumbres blandas; la zona afectada se agranda rápidamente y luego se observa el signo del hongo, conformado por micelio blanco que se cubre con esporas verdes o azules, según la especie. Finalmente, la fruta colapsa formando una masa de tejidos descompuestos y húmedos (Figura 3).

***Geotrichum citri-aurantii* Ferraris**

El género *Geotrichum* pertenece a la familia Dipodascaceae, orden Saccharomycetales (Mycobank, 2022). *G. citri-aurantii* causa podredumbre ácida, agria o amarga; este hongo vive en tejidos de plantas muertas o suelos de huertas y puede causar enfermedades en las frutas. Los síntomas incluyen maceración y desintegración de la cutícula y pulpa de la fruta. Una vez que los frutos se pudren, generan un fuerte olor a fermentado y rancio (Eckert y Eaks, 1989; Ogawa *et al*., 1995). La podredumbre ácida, es un grave problema en la poscosecha de los cítricos; las infecciones por este patógeno se originan principalmente a través de las heridas en la superficie de los frutos durante la recolección o posteriormente en el manejo poscosecha (Liu *et al.*, 2010; Feng *et al*., 2011) y están directamente relacionada con las precipitaciones y humedad del suelo en las distintas áreas citrícolas. Si se presentan condiciones de alta humedad, aparece un micelio blanco muy delgado sobre los frutos, constituyendo éste el signo de la enfermedad (Torres Leal y Ramallo, 1996) (Figura 3).

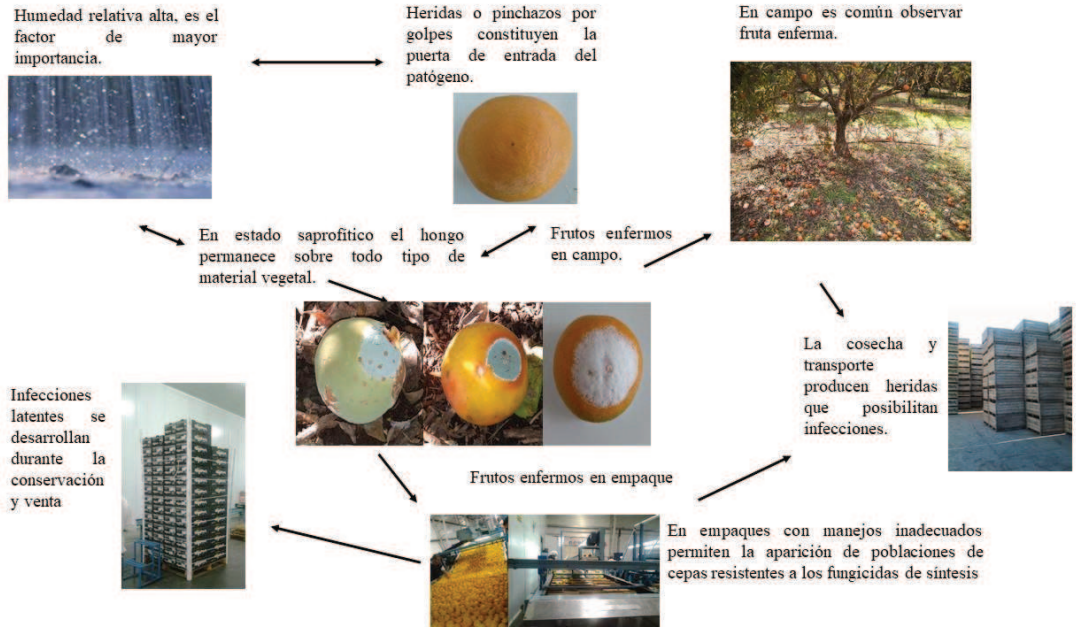



**Figura 3**: Aspectos generales del ciclo de las podredumbres causadas por *Penicillium* spp. y *G. citri-aurantii*.

***Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa**

El género *Phyllosticta* pertenece a la familia Phyllostictaceae del orden Botryosphaeriales (Mycobank, 2022). *P. citricarpa* es un patógeno causante de la mancha negra de los cítricos, una de las enfermedades fúngicas más importantes a nivel mundial en regiones húmedas de África, Asia, Oceanía y América (Kotze, 2000). El período crítico para la infección comienza con el establecimiento de los frutos y dura por 4 ó 5 meses. Las lesiones que produce son diversas. La mancha típica es el síntoma más común, caracterizado por lesiones necróticas deprimidas de color amarronado, con un borde oscuro, y generalmente con picnidios en su interior. Otros tipos de síntomas que pueden encontrarse son: la falsa melanosis, la mancha rojiza y castaña, y la mancha virulenta. En las hojas pueden producirse los síntomas de falsa melanosis y mancha virulenta (Kotze, 2000; Silva Jr. *et al.*, 2016). Si los síntomas aparecen tempranamente, causa caída prematura de frutas y pérdidas de rendimiento, principalmente en limoneros y naranjas tardías (Kotze, 2000; Spósito *et al*., 2007). Por lo general, los síntomas aparecen luego de un período de latencia, durante la maduración de los frutos o posteriormente en la poscosecha y transporte (Agostini *et al*., 2006; Peres *et al*., 2007). Por lo tanto, los frutos provenientes de países en los cuales la mancha negra es endémica, representan un riesgo de introducción del patógeno a nuevas áreas, y tanto la Unión Europea como los Estados Unidos imponen restricciones cuarentenarias a la importación de fruta fresca desde estos países (Agostini *et al*., 2006; SENASA, 2006). En la Figura 4 se resume el ciclo de la enfermedad.

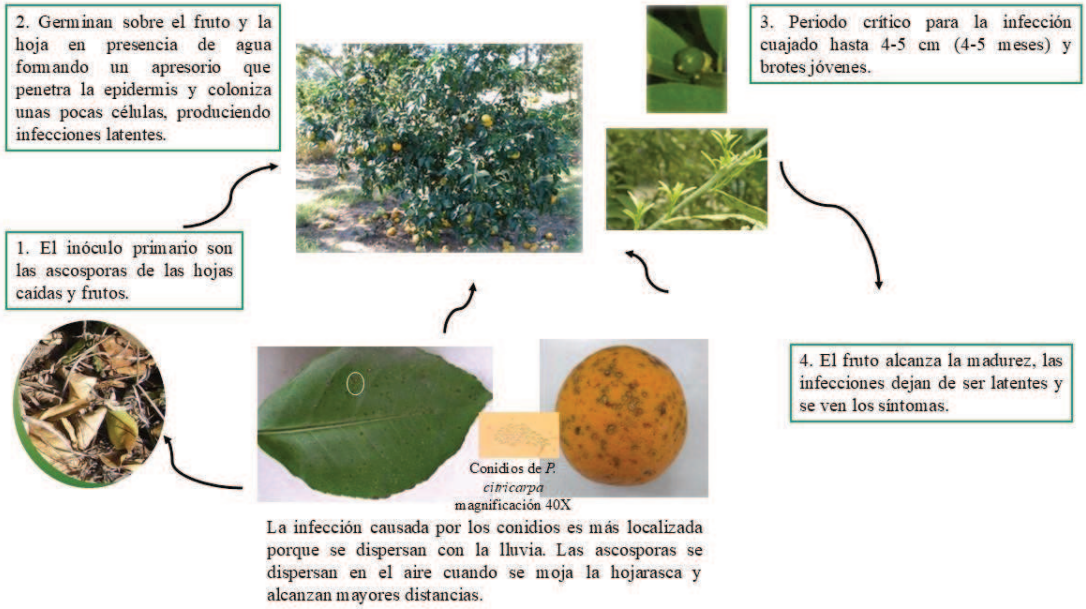



**Figura 4**: Aspectos generales del ciclo biológico de *P. citricarpa*.

La exigencia de productos de calidad y sanidad garantizada es cada vez mayor e impacta directamente en la apertura o cierre de los mercados. Además, la preocupación pública sobre la inocuidad de los alimentos, ha aumentado el interés por encontrar alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de enfermedades en frutas. Consecuentemente, han avanzado distintas y prometedoras vías que incluyen: uso de compuestos antifúngicos naturales, tratamientos con calor (utilizando baños de agua caliente y curado), modificaciones forzadas de temperatura (altas o bajas), luz UV, utilización de productos químicos de baja toxicidad como carbonato y bicarbonato sódico, ozono, aceites esenciales y péptidos antimicrobianos, así como la combinación de varios de ellos entre sí (Chalutz y Wilson, 1990; D' Hallewin *et al*., 2005; El Ghaouth *et al*., 2004).

Debido a todo lo antes expuesto, en este capítulo se realizó la caracterización productiva de la industria citrícola, el aislamiento, la caracterización morfológica y molecular para la correcta identificación de los hongos fitopatógenos de naranjas, además se exploró las principales medidas de protección utilizadas para su control según los manuales fitosanitarios.

## Materiales y Métodos

### Análisis de la producción citrícola

Se realizó la búsqueda de información referida a la producción mundial, sudamericana y nacional de naranjas, teniendo en cuenta la base de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT). Se realizaron las diferentes regresiones desde el año 1961 hasta el año registrado 2016, de rendimiento y superficie cosechada a nivel mundial, sudamericano, y en el caso de la información nacional, se reporta el período 1980-2016.

Además, se presentaron los datos recolectados de las importaciones y exportaciones nacionales desde el año 2000 hasta el último registro 2021 de la base de datos UNSTATS (Department of Economic and Social Affairs Statistics).

**Aislamiento, caracterización y depósito de cepas fúngicas**

El aislamiento de *Penicillium digitatum, Penicillium italicum*, *G. citri-aurantii* y *Phyllosticta citricarpa* se realizó a partir de frutas que presentaban síntomas característicos de cada enfermedad causados por los distintos hongos. En el caso de las podredumbres se eligieron especialmente aquellas piezas que presentaban áreas de micelio reproductivo característico. Luego se realizó un raspado superficial del micelio aéreo con un ansa estéril y se repicó en placas conteniendo APD (Agar-Papa Dextrosa). En el caso de *P. citricarpa* se obtuvieron picnidios con anza de aguja esteril a partir de manchas típicas y se sembraron en AVA (avena-agar). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente hasta la producción de conidios. A partir de los cultivos obtenidos se realizaron aislados monospóricos mediante técnica de transferencia de un conidio germinado. Los mismos se conservaron en papel de filtro deshidratado con sílica gel en el freezer a -20 ºC y se depositaron en la colección micológica del CEREMIC, UNR y del ICiAgro Litoral, UNL, CONICET, FCA para posteriores ensayos.

**Identificación molecular**

***Extracción de ADN***

Se colocó parte de micelio en crecimiento en APD de cada hongo en un tubo eppendorf (aproximadamente un volumen de 200 µL). Se agregó 400 µl de buffer de lisis constituido por: 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,5% SDS y 25 mM EDTA + 10% NaOH; y se lo llevó al menos por dos horas al freezer (-20 °C). La preparación se incubó a 65 °C por 30 minutos y luego se agregaron 300 µL de NaCl 1 M. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa superior y se añadió un volumen de isopropanol y se colocó nuevamente en freezer (-20 °C), al menos durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 8 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante. El pellet se dejó secar por al menos 2 horas a temperatura ambiente. El ADN obtenido se resuspendió en 100 µl de buffer TE

(10 mM de Tris HCl pH 7,4 y 1 mM EDTA pH 8). 1) PCR. Posteriormente a la extracción de ADN, de acuerdo al patógeno a identificar, se amplificó la región del espaciador transcrito interno del ADN ribosomal (ITS-rDNA, del inglés *internal transcriber spacer*) utilizando los cebadores ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.,* 1990). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne TC-312 (Techne, Cambridge, Reino Unido) en mezclas de reacción de 20 µl que contenían 1× PCR buffer, 2,5 mM MgCl2, 0,4 µM de cada primer, 0,2 mM dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerasa (PB-L, Productos Bio-Lógicos®, Argentina) y 100 ng de ADN genómico.

Además de las muestras de los patógenos fúngicos en estudio, se incluyó un control negativo para detectar posibles contaminaciones. Este control contenía todos los componentes de la PCR excepto el ADN fúngico que se reemplazó con agua desionizada. La amplificación se realizó en un termociclador bajo las condiciones detalladas en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Condiciones del termociclador.

| Fase | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---|---|---|---|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 5 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 94 °C | 30 segundos | 34 |
| Hibridación | 57 °C | 30 segundos | 34 |
| Extensión | 72 °C | 1 minuto | 34 |
| Extensión final | 72 °C | 10 minutos | 1 |
| Espera final | 4 °C | Hasta la corrida de los productos de PCR | |

La visualización de los productos amplificados se hizo a través de su migración en geles de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium, Hayward, EEUU). La migración se llevó a cabo por electroforesis horizontal en tampón de corrida TAE 1X (Tris-Acetato 40 Mm, EDTA 1 mM) a 90 voltios. Se sembraron directamente en el gel de agarosa 2 µL de los productos de PCR, incluido el control negativo, además de 3 µL del marcador ADN ladder 100pb. Terminada la corrida, el gel se visualizó mediante luz ultravioleta (UV) en un transiluminador Biostep UST30M-8E (Biostep, Jahnsdorf, Alemania) para su documentación fotográfica. Luego, los productos de PCR positivos se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen (Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas disponibles en la base de datos de Genbank, utilizando la herramienta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

**Análisis bibliográfico de fungicidas aplicados a casos relacionados con esta tesis**

Se realizó una búsqueda de funguicidas utilizados en naranjas para los patógenos de poscosecha en estudio. Las fuentes bibliográficas utilizadas fueron la Guía Fitosanitaria de CASAFE y el Manual fitosanitario disponible en forma online, desarrollado por la Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos (CIAFA, 2024). Luego, se contrastó con la Resolución 934-2010 de SENASA y la base de datos realizada por el mismo organismo (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). En relación al límite máximo de residuos (LMR), se utilizó la base de datos de SENASA y del Comité de Codex sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR) con base en las recomendaciones formuladas por la Reunión Conjunta FAO/OMS. Para los principios activos se detalla su código utilizado por la FRAC (Comité de Acción de Resistencia de Fungicidas, Tabla 2), LMR y los primeros casos de resistencia reportados en el cultivo de interés de acuerdo la información compilada por FRAC (https://www.frac.info/).

**Tabla 2**: Lista de Código FRAC utilizados, modo de acción y sinónimos o ejemplos.

| Código FRAC (grupo) | Modo de Acción | Sinónimos, ejemplos |
|---|---|---|
| 1 | Inhibidor del ensamblaje de ß-tubulina en la mitosis/fungicidas MBC. | B1, carbamatos de metilbencimidazol, bencimidazoles, BA y BCM. |
| 3 | Fungicidas inhibidores de la biosíntesis de esteroles (SBI)/ SBI Clase I: fungicidas DMI. | G1, inhibidores de la desmetilación, azoles, triazoles, erg11, cyp51. |
| 11 | Inhibidor de la respiración en el complejo III en sitio-Qo. | C3, quinona fuera de inhibidores, estrobilurinas, gen cyt-b. |
| 12 | Transducción de señales osmóticas. | Fungicidas PP. Fenilpirroles, Fludioxonil, (fenpiclonil). |
| M7 | Productos químicos con actividad multisitio/ Bisguanidinas (disruptores de membrana, disuasorios). | Guanidina |

**Resultados**

**Producción mundial**

La producción mundial de naranjas se realiza en 123 países; el rendimiento obtenido en el año 2016 fue de 15.660.312 (kg/ha). Como se observa en la Figura 5, el análisis del comportamiento de la variable rendimiento mundial en relación a la variable año, fue potencial positivo siguiendo una función $y = 4\times10^{8}\ln(x)-3\times10^{9}$, donde ´y´ refiere al rendimiento en toneladas por hectárea, y ´x´ al año, con coeficiente de

determinación de $R^2$ de 0,9796. El rendimiento en el periodo de años evaluado, aumentó de manera continua.

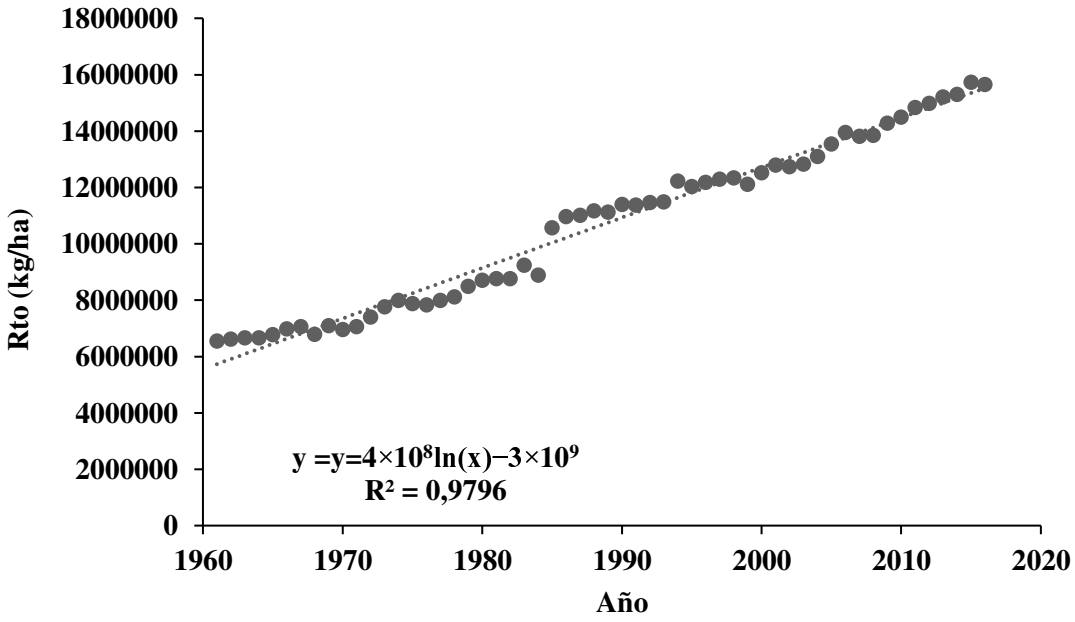



**Figura 5**: Rendimiento mundial de naranjas (serie 1961-2016). Elaboración propia con base de datos FAOSTAT.

La superficie de cosecha mundial de naranjas se encuentra modelizada en la siguiente función $y=1\times10^{8}\ln(x)-9\times10^{8}$ siendo ´y´ el área cosechada en hectáreas y ´x´ los años con un coeficiente de determinación de $R^2$ = 0,9471 (Figura 6), y al igual que para el rendimiento, existe un aumento continuo de superficie cosechada a medida que transcurren los años.

Desde mediados de la década del 60 a la fecha, la producción de naranjas se multiplicó y creció sostenidamente a una tasa acumulada, siendo el cítrico dulce más cultivado a nivel internacional. Respecto al área cosechada, se visualiza que a partir del año 2000 ingresa en una etapa estable y ya hacia el final del periodo (año 2016), se retraen los valores (Figura 6).

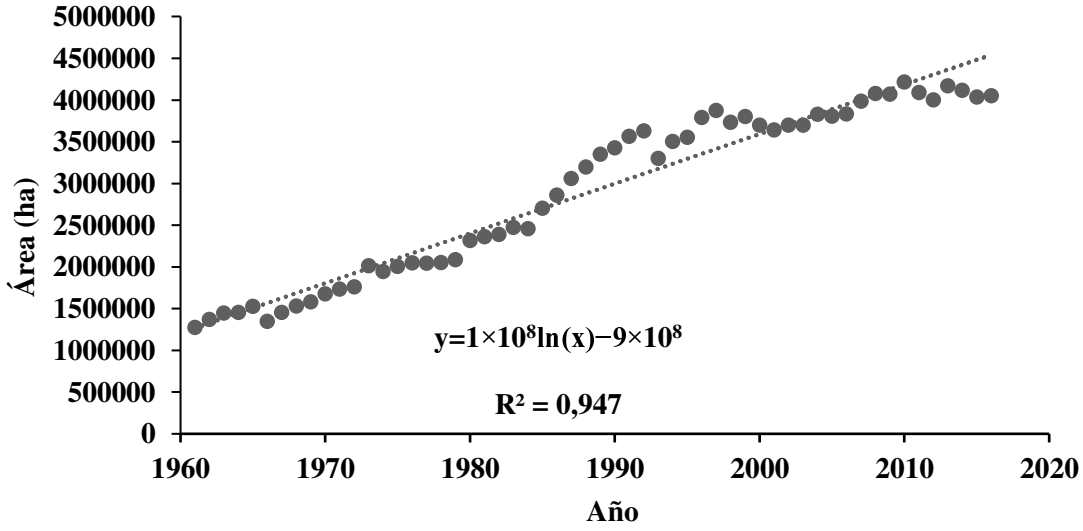



**Figura 6**: Área cosechada mundial de naranjas, serie (1961-2016). Elaboración propia con base de datos FAOSTAT.

**Producción sudamericana**

En la Figura 7, se muestra el comportamiento de la variable rendimiento sudamericano de naranjas en relación a la variable año, resultando la siguiente función y = 18466x - $4\times10^7$ siendo ´y´ la producción en toneladas y ´x´ el año, con un coeficiente de determinación de $R^2$ = 0,8912. La producción sudamericana se incrementó al igual que los principales países productores mundiales.

La superficie cosechada de naranjas (Figura 8), presenta la siguiente función y = 17213x - $3\times10^7$ siendo ´y´ el área cosechada en hectáreas y ´x´ el año, con un coeficiente de determinación es de $R^2$ = 0,6974. Existe un aumento sostenible hasta el año 2000, a partir del cual comienza a disminuir hasta el año 2016.

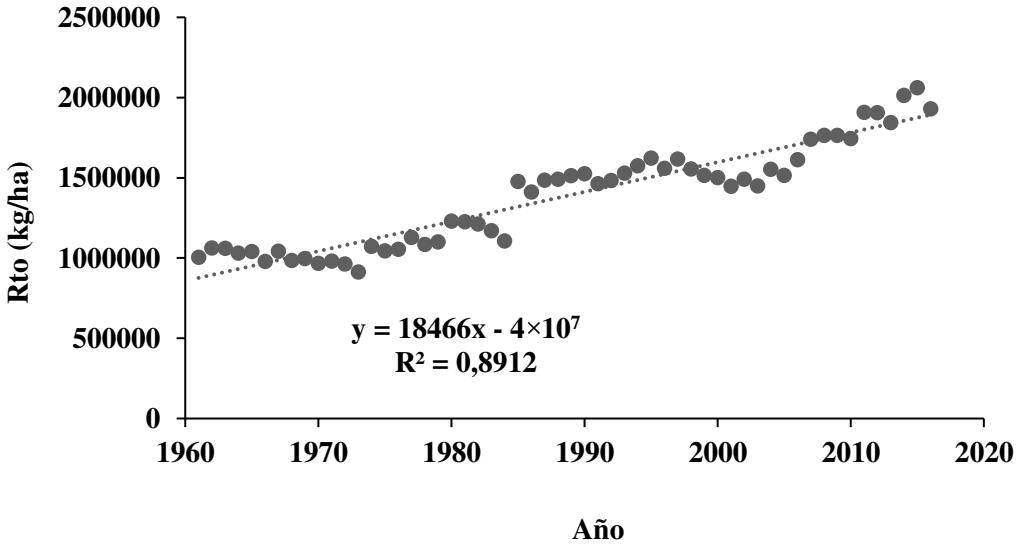



**Figura 7**: Rendimiento sudamericano de naranjas (Serie 1961-2016). Elaboración propia con base de datos FAOSTAT.

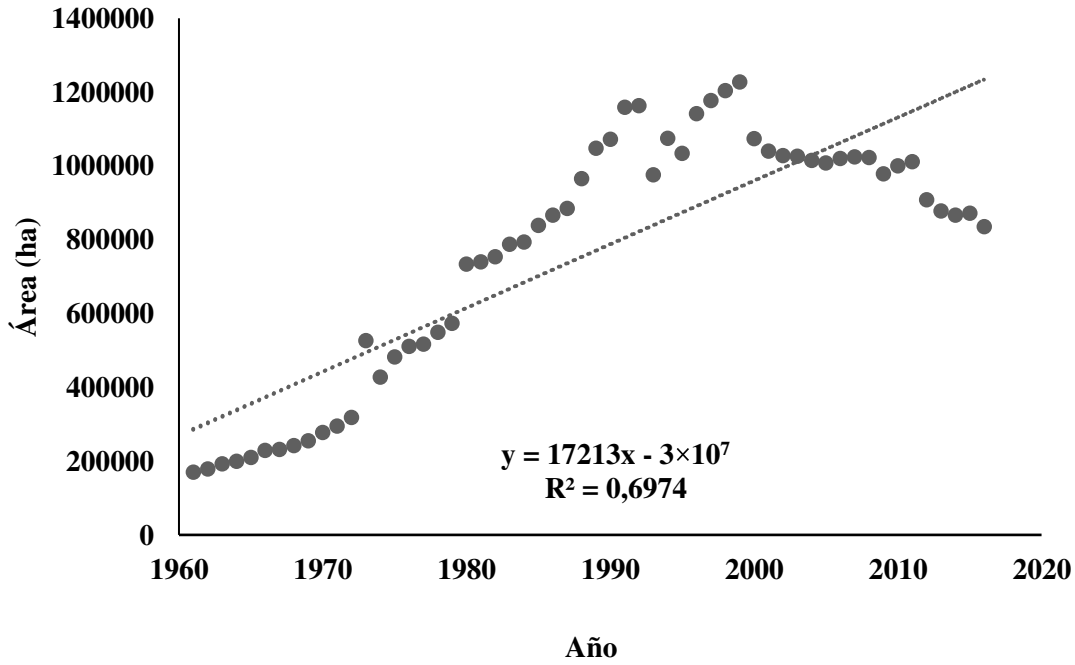



**Figura 8**: Área cosechada sudamericana de naranjas, serie (1961-2016). Elaboración propia con base de datos FAOSTAT.

**Producción nacional**

Los valores del rendimiento en toneladas por hectárea en Argentina desde el año 1980 hasta 2016 se muestran en la Figura 9; siguiendo una función $y = 5\times10^{6}\ln(x)-4\times10^{7}$ siendo ´y´ el rendimiento en toneladas por hectárea, y ´x´ el año con un coeficiente de determinación es de $R^2 = 0,5841$. El rendimiento alcanzado en el año 2016 fue de 215.887 kg/ha, mientras que en el año 1980 alcanzó los 119.728 kg/ha, es decir que los valores aumentaron a nivel nacional.

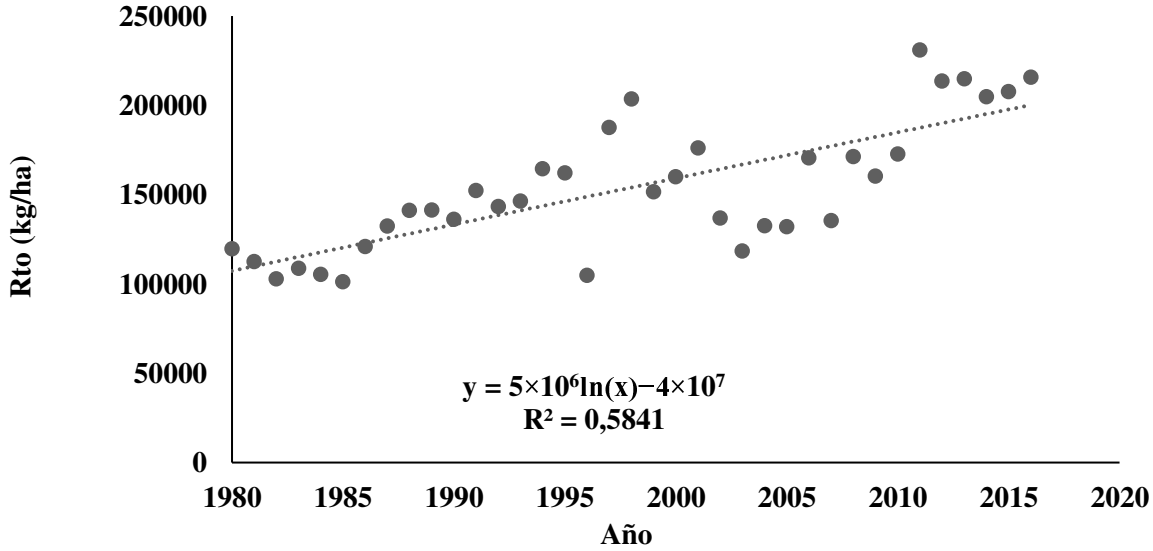



**Figura 9**: Rendimiento nacional de naranjas (Serie 1980-2016). Elaboración propia con base de datos FAOSTAT.

El registro de la superficie cosechada para Argentina, se obtuvo a partir del año 1980 presentando la función y = -144,63x+341061, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,0698$ (Figura 10). El área cosechada alcanzada en el año 1980 fue de 58.800 hectáreas mientras que en el año 2016 fue de 47.823 hectáreas. Se registra la menor superficie en el año 2013 (40.000 hectáreas), mientras que la mayor superficie cosechada se obtuvo en el año 2005 alcanzando las 67.000 hectáreas.

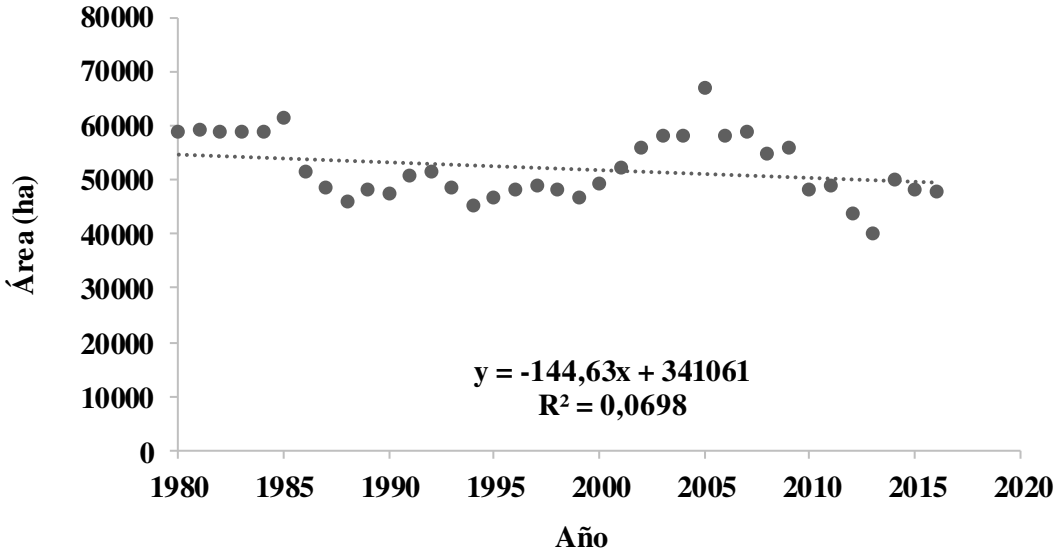



**Figura 10**: Área cosechada nacional de naranjas, serie (1980-2016). Elaboración propia con base de datos FAOSTAT.

La producción nacional de naranjas abastece al consumidor en el mercado interno y externo. En el año 2000, las exportaciones alcanzaron 40.222 tn, mientras que las importaciones no superaron las 12.111 tn (Figura 11). Tal como sucedió con la producción, las cantidades exportadas de naranjas registraron un crecimiento significativo en los últimos 20 años, alcanzando un máximo en el año 2007 (196.925 tn) y un mínimo en al año 2000 (40.222 tn). Respecto a las importaciones, en el año 2000 alcanzaron las 12.111 tn, y a partir de ese año los valores alcanzados fueron inferiores.

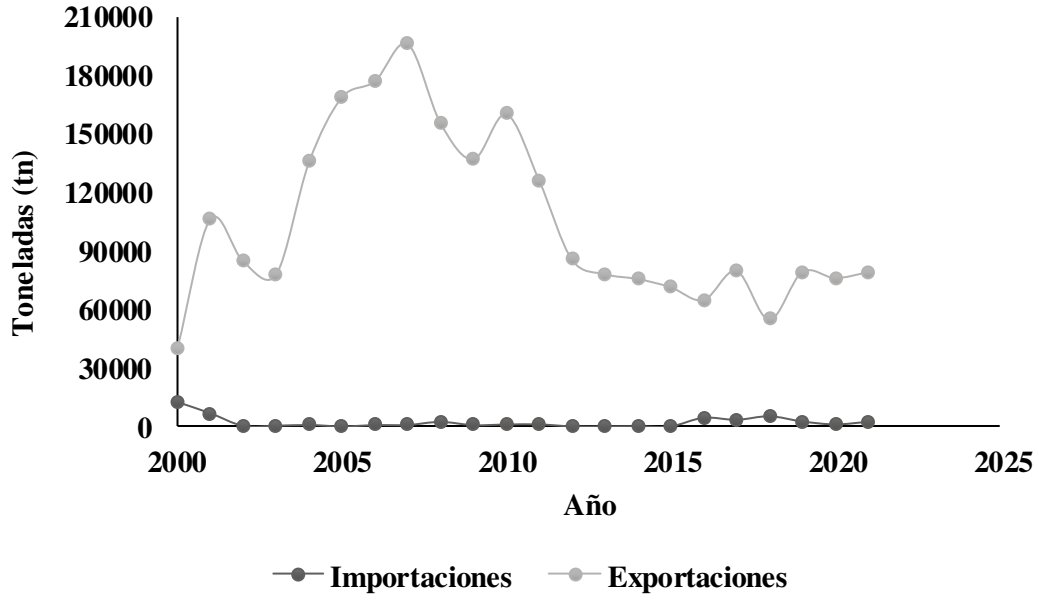



**Figura 11**: Importación y exportación de naranjas frescas serie 2000 a 2020. Elaboración propia con base de datos UNSTATS.

**Caracterización morfológica, depósito y conservación de las cepas fúngicas**

A partir de frutos de naranja con sintomatología típica de las enfermedades en estudio fueron obtenidos cuatro aislamientos fúngicos, los cuales se denominaron NA1, NA2, NA3 Y NA4. Estos aislamientos fueron caracterizados en el Centro de Referencia de Micología (CEREMIC) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FCByF)-UNR y se depositaron con los códigos CCC-5-2019, CCC-102, CCC-101 y CCC 101-2021, respectivamente. En base a las características morfológicas los aislamientos fueron identificados como *Geotrichum citri-aurantii, Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, y *Phyllosticta citricarpa.*

En el laboratorio de Fitopatología del ICiAgroLitoral, UNL, CONICET, FCA se realizaron observaciones adicionales para documentar la morfología de los distintos aislamientos identificados. La Figura 12 muestra los síntomas y signos típicos causados por cada patógeno fúngico en naranjas, las características morfológicas de las colonias desarrolladas después del aislamiento, y las características microscópicas de sus conidios.

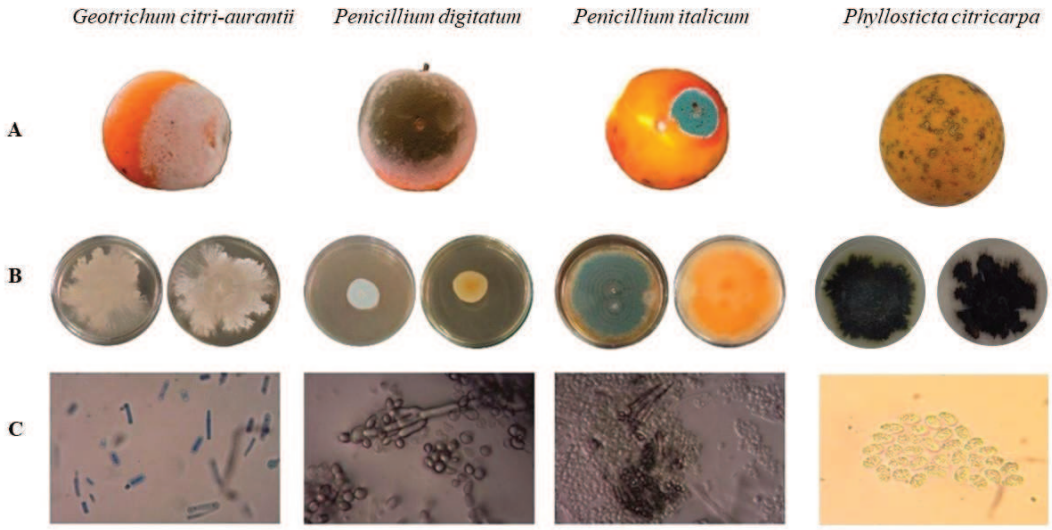



**Figura 12: A.** Síntomas y signos causados por *Geotrichum citri-aurantii*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Phyllosticta citricarpa* en naranja. **B.** Características morfológicas de colonias aisladas caracterizadas morfológica y molecularmente en medios PDA para los tres primeros patógenos y en agar avena para *P. citricarpa*. **C.** Características microscópicas típicas de los conidios observadas con un aumento de 40 ×.

**Identificación molecular**

Para confirmar la identificación morfológica, se extrajo ADN de los cuatro aislamientos en estudio, se amplificó y secuenció con éxito la región ITS. Las secuencias obtenidas para cada aislamiento monospórico fueron comparadas con la base de datos de dominio público NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica; www.ncbi.nih.gov). Los resultados obtenidos a partir de la identificación molecular coincidieron con la identificación morfológica realizada previamente (Tabla 3).

Las búsquedas BLAST revelaron que las secuencias de los aislamientos fúngicos NA1, NA2, NA3 y NA4 presentaron 99,4%, 100%, 100% y 100% de identidad con las cepas previamente caracterizadas de *G. citri-aurantii* GcaCC015 (EU131181), *P. digitatum* Grapefruit PD (MT448740), *P. italicum* AK37 (MK736929), y *P. citricarpa* CBS 127452 (MH864588), respectivamente. Las secuencias de nucleótidos se depositaron en GenBank (Tabla 3).

**Tabla 3**: Identificación de los hongos fitopatógenos, parámetros de identificación molecular. *N° de depósito en CEREMIC (Centro de Referencia de Micología) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FCByF)-UNR.

| | **Identificación morfológica** | **Identificación molecular** | | |
|---|---|---|---|---|
| **Aislado** | **N° depósito** | **Cepa con mayor % de identidad** | **% identidad** | **N° acceso GenBank** |
| NA1 | CCC-5-2019* | *G. citri-aurantii* GcaCC015 (EU131181) | 99.4 | OQ132875 |
| NA2 | CCC-102* | *P. digitatum* Grapefruit PD (MT448740) | 100 | OQ132876 |
| NA3 | CCC-101* | *P. italicum* AK37 (MK736929) | 100 | OQ132876 |
| NA4 | CCC 101-2021* | *P. citricarpa* CBS 127452 (MH864588) | 100 | OR256215 |

**Aplicación actual de fungicidas en los cultivos de interés**

En la Tabla 4 se muestran los fungicidas reportados para el control de *P. italicum*. Existen 6 principios activos autorizados correspondientes a 4 grupos diferentes (código FRAC). Los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos por SENASA son iguales o menores que los establecidos por el CCPR (Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas) a excepción de Tiabendazol (grupo 1). Adicionalmente, el LMR de Carbendazim (grupo 1), no se encuentra reportado por el CCPR.

El tiempo de carencia para el activo Carbendazim es de 7 días, y se deben realizar 2 tratamientos: a los 20 y a los 7 días antes de la cosecha. En cuanto a Tiabendazol, Imazalil, Procloraz y Fludioxonil, se encuentran exentos de período de carencia. En caso de que el cultivo o sus subproductos se destinen a la exportación, deberá conocerse el límite máximo de residuos del país de destino y observar el período de carencia que corresponda a ese valor de tolerancia.

Respecto a Guazatine (grupo M7), se encuentra registrado en el Manual Fitosanitario, no así en la Guía Fitosanitaria de CASAFE.

En relación a los casos de resistencia, existen casos para el grupo M7 (1983), grupo 3 (1982), grupo 1 (1974 y 1981). El grupo 12, no presenta hasta el momento resistencia comprobada contra *P. italicum.*

**Tabla 4**: Principios activos utilizados contra *P. italicum* en naranjas.

| Código FRAC (grupo) | Principio activo | LMR (mg/kg) | LMR CCPR (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | Tiabendazol | 10 | 7 |
| 1 | Carbendazim | 5 | s/d |
| 3 | Imazalil | 5 | 5 |
| 3 | Procloraz | 5 | 10 |
| 12 | Fludioxonil | 10 | 10 |
| M7 | Guazatine | 2 | 5 |

En la Tabla 5 se presentan los fungicidas comerciales reportados para *P. digitatum*. Se hallaron 4 principios activos registrados, de los cuales el grupo 1 se encuentra asociado en mezclas con el grupo 12. Los LMR establecidos por SENASA, son iguales o mayores a los datos en el CCPR establecidos en la normativa internacional, a excepción de Guazatine.

En el caso de la mezcla Azoxistrobina+Fludioxonil (grupos 1 y 12, respectivamente), los LMR establecidos por SENASA son 5 mg/kg y 10 mg/kg para cada uno por separado; y los LMR del CCPR, son 15 mg/kg para azoxistrobina y 10 mg/kg para Fludioxonil.

En cuanto al tiempo de carencia para los diferentes principios activos, Fludioxonil, Tiabendazol, Imazalil, Procloraz y la mezcla Azoxitribona+Fludioxonil, se encuentran exentos; en el caso de exportación deberá conocerse el LMR del país de destino. El principio activo Carbendazim, presenta un tiempo de carencia de 7 días.

El primer caso de resistencia a estos fungicidas fue reportado en 1983 para el grupo 1; para el grupo 3 en los años 1987 y 2014. Respecto al grupo 12 de fungicidas, se reporta resistencia en el año 2008; y para el caso del grupo M7, en el año 1983.

**Tabla 5**: Principios activos utilizados contra *P. digitatum* en naranjas.

| Código FRAC (grupo) | Principio activo | LMR (mg/kg) | LMR CCPR (mg/kg) |
|---|---|---|---|
| 1 | Carbendazim | 5 | s/d |
| 1 | Tiabendazol | 10 | 7 |
| 3 | Imazalil | 5 | 5 |
| 3 | Procloraz | 5 | 10 |
| 1+12 | Azoxistrobina+Fludioxonil | s/d | s/d |
| 12 | Fludioxonil | 10 | 10 |
| M7 | Guazatine | 2 | 5 |

Respecto a *G. citri-aurantii*, se hallaron 3 principios activos correspondientes a 3 grupos diferentes. En la tabla 6 se muestran los fungicidas reportados para su tratamiento. En cuanto a los LMR establecidos por SENASA, para el caso de Guazatine (grupo 3) es menor al establecido por CCPR; y para Carbendazim no se encuentra reportado el LMR por CCPR. Para el principio activo Propiconazole (grupo 3), no se encuentra reportado el LMR (SENASA) ni por el CCPR. El tiempo de carencia para Carbendazim es de 7 días, mientras que Propiconazole se encuentra exento de periodo de carencia, y para el caso de Guazatine no se reporta información.

Los grupos (1, 3 y M7) no presentan hasta el momento casos de resistencias comprobadas, de acuerdo a FRAC (Comité de Acción de Resistencia de Fungicidas), para *G. citri-aurantii*.

**Tabla 6**: Principios activos utilizados contra *G. citri-aurantii* en naranjas.

| **Código FRAC (grupo)** | **Principio active** | **LMR (mg/kg)** | **LMR CCPR (mg/kg)** |
|---|---|---|---|
| 1 | Carbendazim | 5 | s/d |
| 3 | Propiconazole | s/d | s/d |
| M7 | Guazatine | 2 | 5 |

En la Tabla 7 se muestran los fungicidas reportados para *P. citricarpa*. Existen 3 principios activos autorizados correspondientes a un único grupo de fungicidas según el código FRAC. Los LMR establecidos por SENASA son menores que los establecidos por el CCPR.

En el caso del principio activo *Bacillus subtilis*, no se pudo realizar la comparación con los principios activos de síntesis química; al tratarse de un fungicida biológico, no tiene periodo de carencia. El tiempo de carencia para Azoxistrobina y Pyraclostrobina es de 15 días, mientras que Trifloxistrobina se encuentra exenta. En relación a los casos de resistencia, sólo se encontró resistencia en cítricos en el año 1985 para Azoxistrobina.

**Tabla 7**: Principios activos utilizados contra *P. citricarpa* en naranjas.

| **Código FRAC** | **Principio activo** | **LMR (mg/kg)** | **LMR CCPR (mg/kg)** |
|---|---|---|---|
| 11 | Azoxistrobina | 0,5 | 15 |
| 11 | Pyraclostrobina | 1 | 2 |
| 11 | Trifloxistrobina | 0,02 | 0,5 |
| | *Bacillus subtilis* | s/d | s/d |

**Discusión**

Los principales productores de cítricos son China, Brasil y Estados Unidos. En China, la producción se realiza principalmente en superficies pequeñas de cultivos mixtos y se comercializa casi en su totalidad en el país. Brasil se caracteriza por superficies muy grandes, y una gran proporción de su producción se envía para su procesamiento a jugos, que principalmente se exporta a Europa occidental y América del Norte. Existen también pequeños y medianos productores en Brasil que producen fruta fresca para el mercado interno. En el caso de Estados Unidos, la producción se envía para su procesamiento a jugos, y otro destino es para el mercado fresco (Spreen *et al*., 2020).

La naranja es el cítrico dulce más cultivado a nivel global, el aumento de la producción mundial de naranjas se relaciona con el aumento de la superficie de cosecha, ambos comportamientos son exponencial positivo. En una de las últimas campañas (2020/2021), esta fruta representó el 52,6% de la producción mundial. La participación de México en la oferta mundial ha crecido con la disminución de la producción estadounidense (Carciofi *et al*, 2021).

A nivel sudamericano, Brasil produce prácticamente el 50% del jugo de naranja consumido en todo el mundo. En São Paulo, a pesar de las enfermedades de clorosis variegada de los cítricos (CVC) y Huanglongbing (HLB), la combinación de abundante tierra, buenos suelos y suficiente lluvia para permitir una producción razonable, poca amenaza de heladas y menores costos de producción y cosecha, permitieron a Brasil el liderazgo en la producción de naranja dulce (Spreen *et al*., 2020). Argentina presenta un bajo desempeño respecto al resto de los países productores de naranjas. Si bien la producción creció, lo hizo a una tasa bastante inferior que el resto de los países. En mandarinas, el país fue uno de los pocos (junto con Irán) en registrar una caída de la producción. Del mismo modo, la producción de pomelos se redujo a tasas significativas (Carciofi *et al*, 2021).

En cuanto a las exportaciones nacionales, durante el periodo 2009-2021 se reportó un valor promedio de 90.092 tn, valor cercano a lo reportado por Federcitrus (2022) que fue de 91.548 tn en el mismo periodo. En el año 2021, las exportaciones nacionales alcanzaron las 79.314 tn, mientras que de acuerdo a Federcitrus el registro fue levemente superior (87.954 tn). Argentina tiene una importante presencia en el mercado ruso y en la Unión Europea, en especial España y Países Bajos, hacia donde se dirige la mayor parte de sus envíos. Las operaciones comerciales vinculadas a los cítricos con Estados Unidos y China, se limitan a la venta de limones (Fedrecitrus, 2022; Carciofi *et al*, 2021). En cuanto a la temporada de producción, a medida que los países del hemisferio norte ingresan en la temporada estival, la producción desciende y aumenta la de los países del hemisferio sur; es por ello, que los principales

competidores de Argentina son aquellos países que se posicionan en el hemisferio sur, como Brasil, Indonesia, Sudáfrica, Perú y Chile.

En Argentina, los rendimientos dan cuenta de brechas relevantes con respecto a otros países. También existe heterogeneidad entre los productores locales. La región del NOA representa una zona de grandes explotaciones y productores de medianos a grandes, por lo que la mayor tecnificación y las mejores condiciones fitosanitarias de la zona, inciden favorablemente en la productividad. A modo de referencia, en Salta, la explotación media es de 35 hectáreas (INDEC, 2018); mientras que, en la región NEA, esta cifra desciende a 15 hectáreas, dada la mayor participación de pequeños y medianos productores.

Según un estudio realizado por el área de Economías Regionales de la Confederación Argentina de la Mediana Empresa (CAME, 2022) para la producción de naranjas en la localidad entrerriana de Chajarí, hasta su comercialización en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), el productor primario constituye el único eslabón de la cadena de valor de la naranja que no tiene ganancias, además de explicar tan solo el 7,7% del precio que abona el consumidor por un kilo de este cítrico. De acuerdo a este trabajo, la redistribución de la ganancia se concentra principalmente en la comercialización, tanto a nivel mayorista (MCBA), como minorista (verdulería e hipermercados en CABA). Los eslabones vinculados a la producción obtienen rentabilidades negativas o bajas, como también ocurre en el caso del eslabón de empaque.

En Argentina, la adopción de tecnología e infraestructura adecuada, se limitada a unos pocos productores (Tadeo, 2008), no sólo para la expansión de la producción, sino también para el cumplimiento de buenas prácticas agrícolas y manufactureras esenciales para el crecimiento exportador y el desarrollo sostenible de la actividad (Carciofi *et al.*, 2021). Además, teniendo en cuenta el aspecto ambiental, un tema clave es el incremento en el uso de agroquímicos por los problemas sanitarios y el objetivo de aumentar la productividad y la disposición final de los residuos que se generan en la producción primaria, el tratamiento en la postcosecha, y durante el proceso de empaquetamiento, aspectos a tener en cuenta desde la dificultad de aplicar la circularidad en la producción.

Tradicionalmente, la mayoría de los hongos fitopatógenos han sido identificados en base a características morfológicas y fisiológicas, tales como forma y tamaño de conidios y apresorios, velocidad de crecimiento, color y textura del micelio, tinción del medio de cultivo, desarrollo o no del estado teleomorfo y la especie hospedante, entre otros. (Alexopoulos y Mims, 1996; Stajich *et al.*, 2009). Sin embargo, en muchos casos estos criterios no son suficientes para la diferenciación entre especies debido a la variación que pueden sufrir la

morfología y el fenotipo bajo influencia de diferentes factores ambientales. En los últimos años, los métodos moleculares han permitido aumentar nuestro conocimiento de las diferentes especies fúngicas, desarrollar una clasificación estable y descubrir e identificar nuevos taxones fúngicos. Los problemas aparejados con la identificación morfológica, se superaron rápidamente con el uso de la PCR, que fue un avance importante para aquellos que estudiaban microorganismos. El rápido desarrollo de métodos automatizados de alto rendimiento también ha hecho posible adquirir secuencias genómicas completas para estudios a nivel de población (Neafsey *et al.*, 2010). En la actualidad, el uso combinado del diagnóstico molecular y la caracterización morfológica tradicional es la forma más apropiada para la identificación de fitopatógenos. Una vez que una especie es correctamente identificada, esta información puede ser usada para el desarrollo e implementación de estrategias de manejo efectivas. En esta tesis, en base a secuencias de la región ITS, empleada como código de barras[1] primario para la identificación de hongos (Schoch *et al*., 2012), se ha podido identificar con precisión a las distintas especies fúngicas en estudio. Las secuencias de los aislamientos presentaron porcentajes de similitudes mayores al 99% con cepas previamente caracterizadas de *G. citri-aurantii* GcaCC015 (Hernández-Montiel *et al*., 2010), *P. digitatum* Grapefruit PD (Wang y Deng, 2020), *P. italicum* AK37 (Khan *et al*., 2019), y *P. citricarpa* CBS 127452 (Vu *et al*., 2019). Los resultados obtenidos confirmaron la identificación morfológica previa realizada en el CEREMIC.

Respecto al estudio de aplicación de fungicidas, se observó que el momento de aplicación en cítricos para tratar a *P. italicum*, *P. digitatum* y *G. citri- aurantii*, corresponde a unos días previos a la cosecha y durante la poscosecha; para su posterior clasificación y almacenamiento. En cuanto al control de *P. digitatum*, los fungicidas benzimidazol, tiabendazol, benomilo, carbendazim y tiofanato de metilo, ofrecieron un excelente control desde 1971 hasta 1974 cuando se desarrolló la resistencia (Wild y Rippon, 1975). En el año 1978 se incorpora la utilización de guazatina, lo cual disminuyó la incidencia de resistencia a los benzimidazoles (Tugwell, 1980). La guazatina también controló a *G. citri-aurantii* (Rippon y Morris, 1981). Se determinó una doble resistencia de *P. digitatum*, a través de pruebas *in vivo* en naranjas inoculadas con cepas previamente caracterizadas, a los fungicidas guazatina y benomilo (Wild ,1983). El benomilo integra el grupo 1 (FRAC) y su modo de acción es inhibir el ensamblaje de *ß*-tubulina durante la mitosis; mientras que guazatina pertenece al grupo M7 (FRAC). Los pricipos activos en este grupo son multisitio: atacan al hongo en varios sitios y a través de varias vías bioquímicas. Benomilo se ha utilizado continuamente, ya sea aplicado por separado o

[1] Un código de barras de ADN representa un patrón de secuencia de ADN único de 400 a 800 nucleótidos de longitud que puede procesarse rápidamente a partir de muestras o cultivos y analizarse sin ambigüedades mediante programas informáticos para identificar especies.

combinado con otros fungicidas para controlar el moho de los cítricos en poscosecha y la mancha negra en el campo (*P. citricarpa*) (Bertus, 1981).

En aislamientos de *P. italicum* (moho azul) de diferentes envíos de cítricos, se observaron resistencias *in vitro* al tiabendazol, benomilo, tiofanato de metilo y carbendazim. La aplicación de tiabendazol y benomilo en naranjas ´Valencia Late´ inoculadas con aislados resistentes, no logró prevenir el desarrollo del moho azul (Muirhead, 1974). Los fungicidas del grupo 3 (FRAC) son inhibidores de la biosíntesis de esteroles, como el bitertanol, etaconazol, fenapanil e imazalil, evidenciaron resistencia cruzada para *P. italicum*. Se supone una acumulación gradual de diferentes mutaciones para la resistencia, que, junto con la selección de aptitud normal, puede eventualmente conducir a la pérdida del control del hongo (De Waard *et al*., 1982). *P. digitatum* tiene un alto potencial para desarrollar resistencia a los fungicidas debido a su abundante producción de esporas, y por lo tanto, las estrategias de manejo de la resistencia son fundamentales para mantener la eficacia de los fungicidas. *P. digitatum* presentó resistencia a fungicidas como fludioxonil y pirimetanil (grupo 12 FRAC), los cuales actúan a través de la interferencia del proceso de regulación osmótica de las membranas celulares de los hongos, provocando la ruptura de las células (Kanetis *et al*., 2008). En ensayos realizados *in vitro* con limones almacenados, se obtuvo resistencia a guazatina para el control de *P. italicum* (Hartill *et al*.,1983). En ensayos recientes, el principio activo fludioxinil demostró resistencia cruzada con dicarboximidas (Zhou *et al.*, 2020).

Se evidenciaron resistencias a campo del fungicida benomilo, que integra el grupo 1 (FRAC), en *P. citricarpa* en el año 1985 (Herbert y Grech 1985). Debido a la incidencia generalizada de resistencia a benzimidazol en muchas poblaciones de hongos, se deben implementar buenas prácticas de manejo de la resistencia lo antes posible para retrasar o prevenir cambios adicionales en la sensibilidad de los patógenos objetivos. Los benzimidazoles deben integrarse en un programa de aplicaciones que contenga fungicidas con sitios de acción diferentes, y para reducir la presión de selección, el número total de aplicaciones no debe exceder el indicado en la etiqueta del producto. El desarrollo y la propagación de la resistencia a los fungicidas depende de la capacidad de las cepas mutantes resistentes para desarrollarse en la naturaleza. El conocimiento de la diversidad de la población microbiana y la presión de selección de los fungicidas, será esencial para prevenir el desarrollo de resistencias y para el manejo efectivo de enfermedades (Corio-Costet *et al*., 2011).

Los principios activos multisitio, se utilizan en proporciones más altas y generalmente tienen más eficacia y un perfil de toxicidad menos favorable en comparación con los fungicidas de sitio único (Schnabel y Brannen, 2022). También tienen un bajo riesgo de desarrollar

resistencia y son socios efectivos de mezcla/alternancia para fungicidas de riesgo medio a alto, previniendo o retrasando el desarrollo de varios patógenos en muchos cultivos.

La incorporación de los LMR de plaguicidas en el comercio agrícola, se está volviendo importante para los alimentos y las políticas comerciales. El establecimiento de LMR reduce la exportación de frutas y verduras de EE. UU. a los miembros de la Unión Europea en un 13,8% (Hejazi *et al*., 2022). Las medidas fitosanitarias están desempeñando un papel influyente en la configuración del comercio de productos agrícolas y alimentarios (Disdier y Marette, 2010). Los países más desarrollados establecieron sus propios sistemas de LMR, dadas las crecientes preocupaciones de los consumidores respecto al medio ambiente y la salud humana (Yeung *et al*., 2017).

Los resultados de esta tesis indican que los LMR establecidos internacionalmente son iguales o mayores a los establecidos por SENASA, a excepción de guazatine y procloraz; y en el caso de los principios activos utilizados para *P. citricarpa*, son menores los establecidos por SENASA en relación a LMR internacionales. Una de las razones de las diferencias de los LMR se debería a diferencias en las prácticas regionales, en cuanto al establecimiento de riesgos o estrategias de priorización en los regímenes europeos y latinoamericanos (Vryzas *et al*., 2020).

La presencia de plaguicidas en frutas y hortalizas ha sido una preocupación creciente en Argentina, sólo tres de los principales mercados mayoristas tienen la infraestructura necesaria para determinar los residuos de pesticidas. En un estudio de la presencia de residuos en frutas y hortalizas de producción nacional para consumo interno, se detectaron plaguicidas en el 65% del total de las muestras evaluadas; y las naranjas arrojaron la concentración de pesticidas más alta detectada. Es por ello que se recomienda con urgencia la implementación de programas diseñados para facilitar la sensibilización, capacitación y seguimiento del uso de estos productos (Mac Loughlin *et al*., 2018).

Por lo tanto, las tendencias de consumo y las actualizaciones legislativas favorecen claramente una reducción en el uso de fungicidas convencionales, lo que hace necesario la investigación para desarrollar e implementar enfoques alternativos y tecnologías novedosas para el control de enfermedades poscosecha. Se deberán tener en cuenta todos los factores que afectan la epidemiología y la incidencia de cada enfermedad, incluidos los factores previos a la cosecha (Palou, 2018). Los compuestos naturales, como los extractos de plantas y los aceites esenciales, pero también las sales inorgánicas u orgánicas sintéticas como carbonatos, bicarbonatos, sorbatos, benzoatos, acetatos, sales de parabeno, silicatos, etc., son sustancias no perjudiciales para el medio ambiente y para la salud humana. Estos se utilizan por sus propiedades antimicrobianas y su inducción de defensas vegetales, controlan las enfermedades

poscosecha, tanto *in vitro* como *in vivo,* prolongando la calidad general y la vida de almacenamiento de los productos frescos (Feliziani *et al*., 2013; Palou, 2018).

**Conclusión**

Los cítricos dulces incluyen naranjas, mandarinas y pomelos, siendo la naranja la más cultivada a nivel mundial. En Argentina, la producción se concentra en el Noreste, Noroeste y parte de Buenos Aires, generando empleo y crecimiento regional. La actividad tiene potencial de mejora mediante tecnología y, nuestro país tiene la capacidad de producir en contra estación, lo que cual es una ventaja. Se caracteriza por su mano de obra intensiva, diversidad de productos y exportaciones. La producción enfrenta desafíos como la demanda de calidad, el crecimiento del mercado asiático, exigencias de sostenibilidad y competencia internacional, lo que requiere políticas públicas para superar su estancamiento.

Por otro lado, para el control de enfermedades fúngicas, en el caso del empleo de fungicidas de síntesis química en ambientes donde se ha hecho un uso continuo de ellos, se han observado incrementos en las poblaciones de los patógenos, capaces de resistir las dosis comerciales de estos fungicidas y provocando una pérdida de la efectividad comercial del producto. A su vez, existen mayores regulaciones sobre su uso y la exigencia de productos de calidad y sanidad garantizada es cada vez mayor e impacta directamente en la apertura o cierre de los mercados. La preocupación pública sobre la inocuidad de los alimentos, ha aumentado el interés por encontrar alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de enfermedades en frutas, los consumidores prefieren comprar fruta con pocos residuos de pesticidas o ninguno en absoluto, lo que induce a los países importadores a reforzar las estrictas regulaciones de importación con respecto a los LMR.

## Capítulo II: Extracción de metabolitos secundarios de las especies vegetales seleccionadas para ser evaluados como fungicidas

### Introducción

América Latina representa una de las fuentes más ricas de material vegetal con actividades farmacológicas debido a su amplia biodiversidad (Brandão *et al*., 2008). El conocimiento etnofarmacológico ha sido conservado o transmitido por las numerosas poblaciones indígenas que aún viven en esta región y también es necesario mencionar que estos recursos han sido poco estudiados (Scarpa 2004, Svetaz *et al*., 2010; Stegmayer *et al*., 2019). Las plantas biosintetizan metabolitos antimicrobianos que presentan bajas adversidades para los humanos y bajo impacto ambiental; también se ha demostrado que son sustitutos aptos de los pesticidas sintéticos. Las plantas presentan varios mecanismos para combatir enfermedades causadas por hongos patógenos, principalmente evitando el contacto físico entre plantas y patógenos, así como mediante mecanismos de defensa innatos (Sajeena *et al*., 2019). El uso de productos botánicos y agentes de biocontrol para el manejo de enfermedades, es un área vital de investigación en la actualidad. Por ello, la estrategia futura debería ser identificar y seleccionar plantas con potencial antimicrobiano.

En este contexto, las plantas producen un gran número de metabolitos secundarios que tienen una acción biocida contra los patógenos de poscosecha. Los metabolitos secundarios, cumplen diversas funciones de supervivencia en la naturaleza, son muy importantes para la salud humana, incluyen antibióticos, agentes antitumorales, medicamentos para reducir el colesterol, inmunosupresores, agentes antihelmínticos y otros antiparasitarios, herbicidas, estimuladores del crecimiento de rumiantes, fungicidas agrícolas, bioinsecticidas, entre otras (Sanchez y Demain, 2011). Estos metabolitos están asociados con el sistema defensivo y pueden desempeñar un papel como inhibidores de hongos (Palou *et al*., 2016 ). Sólo el 10% del total de especies de plantas de todo el mundo, han sido investigadas por sus actividades pesticidas. El desarrollo de formulaciones a base de plantas es un paso importante para lograr su uso económico y eficaz como agentes fitosanitarios (Sajeena *et al*., 2019).

En los últimos años, estos productos han ganado gran interés entre industriales e investigadores debido a su actividad antifúngica y antibacteriana. Varios estudios destacan las propiedades antimicrobianas de extractos naturales de plantas que contienen diferentes clases de compuestos fenólicos. Los polifenoles vegetales representan una fuente prometedora de agentes

antibacterianos, ya sea solos o en combinación con antibióticos existentes, para el desarrollo de nuevas terapias con antibióticos (Álvarez-Martínez *et al*., 2018).

Las frutas y verduras frescas son productos perecederos que desempeñan un papel vital en la dieta y la salud de los seres humanos. Sin embargo, las pérdidas a lo largo de la cadena del abastecimiento son altas, especialmente debido a la descomposición causada por patógenos durante el manejo deficiente de la poscosecha (Ding y Lee, 2019). En los últimos años, la aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales vegetales (AE) ha recibido un creciente interés como alternativa natural al uso de químicos sintéticos comerciales para el control de las principales enfermedades de poscosecha de frutas y hortalizas.

En cuanto a los aceites esenciales, se pueden obtener de diferentes partes de las plantas como los frutos, flores, hojas, semillas, tallos, yemas, raíces y cortezas. La actividad está determinada por el genotipo de la planta y por su composición química (la cual está influenciada por muchos factores como las condiciones ambientales y la ubicación geográfica), por la concentración de la población del patógeno, las características de la cepa, la superficie celular microbiana y la duración de la exposición del patógeno a los AE (Nandhavathy *et al*., 2020; Aguilar-Veloz *et al*., 2020; Asbahani *et al*., 2015). Se han utilizado como antimicrobianos en poscosecha y han demostrado ser eficientes para prolongar la vida útil de frutas y verduras sin afectar sus propiedades sensoriales. En algunos casos, los tricomas glandulares de las plantas son el sitio para la biosíntesis de aceites esenciales, y actúan como sistema de defensa contra herbívoros y patógenos (Ding y Lee, 2019).

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos en diferentes ensayos son difícilmente comparables para las evaluaciones *in vitro* o *in vivo* porque existen diferentes factores que influyen en el resultado final: como las condiciones de evaluación, el método utilizado, el tipo de solvente, las formas de expresar los resultados en diferentes unidades de concentración de AE, y el hecho de que las bacterias y los hongos ambientales son más virulentos que las cepas de colección (Raveau *et al*., 2020 ; Van de Vel *et al*., 2019).

En este capítulo se describe la selección, recolección e identificación de las especies vegetales a estudiar. Como también las técnicas extractivas y sus rendimientos para la obtención de los productos naturales de distinta naturaleza química que serán evaluados por su capacidad fungicida.

**Materiales y Métodos**

Las plantas fueron seleccionadas de acuerdo a una búsqueda bibliográfica referida a usos etnobotánicos que se pudieran relacionar con funciones antimicrobianas. Cabe destacar que al tratarse de plantas nativas de la región del centro-norte de Santa Fe, fue escasa la información encontrada sobre estas especies desde aspectos biológicos y fitoquímicos. Para esto, se elaboró una ficha descriptiva de cada especie (Anexo I Especies). En cada ficha figura: nombre científico, familia botánica, nombre vulgar/común, descripción, distribución, usos, componentes químicos y actividad antimicrobiana reportada en la literatura. Además, el nombre de una especie de planta es clave para comunicar y hallar información sobre sus usos, estado de conservación, relaciones y ubicación dentro de los ecosistemas. Para ello, se procedió a la consulta del nombre correcto a través de las bases de datos reunidas en la cooperación de Jardines Botánicos Reales (Kew Garden y el Jardín Botánico de Missouri), a través del sitio web theplantlist.org en su versión 1.1; así como también del Instituto de Botánica Darwinion (Argentina). Para mayor certeza, una vez consultado el nombre científico, se corroboró, además, en el sitio web http://wcsp.science.kew.org. Este sitio consta de un programa de colaboración internacional que proporciona los últimos datos revisados por pares y opiniones publicadas sobre los nombres científicos aceptados y sinónimos de familias de plantas seleccionadas. Las especies vegetales seleccionadas para esta tesis se muestran en la Tabla 8.

Las plantas fueron recolectadas en fincas y a orillas de los caminos en áreas aledañas de la región Litoral de Argentina, entre los años 2019 y 2020. Cada especie fue identificada y un ejemplar herborizado fue depositado en el Herbario de la FCA-UNL "SF" (acrónimo según Thiers, 2024) (Tabla 8). Después de la cosecha, las plantas se secaron en un ambiente adecuado (un cuarto oscuro y con baja humedad relativa), mientras se separaban sus diferentes partes (hojas, flores, frutos o toda la planta) según el tipo de extracto que se debía preparar. Cabe destacar que tres especies (*Orthosia virgata*, *Solanum argentinum* y *Solanum pilcomayense*) fueron recolectadas en dos sitios geográficos diferentes con el fin de evaluar si el lugar de colecta se correlacionaría con la bioactividad y por consiguiente con su fitoquímica. Por este motivo, en las siguientes tablas se verán estas especies como (1) y (2), indicando sus dos procedencias.

**Tabla 8**: Datos identificatorios de las especies seleccionadas, familia botánica, nombre científico, número de *Voucher specimen*, fecha y lugar de recolección o adquisición.

| **Familia** | **Nombre científico** | **N° *Voucher specimen*** | **Fecha y lugar de colecta o adquisición** |
|---|---|---|---|
| Anacardiaceae | *Schinus molle* L. | MD57 UNL | 15/01/2016, patio de la FCA-UNL, Las Colonias, Santa Fe |
| Apocynaceae | *Araujia brachystephana* (Griseb.) Fontella & Goyder | Pensiero *et* Zabala 13800 | 13/08/2019, San Javier, Santa Fe, 30°03´23.2"S 59°51´34.8"W |
| | *Forsteronia glabrescens* Müll. Arg. | Pensiero *et* Zabala 13804 | 13/08/2019, Gral. Obligado, Santa Fe, 28°42´54.8"S 59°23´13.7"W |
| | *Orthosia virgata* (Poir.) E. Fourn. (1) | Pensiero *et* Zabala 13802 | 13/08/2019, San Javier, Santa Fe, 30°03´23.2"S 59°51´34.8"W |
| | *Orthosia virgata* (Poir.) E. Fourn. (2) | Pensiero *et* Zabala 13805 | 13/08/2019, Gral. Obligado, Santa Fe, 28°42´54.8"S 59°23´13.7"W |
| | *Funastrum clausum* (Jacq.) Schltr. | Pensiero *et* Zabala 13797 | 13/08/2019, San Javier, Santa Fe, 30°03´23.2"S 59°51´34.8"W |
| Bromeliaceae | *Tillandsia tricholepis* Baker | Pensiero *et* Zabala 13798 | 13/08/2019, San Javier, Santa Fe, 30°03´23.2"S 59°51´34.8"W |
| Fabaceae | *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W. Grimes | Pensiero *et* Zabala 13816 | 14/08/2019, Gral. Obligado, Santa Fe, 28°12´53.9"S 59°08´58.3"W |
| | *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger | MD39 UNL | 17/03/2019, Las Colonias, Santa Fe, 31°26'30.3"S 60°56'24.7"W |
| Geraniaceae | *Pelargonium graveolens* L'Hér. | MD58 UNL | 11/10/2017, CECIF, Las Colonias, Santa Fe |
| Myrtaceae | *Melaleuca linearis* Schrad. & J.C. Wendl | MD28 UNL | 11/10/2017, CECIF, Las Colonias, Santa Fe |
| Nictaginaceae | *Pisonia zapallo* Griseb | Pensiero *et* Zabala 13808 | 13/08/2019, Gral. Obligado, Santa Fe, 28°42´54.8"S 59°23´13.7"W |
| Phytolaccaceae | *Petiveria alliacea* L. | Pensiero *et* Zabala 13975 | 13/08/2019, San Javier, Santa Fe, 30°03´23.2"S 59°51´34.8"W |
| Polygonaceae | *Polygonum stelligerum* Cham. | MD55 UNL | 16/03/2019, San Pedro, Bs As, 33°40'11.6"S 59°39'38.4"W |
| | *Polygonum lapathifolium* L. | MD 54 UNL | 16/03/2019, San Pedro, Bs As, 33°40'11.6"S 59°39'38.4"W |
| | *Persicaria acuminata* (Kunth) M. Gómez | SG1675 UNR | 30/3/2015 Retiro San Juan, San Pedro, Buenos Aires |
| Ranunculaceae | *Clematis montevidensis* Spreng. | Pensiero *et* Zabala 13824 | 17/08/2019, Vera, Santa Fe, 29°28´17.6"S 60°05´27.7"W |
| Solanaceae | *Solanum argentinum* Bitter & Lillo (1) | Pensiero *et* Zabala 13820 | 16/08/2019, Tapenagá, Chaco, 27°53´17.9"S 59°51´39.4"W |
| | *Solanum argentinum* Bitter & Lillo (2) | Pensiero *et* Zabala 13817 | 16/08/2019, Lib. San Martín, Chaco, 26°07´13.9"S 59°56´25.1"W |
| | *Solanum granulosum-leprosum* Dunal | Pensiero *et* Zabala 13806 | 13/08/2019, Gral. Obligado, Santa Fe, 28°42´54.8"S 59°23´13.7"W |
| | *Solanum pilcomayense* Morong (1) | Pensiero *et* Zabala 13815 | 14/08/2019, Gral. Obligado, Santa Fe, 28°13´42.2"S 59°06´52.6"W |
| | *Solanum pilcomayense* Morong (2) | Pensiero *et* Zabala 13801 | 13/08/2019, San Javier, Santa Fe, 30°03´23.2"S 59°51´34.8"W |
| | *Solanum caavurana* Vell. | Pensiero *et* Zabala 13813 | 14/08/2019, Gral. Obligado, Santa Fe, 28°13´42.2"S 59°06´52.6"W |
| Verbenaceae | *Lantana megapotamica* (Spreng.) Tronc. | Pensiero *et* Zabala 13796 | 13/08/2019, San Javier, Santa Fe, 30°03´23.2"S 59°51´34.8"W |
| | *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson | Olivella, Getar y Gutiérrez 05 FHUC | 26/05/2017, Depto. La Capital, Santa. Fe. |
| | *Lippia turbinata* Griseb. | JFP11609 UNL | 5/12/2016 6km al NO de los Chiriguanos, Dpto de Bermejo, Formosa |

**Preparación de extractos fijos**

Para la preparación de los extractos, el material vegetal fresco se colocó en un lugar seco y ventilado hasta su deshidratación (Figura 13. A). Una vez seco, las partes aéreas secas se molieron mediante Mixer Philips modelo HR1363/06 y fueron almacenadas para su posterior procesamiento (Figura 13. B). Los solventes utilizados para las maceraciones sucesivas fueron diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) marca Ciccarelli calidad p.a. (Figura 13. C). El material vegetal fue separado por filtración con vacío mediante embudo Buchner de 112 mm de diámetro (Figura 13. D) y las soluciones extractivas fueron concentradas a presión reducida hasta sequedad mediante un evaporador rotatorio Büchi modelo B-480 (Figura 13. E). De esta forma se extrajo la mayoría de los compuestos presentes en las especies vegetales en estudio, obteniéndose extractos fijos diclorometánicos y metanólicos (Figura 13. F).

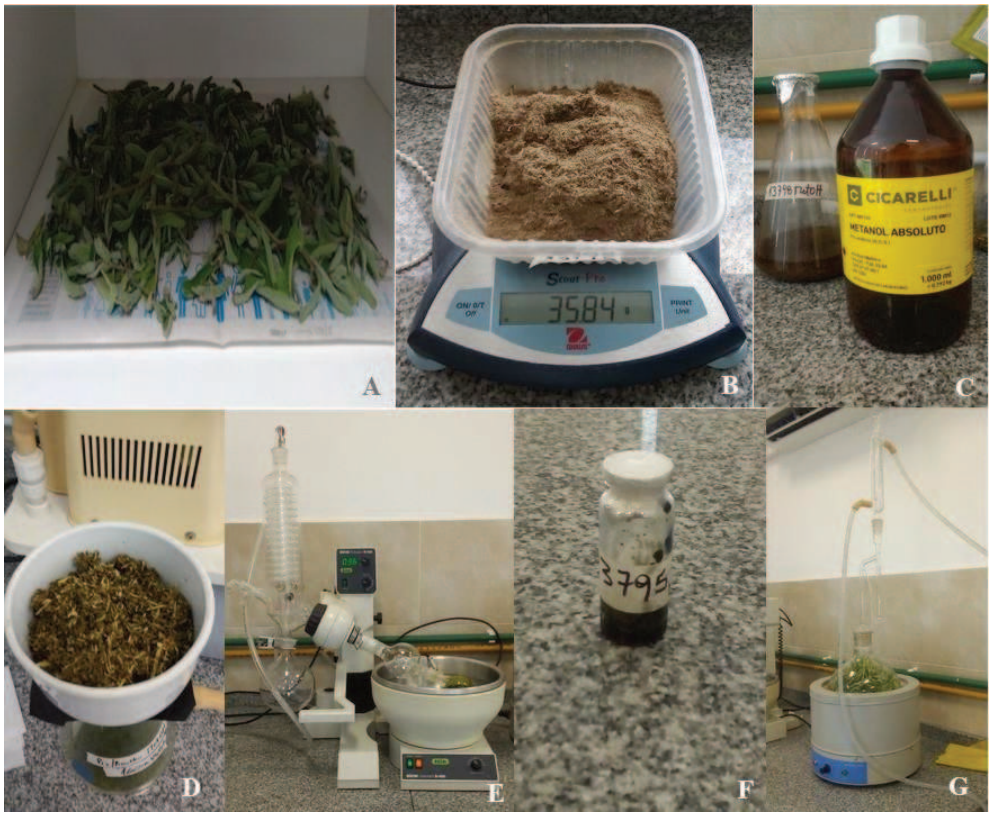



**Figura 13:** Imágenes que muestran el tratamiento del material vegetal y los equipos utilizados para realizar los extractos fijos. **A.** Secado del material vegetal. **B.** Molienda y pesaje. **C.** Material en proceso de maceración con solventes. **D**. Proceso de filtrado al vacío. **E.** Evaporación de soluciones extractivas con rotavapor. **F.** Extracto crudo. **G.** Equipo de destilación por arrastre con vapor para obtener aceites esenciales.

En la Tabla 9 se muestran los datos para la preparación de los extractos fijos.

**Tabla 9:** Especie, parte utilizada, cantidad de material seco procesado (g), tipo de extracto según el solvente utilizado y abreviatura. Método extractivo: Maceraciones sucesivas (3 x 24 h).

| Nombre científico | Parte utilizada | Material seco (g) | Tipo de extracto según el solvente utilizado | Abreviatura |
|---|---|---|---|---|
| *A. brachystephana* | Partes aéreas | 50,200 | Diclorometano | DCM de *A. brachystephana* |
| | | | Metanol | M de *A. brachystephana* |
| *F. glabrescens* | Partes aéreas | 50,930 | Diclorometano | DCM de *F. glabrescens* |
| | | | Metanol | M de *F. glabrescens* |
| *O. virgata* (1) | Partes aéreas | 47,540 | Diclorometano | DCM de *O. virgata* (1) |
| | | | Metanol | M de *O. virgata* (1) |
| *O. virgata* (2) | Partes aéreas | 53,450 | Diclorometano | DCM de *O. virgata* (2) |
| | | | Metanol | M de *O. virgata* (2) |
| *F. clausum* | Partes aéreas | 50,510 | Diclorometano | DCM de *F. clausum* |
| | | | Metanol | M de *F. clausum* |
| *T. tricholepis* | Planta completa | 35,840 | Diclorometano | DCM de *T. tricholepis* |
| | | | Metanol | M de *T. tricholepis* |
| *A. inundata* | Partes aéreas | 55,174 | Diclorometano | DCM de *A. inundata* |
| | | | Metanol | M de *A. inundata* |
| *V. caven* | Flores | 135,300 | Diclorometano | DCM de *V. caven* |
| | | | Metanol | M de *V. caven* |
| *P. zapallo* | Partes aéreas | 51,360 | Diclorometano | DCM de *P. zapallo* |
| | | | Metanol | M de *P. zapallo* |
| *P. alliacea* | Partes aéreas | 82,990 | Diclorometano | DCM de *P. alliacea* |
| | | | Metanol | M de *P. alliacea* |
| *P. stelligerum* | Hojas | 53,360 | Diclorometano | DCM de *P. stelligerum* |
| | | | Metanol | M de *P. stelligerum* |
| *P. lapathifolium* | Hojas | 55,740 | Diclorometano | DCM de *P. lapathifolium* |
| | | | Metanol | M de *P. lapathifolium* |
| *P. acuminata* | Hojas | 80,700 | Diclorometano | DCM de *P. acuminata* |
| | | | Metanol | M de *P. acuminata* |
| *C. montevidensis* | Partes aéreas | 50,870 | Diclorometano | DCM de *C. montevidensis* |
| | | | Metanol | M de *C. montevidensis* |
| *S. argentinum* (1) | Partes aéreas | 100,200 | Diclorometano | DCM de *S. argentinum* (1) |
| | | | Metanol | M de *S. argentinum* (1) |
| *S. argentinum* (2) | Partes aéreas | 54,470 | Diclorometano | DCM de *S. argentinum* (2) |
| | | | Metanol | M de *S. argentinum* (2) |
| *S. granulosum-leprosum* | Partes aéreas | 100,250 | Diclorometano | DCM de *S. granulosum-leprosum* |
| | | | Metanol | M de *S. granulosum-leprosum* |
| *S. pilcomayense* (1) | Partes aéreas | 42,220 | Diclorometano | DCM de *S. pilcomayense* (1) |
| | | | Metanol | M de *S. pilcomayense* (1) |
| *S. pilcomayense* (2) | Partes aéreas | 50,550 | Diclorometano | DCM de *S. pilcomayense* (2) |
| | | | Metanol | M de *S. pilcomayense* (2) |
| *S. caavurana* | Partes aéreas | 57,740 | Diclorometano | DCM de *S. caavurana* |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Metanol | M de *S. caavurana* |
| *L. megapotamica* | Partes aéreas | 57,360 | Diclorometano | DCM de *L. megapotamica* |
| | | | Metanol | M de *L. megapotamica* |

**Obtención de Aceites esenciales**

Para aquellos casos en que las plantas presentaban principios activos en sus aceites esenciales, se realizaron destilaciones por arrastre con vapor de agua utilizando el equipamiento fabricado según normas farmacopeicas, mostrado en la Figura 13.G. En todos los casos, se tuvo en cuenta la precaución de no someter a secado el material recolectado para evitar la liberación de los compuestos volátiles. En la Tabla 10 se describe el modo en el que se procesó cada especie vegetal destinada a la obtención de aceites esenciales.

**Tabla 10**: Nombre científico, parte utilizada, abreviatura, cantidad de material fresco procesado (g), y método extractivo para aquellas plantas productoras de aceites esenciales.

| **Nombre científico** | **Parte utilizada** | **Material fresco (g)** | **Método extractivo** | **Abreviatura** |
|---|---|---|---|---|
| *S. molle* | hojas | 100 | Destilación por arrastre con vapor de agua | AE Sm |
| *P. graveolens* | hojas | 652,7 | Destilación por arrastre con vapor de agua | AE Pg |
| *M. linearis* | hojas | 506,25 | Destilación por arrastre con vapor de agua | AE Ml |
| *L. alba* | hojas | 423,51 | Destilación por arrastre con vapor de agua | AE La |
| *L. turbinata* | hojas | 346,78 | Destilación por arrastre con vapor de agua | AE Lt |

**Resultados**

**Selección de las especies vegetales**

En el Anexo I se describió la búsqueda bibliográfica para cada especie evaluada por su capacidad antifúngica y en la Tabla 8 de este capítulo se informó los datos identificatorios de todas ellas.

**Rendimientos**

En las Figuras 14 y 15 se muestran los rendimientos de todos los extractos fijos diclorometánicos y metanólicos, respectivamente. Los resultados se expresan en gramos de extracto obtenido mediante el método extractivo de maceración por 100 gramos de muestra vegetal seca procesada (en porcentaje).

Dentro de los extractos diclorometánicos (Figura 14), el que obtuvo mayor rendimiento fue el correspondiente a *F. clausum* con un 3,71%. Rendimientos menores al 3,71% pero mayores al 2,29% fueron obtenidos de: *S. argentinum* (3,48%), *T. tricholepis* (3,36%), *S. granulosum-leprosum* (3,20%), *A. brachystephana* (2,39%), *O. virgata* (1) (2,39%) y *O. virgata* (2) (2,29%). El resto de los extractos DCM presentaron rendimientos menores al 2%: *F. glabrescens* (1,86%), *S. caavurana* (1,40%), *S. pilcomayense* (1,33%), *P. zapallo* (1,31%), *V. caven* (1,30%), *P. acuminata* (1,16%), *A. inundata* (1,07%) y *C. montevidensis* (1,03%). Finalmente, los extractos que presentaron rendimientos muy bajos fueron: DCM de *S. argentinum* (0,73%), DCM de *P. stelligerum* (0,71%), DCM de *P. lapathifolium* (0,63%), DCM de *S. pilcomayense* (0,52%), DCM de *L. megapotamica* (0,44%) y DCM de *P. alliacea* (0,42%).

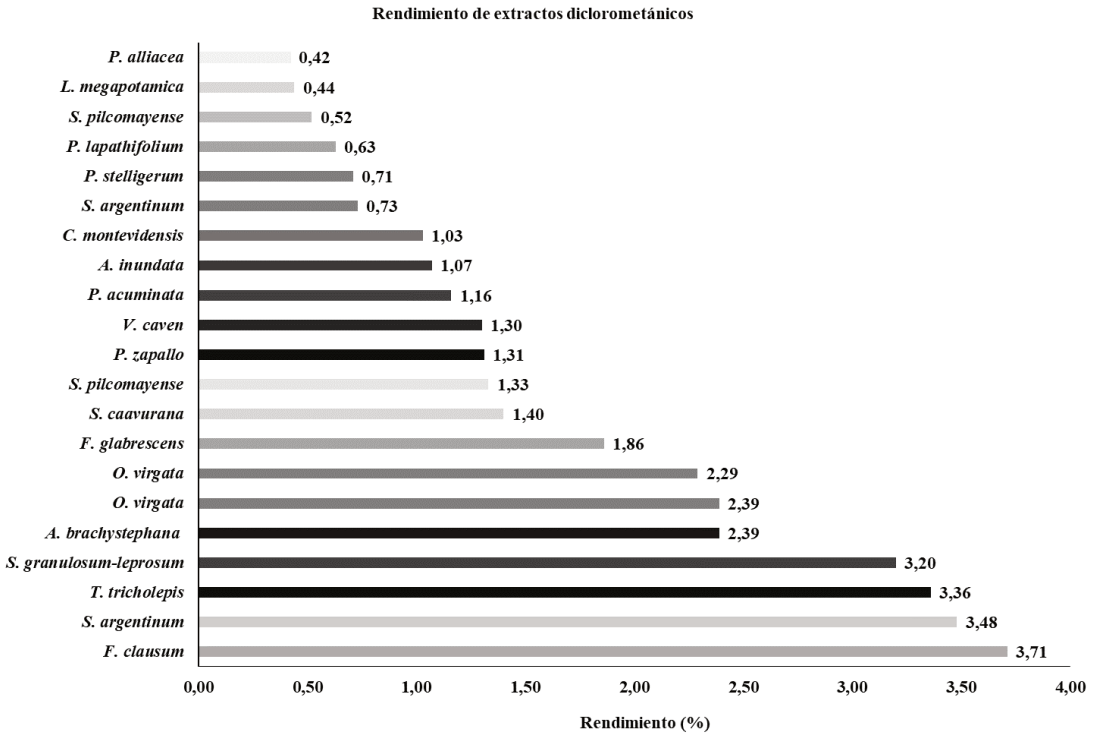



**Figura 14:** Rendimientos de extractos diclorometánicos de las distintas muestras vegetales secas.

De los extractos metanólicos (Figura 15), el que presentó mayor rendimiento fue el correspondiente a *A. brachystephana* con un 10,68%. Rendimientos menores al 10,68% pero mayores al 7,29% fueron obtenidos de las muestras de: *S. caavurana* (10,26%), *C. montevidensis* (10,23%), *P. zapallo* (7,74%), *S. argentinum* (1) (7,67%), *S. pilcomayense* (7,56%), *V. caven* (7,31%), *F. glabrescens* (7,29%), *F. clausum* (7,17%) y *S. argentinum* (2) (7,02%). El resto de los extractos metanólicos presentaron rendimientos menores al 7%: *P. acuminata* (6,81%), *S. granulosum-leprosum* (5,05%), *O. virgata* (1) (4,98%), *L. megapotamica*

(4,48%), *T. tricholepis* (4,45%) y *O. virgata* (2) (4,14%). Finalmente, los extractos metanólicos que presentaron menores rendimientos fueron: *A. inundata* (3,44%), *S. pilcomayense* (3,23%), *P. alliacea* (3,05%), *P. lapathifolium* (3,05%) y *P. stelligerum* (2,76%).

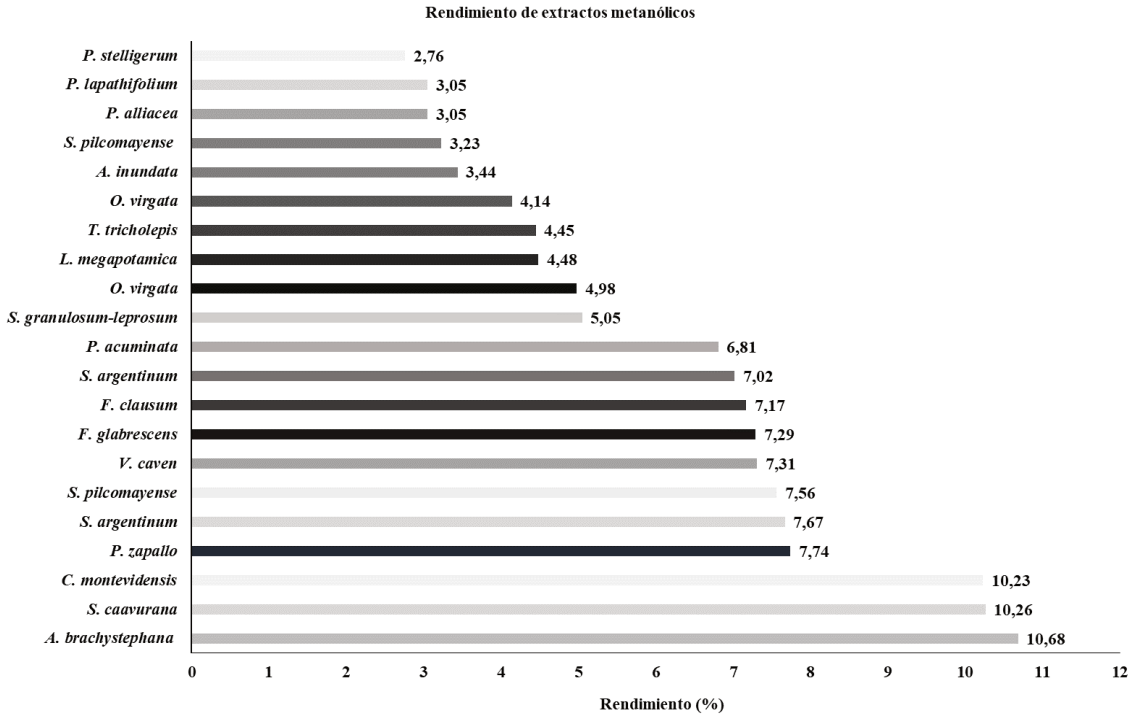



**Figura 15**: Rendimientos de extractos metanólicos de las distintas muestras vegetales secas.

### Obtención de Aceites esenciales

En la Tabla 11 se informan los rendimientos en porcentaje (mL de aceite esencial obtenido/100 g de material vegetal fresco procesado) de cada especie sometida a esta metodología extractiva.

**Tabla 11**: Rendimientos de los aceites esenciales obtenidos de las muestras vegetales correspondientes por destilación por arrastre con vapor de agua.

| Nombre científico | Parte utilizada | Abreviatura | Rendimiento (%) |
|---|---|---|---|
| *S. molle* | hojas | AE Sm | 1,42 |
| *P. graveolens* | hojas | AE Pg | 0,31 |
| *M. linearis* | hojas | AE Ml | 1,15 |
| *L. alba* | hojas | AE La | 0,54 |
| *L. turbinata* | hojas | AE Lt | 0,56 |

**Discusión**

Las plantas desarrollaron un complejo sistema de defensa para superar el estrés biótico y abiótico (Ballhorn *et al*., 2009); presentan sistemas de señalización y reconocimiento específicos que les permiten detectar la entrada de patógenos rápidamente e inducir una respuesta de defensa que en la mayoría de las interacciones resulta eficaz para detener la penetración y/o infección (Schaller & Ryan, 1996). La formación de metabolitos secundarios es el resultado de millones de años de interacción de las plantas con los patógenos y se considera que más de 100.000 metabolitos se encuentran involucrados en el sistema de defensa (Zaynab *et al*., 2018).

Cuando no se dispone de información sobre la naturaleza de los metabolitos secundarios, todos los extractos son potencialmente de interés biológico y se debe realizar la selección del método de extracción más adecuado. Es importante tener presente que la investigación fitoquímica basada en la etnofarmacología, es considerada eficaz en el descubrimiento de nuevas entidades químicas con potencial como fármacos; pero al no disponerse de información sobre su naturaleza, la elección de metodologías con gran poder extractivo, es de suma importancia (Brusotti *et al*., 2014).

Este capítulo se refirió a las extracciones del conjunto de los metabolitos secundarios de las diferentes especies vegetales seleccionadas, teniendo en cuenta los antecedentes mencionados en las fichas técnicas de cada una de ellas, obteniéndose 42 extractos. De ellos, se obtuvieron 21 extractos diclorometánicos (a partir de 21 especies) y 21 extractos metanólicos (a partir de 21 especies). En todos los casos se realizaron extracciones sucesivas, utilizándose una purificación preliminar en base a las propiedades lipofílicas/hidrófilas y/o ácidas/básicas según lo informaba la literatura (Brusotti *et al*., 2014).

La extracción de compuestos bioactivos se realizó mediante métodos clásicos o convencionales, que utilizan disolventes orgánicos o agua, a presión atmosférica y a temperaturas ambiente o controladas. La maceración es una técnica antigua de extracción donde se utilizan solventes orgánicos, requiere un volumen importante, tiempo de extracción y procedimientos manuales que dependen del investigador e implica gran mano de obra (Rasul, 2018; Madureira *et al*., 2020). Existen variables de extracción (tipo de solvente, temperatura, grado de molienda y tipo de material vegetal) que influyen significativamente en la recuperación de compuestos bioactivos y deben considerarse para la optimización del proceso. Los métodos de extracción asistida demostraron ser más efectivos que los convencionales para extraer antioxidantes polifenólicos de subproductos agrícolas, y si bien presentan mayor efectividad que los métodos convencionales, el costo del equipamiento que requieren, hicieron poco viable su implementación (Madureira *et al*., 2020).

La selección del sistema disolvente depende en gran medida de la naturaleza específica del compuesto bioactivo al que se dirige. En el caso de compuestos hidrófilos, se utilizan disolventes polares como metanol, etanol o acetato de etilo; mientras que, si la extracción es de compuestos más lipófilos, se utiliza hexano, éter de petróleo o diclorometano (Sasidharan *et al*., 2021). Los extractos metanólicos obtenidos de todas las especies estudiadas aquí, produjeron rendimientos mayores que los extractos diclorometánicos; este hecho se debe a la cantidad y tipo de moléculas que pueden ser extraídas por el solvente metanol (Derita *et al*., 2009; Wakeel *et al*., 2019).

Para la determinación de la calidad de plantas productoras de aceites esenciales, el método de extracción es un factor vital. Si se utilizan métodos inadecuados para la extracción, se produce una pérdida de rendimiento y calidad del aceite, y por consiguiente de su actividad biológica. La mayoría de los aceites esenciales son producidos por destilación al vapor (Shankar *et al*., 2021). También es necesario tener en cuenta que la cantidad de aceite esencial presente en la planta es afectada por las condiciones climáticas y de hábitat, plantación, etapas y métodos de cosecha, fertilización, y condiciones internas (El Khetabi *et al*., 2022). Los aceites esenciales suelen estar presentes en cantidades muy bajas en el material vegetal, y esto se evidencia a través de los rendimientos que se obtienen. Según Brusotti *et al.* (2014), los rendimientos obtenidos en estas extracciones no superaron el 1,15%; en esta tesis, el mayor rendimiento obtenido alcanzó el 1,42% para el caso de *S. molle*.

**Conclusión**

La búsqueda de información etnobotánica permitió la selección de 21 plantas nativas con posible actividad antimicrobiana. Se obtuvieron 42 extractos fijos y 5 aceites esenciales utilizando diferentes metodologías extractivas, con diferentes solventes o por arrastre con vapor de agua para el caso de aceites esenciales. Los rendimientos obtenidos a través de las metodologías utilizadas se encuentran dentro de los parámetros esperables, logrando el material de partida para los ensayos *in vitro*.

## Capítulo III: Ensayos *in vitro* de los extractos y aceites esenciales obtenidos a partir de las especies vegetales seleccionadas, por su capacidad antifúngica contra los fitopatógenos en estudio

### Introducción

Las enfermedades de poscosecha de cítricos se han controlado durante muchos años únicamente mediante la aplicación de fungicidas convencionales como (1) Imazalil (IMZ) [(RS)-1-(*β*-aliloxi-2,4-diclorofenetil) imidazol], el cual constituye el fungicida de poscosecha más comúnmente empleado por la industria citrícola; (2) Tiabendazol (TBZ) [2-(1,3-tiazol-4-il) bencimidazol], que pertenece al grupo de fungicidas bencimidazoles y se ha utilizado para el control de mohos de los cítricos; (3) Ortofenilfenato de sodio (SOPP) [(1,10-bifenil)-2-olato de sodio], que se utiliza actualmente en formulaciones fungicidas combinadas; (4) Guazatina y propiconazol, que se han utilizado en Europa, Sudáfrica y Australia para el control de *G. citri-aurantii*; y finalmente, pirimetanil (PYR) (4,6-dimetil-N-fenil-2-pirimidinamina), fludioxonil (FLU) [4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol4-il)-1H-pirrol-3-carbonitrilo], azoxistrobina (AZX) [metil-(2E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato] y trifloxistrobina (TFX) (metil-(E) metoxiimino-{(E)-α-[1-(α,α,α-trifluoro-m-tolil)etilidenoaminoxi]-o-tolil}acetato) que se clasifican como fungicidas de "riesgo reducido" (Palou, 2014; Smilanick *et al*., 2008). En cuanto a *P. citricarpa*, se utilizan como principios activos azoxistrobina, pyraclostrobin y trifloxistrobin (SENASA, 2006).

Como fue expuesto en el Capítulo 1, la utilización continua de estos tratamientos desde hace muchos años, ha contribuido a la proliferación de cepas fúngicas resistentes (Ismail y Zhang, 2004), por lo que el uso excesivo o inadecuado de estos fungicidas representa un riesgo para la salud humana y animal, debido a la contaminación de los alimentos y el cambio climático; el problema está creciendo a un ritmo acelerado (Stegmayer *et al*., 2020; Di Liberto *et al*., 2019). En este contexto, existen algunas nuevas alternativas para el control de enfermedades que se presentan en poscosecha de cítricos, como el control biológico, el uso de productos naturales obtenidos de diferentes fuentes y la termoterapia (Moura *et al*, 2019). Los productos naturales obtenidos a partir de extractos de plantas o aceites esenciales, que han revelado acción no tóxica y biodegradabilidad, podrían ser evaluados por su capacidad fungicida. (Di Liberto *et al*., 2019; Stegmayer *et al*., 2021). Las plantas brindan oportunidades para evaluar y aislar nuevos compuestos antifúngicos debido a su amplia diversidad química (Stegmayer *et al*., 2022b; Svetaz *et al*., 2010). En el Capítulo 2 se han expuesto diferentes especies vegetales con potencial actividad antifúngica de acuerdo a los antecedentes hallados en la bibliografía. En este capítulo se describe la evaluación antifúngica *in vitro*, mediante distintos

bioensayos según la naturaleza química de cada producto natural a evaluar (extractos o aceites esenciales), contra los patógenos de cítricos aislados.

## Materiales y Métodos

### Obtención de suspensiones fúngicas

Para la obtención de los inóculos, se realizaron repiques frescos en placa con medio Agar-Papa-Dextrosa (APD) marca MCD Lab®. Dichas placas se incubaron entre 20 y 25 ºC durante un tiempo adecuado, dependiendo de las condiciones de crecimiento de cada hongo. Luego, a cada colonia en crecimiento se le agregó agua estéril con 0,01% de Tween 20 y se raspó con un ansa estéril de modo de obtener una suspensión de conidios. Esta solución se filtró a través de una gasa con ayuda de una jeringa estéril y se contaron los conidios en cámara de Neubauer según lineamientos del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI*,* 2017). Además, a partir de esta solución de conidios, se logró una solución entre $1x10^4$ a $1x10^5$ conidios $mL^{-1}$ que se utilizaron para los ensayos fúngicos. Los microscopios utilizados fueron Correct Tokyo Seiwa Optical nº 612816 y Primo Star ZEISS, este último con cámara integrada.

### Bioensayo de susceptibilidad *in vitro* para extractos fijos

Las pruebas de difusión se realizaron utilizando placas de Petri estériles de 9 cm de diámetro provistas de cuatro divisiones, de modo que cada muestra se analizó por cuadruplicado. Se prepararon soluciones de extractos de plantas a una concentración de 50 mg mL-1 en DMSO que se disolvieron con ayuda de un sonicador marca Arcano y, una vez disueltas, 400 µL de esta solución madre se diluyeron en 20 mL de medio de cultivo APD fundido. Después de agitar vigorosamente con agitador vortex DragonLab MX-S y antes de que la mezcla se solidificara, se vertieron 5 ml de las mezclas a 1000 ppm de extracto en cada uno de los cuatro compartimentos de las placas de Petri y se dejaron enfriar. Se inocularon 10 µL de una suspensión de conidios de concentración $1x10^5$ UFC mL-1 de los fitopatógenos *P. digitatum*, *P. italicum, G. citri-aurantii* y *P. citricarpa*, dentro de un pocillo ubicado en el centro de cada compartimento una vez solidificado el medio, de acuerdo con la metodología desarrollada y publicada (Stegmayer *et al*., 2020; Stegmayer *et al*., 2022a).

Se preparó un control negativo utilizando el fungicida comercial Imazalil® y el solvente DMSO sin extracto vegetal sirvió como control positivo (de crecimiento). Cuando el micelio de las placas del control positivo alcanzó el extremo de los cuadrantes, se realizó la primera lectura del área del micelio de la placa tratada, con el software ImageJ® (Rasband, 2020). Los porcentajes de inhibición promedio con sus desviaciones estándar se determinaron a los 7 y 14

días después de la inoculación. En el caso de *P. citricarpa* las lecturas se realizaron a los 12 y 24 días debido al crecimiento más lento de este hongo.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la ecuación 1. Se consideró una inhibición del 100% cuando luego de 48 h de finalizado el ensayo, las placas tratadas con el extracto colocado en el medio APD, no presentaron ningún tipo de crecimiento fúngico. Se obtuvo un valor promedio de las áreas de crecimiento fúngico en cada división de la placa, que permitieron calcular el porcentaje de inhibición según la siguiente ecuación (1) (Magaldi *et al*., 2004).

$$I\%=100(C-M)/C \quad (1)$$

Siendo I% el porcentaje de inhibición, C el promedio de las áreas de las 4 divisiones de las placas del control positivo (+) y M el promedio de las áreas de las 4 divisiones de la placa con el extracto de interés.

Para el análisis de los resultados por categorías de acción fungicida los resultados se dividieron en las siguientes categorías para el análisis porcentual: extracto inactivo (inhibición del crecimiento de hongos inferior al 50%), extracto moderadamente activo (inhibición del crecimiento de hongos entre 50 y 80%) y extracto activo (inhibición del crecimiento de hongos superior al 80%) (Stegmayer *et al*., 2022b). Todos los resultados se calcularon y expresaron como media ± desviación estándar de las determinaciones realizadas. A través del programa R se realizaron intervalos de confianza para la media de cada tratamiento con un $\alpha=0,05$. Además, se implementó el ajuste de Tukey para analizar las diferencias.

**Ensayo de volátiles para determinación de la actividad de aceites esenciales**

Se utilizaron placas de Petri de vidrio de 60 mm de diámetro estériles que fueron cubiertas con 20 mL de medio APD y una vez solidificado el mismo, se colocó en el centro, 10 µL de inóculo fúngico de concentración $1x10^5$ UFC mL-1. Una vez evaporada el agua de la solución de conidios inoculada, en el centro de la tapa de la placa de Petri se depositaron 10 µL de aceite esencial o agua, esta última correspondiente al control (+). Para realizar el control negativo (–) se utilizó Imazalil agregado al medio fundido a la dosis comercial recomendada por CASAFE. La cantidad de aceite esencial utilizado en el ensayo (teniendo en cuenta el volumen total de la placa de Petri) se corresponde a una concentración de 1000 ppm. Las placas de Petri así preparadas, fueron incubadas de forma invertida, de manera que el aceite esencial que se evapora entrara en contacto con el medio de cultivo donde estaba creciendo el hongo. Se finalizó el ensayo cuando el micelio desarrollado en cada placa control + cubrió por completo la superficie.

Para cada hongo y muestra de aceite esencial, se realizaron experimentos por triplicado, de manera que se obtuvo un valor promedio de los diámetros de crecimiento fúngico que permitieron calcular el porcentaje de inhibición según la siguiente ecuación (2) (Kloucek *et al*., 2012):

$$I\%=100(C-M)/C \quad (2)$$

Siendo I% el porcentaje de inhibición, C el promedio de los diámetros de las 3 placas control y M el promedio de los diámetros de las 3 placas con muestra de aceite esencial. Estas medidas fueron obtenidas mediante el escáner LA2400 con el software WinRHIZO 2013 de Regeant Instrument Canadá y posteriormente su área, fue calculada mediante el programa ImageJ® (Rasband, 2020). A través del programa R se realizaron intervalos de confianza y test de Tukey con un nivel de confianza del 95% para el verdadero promedio poblacional de inhibición. Para la categorización de las inhibiciones, se utilizó el valor de 100% de inhibición a aquellas que tenían iguales propiedades fungicidas al control (-), y en base a esto se definieron los siguientes rangos de porcentajes y calificaciones: extracto activo (inhibición del crecimiento de hongos superior al 80%) extracto moderadamente activo (inhibición del crecimiento de hongos entre 50 y 80%) y extracto inactivo (inhibición del crecimiento de hongos inferior al 50%) (Stegmayer *et al*., 2022b).

## Resultados

### Actividad antifúngica de extractos fijos

En la Tabla 12 se muestran las actividades fungicidas (media ± desviación estándar de las determinaciones realizadas por cuadruplicado de los porcentajes de inhibición) de 42 extractos obtenidos de diferentes partes de 21 especies vegetales evaluadas frente a los fitopatógenos *P. digitatum*, *P. italicum*, *G. citri-aurantii* y *P. citricarpa* a los 7 días post inoculación. La Tabla 13 muestra las actividades fungicidas de los extractos de plantas en estudio, pero en este caso determinadas 14 días después de la inoculación.

**Tabla 12**: Actividad fungicida (media ± desviación estándar de los porcentajes de inhibición) de 42 extractos fijos obtenidos de diferentes partes de 21 plantas nativas evaluadas contra los fitopatógenos *P. digitatum*, *P. italicum, G. citri-aurantii* y *P. citricarpa,* determinada 7 días post inoculación. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($\alpha<0,05$) con respecto al Control – (IMZ) $100\pm0^{a}$ y al Control + $0\pm0^{c}$.

| *Nombre científico* | *P. digitatum* | | *P. italicum* | | *G. citri-aurantii* | | *P. citricarpa* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **DCM** | **MeOH** | **DCM** | **MeOH** | **DCM** | **MeOH** | **DCM** | **MeOH** |
| *A. brachystephana* | 61,0±5,2$^{b}$ | 44,3±6,2$^{b}$ | 30,9±6,5$^{c}$ | 30,5±5,3$^{c}$ | 65,4±5,0$^{b}$ | 66,6±1,8$^{b}$ | 96,4±0,7$^{ab}$ | 86,0±0,6$^{bc}$ |
| *F. glabrescens* | 52,9±7,1$^{b}$ | 75,1±1,5$^{b}$ | 45,8±6,9$^{c}$ | 54,1±5,4$^{b}$ | 71,0±0,4$^{ab}$ | 70,1±2,8$^{ab}$ | 77,8±3,7$^{bc}$ | 91,0±0,3$^{b}$ |
| *O. virgata (1)* | 55,3±2,9$^{b}$ | 50,9±5,9$^{b}$ | 33,2±6,5$^{c}$ | 48,4±6,5$^{b}$ | 88,0±4,9$^{ab}$ | 50,8±1,9$^{b}$ | 68,0±1,8$^{bc}$ | 80,0±1,3$^{bc}$ |
| *O. virgata (2)* | 70,6±2,0$^{b}$ | 86,3±3,8$^{b}$ | 31,6±4,9$^{c}$ | 48,5±4,7$^{b}$ | 99,2±0,7$^{ab}$ | 100±0$^{a}$ | 90,0±4,7$^{b}$ | 86,0±5,1$^{bc}$ |
| *F. clausum* | 62,4±3,8$^{b}$ | 81,5±1,5$^{b}$ | 40,8±4,4$^{c}$ | 43,1±6,9$^{bc}$ | 100±0$^{a}$ | 33,0±5,2$^{bc}$ | 77,6±1,7$^{bc}$ | 70,7±2,5$^{bc}$ |
| *T. tricholepis* | 80,0±2,2$^{b}$ | 85,9±0,7$^{b}$ | 60,8±7,0$^{b}$ | 67,1±3,6$^{b}$ | 87,8±1,5$^{ab}$ | 54,9±1,0$^{b}$ | 95,2±1,1$^{b}$ | 85,2±7,0$^{bc}$ |
| *A. inundata* | 79,3±2,1$^{b}$ | 100±0$^{a}$ | 35,7±5,2$^{c}$ | 100±0$^{a}$ | 79,3±7,0$^{ab}$ | 97,3±0,5$^{ab}$ | 84,6±6,3$^{bc}$ | 85,5±6,0$^{bc}$ |
| *V. caven* | 59,5±4,0$^{b}$ | 76,8±3,5$^{b}$ | 36,2±3,8$^{c}$ | 58,1±6,5$^{b}$ | 56,5±5,1$^{bc}$ | 32,3±4,2$^{bc}$ | 96,6±1,4$^{ab}$ | 78,5±5,4$^{bc}$ |
| *P. zapallo* | 73,2±4,0$^{b}$ | 81,7±2,2$^{b}$ | 37,5±4,7$^{c}$ | 51,8±4,7$^{b}$ | 90,6±7,9$^{ab}$ | 70,0±4,2$^{b}$ | 96,3±1,0$^{ab}$ | 84,1±3,5$^{b}$ |
| *P. alliacea* | 72,5±1,7$^{b}$ | 83,3±3,8$^{b}$ | 53,2±2,8$^{b}$ | 81,3±2,2$^{a}$ | 100±0$^{a}$ | 62,9±3,9$^{b}$ | 92,0±6,0$^{b}$ | 87,4±3,7$^{bc}$ |
| *P. stelligerum* | 75,2±2,3$^{b}$ | 80,1±2,8$^{b}$ | 32,8±6,5$^{c}$ | 57,0±5,3$^{b}$ | 76,0±2,1$^{ab}$ | 38,4±4,1$^{bc}$ | 84,8±6,0$^{bc}$ | 80,4±1,8$^{bc}$ |
| *P. lapathifolium* | 64,2±6,4$^{b}$ | 80,7±0,9$^{b}$ | 33,0±3,2$^{c}$ | 43,8±5,2$^{bc}$ | 82,1±3,5$^{ab}$ | 40,2±3,9$^{b}$ | 90,0±1,8$^{b}$ | 78,5±3,1$^{bc}$ |
| *P. acuminata* | 79,5±2,2$^{b}$ | 100±0$^{a}$ | 85,2±2,9$^{a}$ | 100±0$^{a}$ | 100±0$^{a}$ | 100±0$^{a}$ | 68,4±1,1$^{bc}$ | 100±0$^{a}$ |
| *C. montevidensis* | 49,4±5,2$^{b}$ | 56,4±5,1$^{b}$ | 24,6±3,2$^{c}$ | 45,8±2,7$^{b}$ | 65,5±2,8$^{b}$ | 52,7±4,6$^{b}$ | 94,2±3,2$^{b}$ | 68,5±5,5$^{bc}$ |
| *S. argentinum (1)* | 45,2±6,3$^{b}$ | 62,3±5,3$^{b}$ | 29,0±3,3$^{c}$ | 62,7±5,1$^{b}$ | 63,8±0,9$^{ab}$ | 73,3±1,9$^{b}$ | 80,2±8,8$^{bc}$ | 84,0±5,0$^{bc}$ |
| *S. argentinum (2)* | 73,3±4,0$^{b}$ | 70,0±5,6$^{b}$ | 27,9±4,0$^{c}$ | 51,6±4,8$^{b}$ | 75,0±6,8$^{ab}$ | 48,6±4,9$^{b}$ | 77,0±5,6$^{bc}$ | 73,0±6,0$^{bc}$ |
| *S. granulosum-leprosum* | 54,7±6,0$^{b}$ | 49,5±4,5$^{b}$ | 44,6±4,7$^{c}$ | 40,0±4,3$^{bc}$ | 41,3±5,4$^{b}$ | 61,5±5,1$^{b}$ | 78,0±5,5$^{bc}$ | 92,0±5,0$^{b}$ |
| *S. pilcomayense (1)* | 44,5±4,9$^{b}$ | 100±0$^{a}$ | 15,3±3,4$^{c}$ | 100±0$^{a}$ | 74,4±2,4$^{b}$ | 100±0$^{a}$ | 88,1±1,8$^{bc}$ | 79,4±2,2$^{bc}$ |
| *S. pilcomayense (2)* | 46,4±4,7$^{b}$ | 100±0$^{a}$ | 41,9±5,3$^{c}$ | 100±0$^{a}$ | 71,0±1,9$^{b}$ | 100±0$^{a}$ | 76,2±3,7$^{bc}$ | 100±0$^{a}$ |
| *S. caavurana* | 60,0±5,6$^{b}$ | 94,6±1,5$^{a}$ | 35,5±3,5$^{c}$ | 87,8±1,3$^{a}$ | 79,8±4,5$^{ab}$ | 100±0$^{a}$ | 90,6±2,3$^{b}$ | 100±0$^{a}$ |
| *L. megapotamica* | 75,0±2,2$^{b}$ | 56,3±4,4$^{b}$ | 34,9±4,8$^{c}$ | 41,6±3,4$^{bc}$ | 70,3±1,2$^{b}$ | 62,9±5,1$^{b}$ | 78,0±0,2$^{bc}$ | 74,0±9,5$^{bc}$ |

**Tabla 13**: Actividad fungicida (media ± desviación estándar de los porcentajes de inhibición) de 42 extractos fijos obtenidos de diferentes partes de 21 plantas nativas evaluadas contra los fitopatógenos *P. digitatum*, *P. italicum, G. citri-aurantii* y *P. citricarpa,* determinada

14 días post inoculación. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($\alpha<0,05$) con respecto al Control – (IMZ) $100\pm0^{a}$ y al Control + $0\pm0^{c}$.

| Nombre científico | *P. digitatum* | | *P. italicum* | | *G. citri-aurantii* | | *P. citricarpa* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **DCM** | **MeOH** | **DCM** | **MeOH** | **DCM** | **MeOH** | **DCM** | **MeOH** |
| *A. brachystephana* | $40,8\pm2,5^{b}$ | $18,4\pm3,4^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $7,2\pm2,3^{c}$ | $13,7\pm3,2^{c}$ | $39,5\pm4,3^{bc}$ | $78,4\pm61^{b}$ | $59,5\pm7,1^{b}$ |
| *F. glabrescens* | $38,0\pm3,8^{b}$ | $38,8\pm4,3^{b}$ | $30,6\pm4,6^{bc}$ | $10,3\pm2,1^{c}$ | $26,1\pm3,7^{c}$ | $37,2\pm4,9^{bc}$ | 36,0±2,9bc | $65,0\pm9,0^{b}$ |
| *O. virgata* (1) | $37,9\pm5,2^{b}$ | $33,7\pm4,3^{b}$ | $7,7\pm2,1^{c}$ | $33,8\pm4,6^{bc}$ | $80,0\pm4,4^{a}$ | $29,7\pm3,2^{c}$ | $33,9\pm1,6^{c}$ | $22,0\pm7,0^{c}$ |
| *O. virgata* (2) | $45,9\pm3,9^{b}$ | $57,0\pm3,6^{b}$ | $0\pm0^{c}$ | $16,9\pm3,2^{bc}$ | $90,4\pm6,0^{a}$ | $100\pm0^{a}$ | $50,5\pm1,6^{b}$ | $47,0\pm5,6^{b}$ |
| *F. clausum* | $50,3\pm4,5^{b}$ | $53,6\pm3,7^{b}$ | $15,1\pm3,6^{c}$ | $31,2\pm4,6^{bc}$ | $100\pm0^{a}$ | $16,0\pm1,2^{c}$ | $55,8\pm2,5^{b}$ | $30,0\pm1,3^{c}$ |
| *T. tricholepis* | $76,8\pm2,7^{b}$ | $69,1\pm1,8^{b}$ | $55,0\pm2,7^{b}$ | $39,1\pm6,5^{b}$ | $26,7\pm1,7^{c}$ | $46,9\pm2,8^{bc}$ | $77,2\pm2,2^{b}$ | $60,0\pm7,5^{b}$ |
| *A. inundata* | $60,3\pm2,7^{b}$ | $100\pm0^{a}$ | $34,3\pm6,2^{b}$ | $100\pm0^{a}$ | $71,5\pm5,3^{b}$ | $92,5\pm0,2^{a}$ | $73,2\pm3,9^{b}$ | $71,0\pm7,4^{b}$ |
| *V. caven* | $42,3\pm3,7^{b}$ | $33,0\pm6,1^{b}$ | $30,0\pm5,8^{bc}$ | $11,0\pm3,0^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $22,0\pm5,1^{c}$ | $35,0\pm8,2^{c}$ | $46,1\pm3,6^{b}$ |
| *P. zapallo* | $52,9\pm5,9^{b}$ | $39,5\pm4,4^{b}$ | $18,3\pm4,4^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $10,3\pm2,7^{c}$ | $44,6\pm5,3^{bc}$ | $65,7\pm4,0^{b}$ | $60,7\pm1,5^{b}$ |
| *P. alliacea* | $67,2\pm2,9^{b}$ | $58,8\pm6,7^{b}$ | $41,0\pm2,0^{bc}$ | $57,8\pm3,3^{b}$ | $100\pm0^{a}$ | $34,4\pm5,8^{bc}$ | $47,4\pm1,8^{b}$ | $56,0\pm2,1^{b}$ |
| *P. stelligerum* | $50,2\pm1,5^{b}$ | $42,3\pm4,3^{b}$ | $0\pm0^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $59,1\pm4,1^{bc}$ | $21,5\pm1,6^{c}$ | $49,5\pm1,3^{b}$ | $42,1\pm5,2^{c}$ |
| *P. lapathifolium* | $37,8\pm6,5^{b}$ | $33,0\pm5,3^{b}$ | $0\pm0^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $22,1\pm3,6^{c}$ | $20,5\pm1,2^{c}$ | $19,0\pm5,2^{c}$ | $44,3\pm9,3^{b}$ |
| *P. acuminata* | $64,0\pm5,2^{b}$ | $100\pm0^{a}$ | $48,7\pm9,7^{b}$ | $100\pm0^{a}$ | $100\pm0^{a}$ | $100\pm0^{a}$ | $30,8\pm1,4^{c}$ | $100\pm0^{a}$ |
| *C. montevidensis* | $41,4\pm6,2^{b}$ | $10,4\pm2,0^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $11,6\pm4,5^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $31,6\pm4,3^{bc}$ | $75,1\pm10,0^{ab}$ | $17,0\pm9,2^{c}$ |
| *S. argentinum* (1) | $50,1\pm6,3^{b}$ | $50,1\pm5,2^{b}$ | $0\pm0^{c}$ | $27,8\pm3,5^{bc}$ | $39,3\pm4,5^{bc}$ | $33,1\pm2,8^{bc}$ | $59,4\pm9,0^{b}$ | $49,1\pm3,4^{b}$ |
| *S. argentinum* (2) | $29,5\pm4,3^{b}$ | $40,2\pm6,7^{b}$ | $0\pm0^{c}$ | $13,8\pm2,3^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $37,5\pm5,8^{bc}$ | 44,2±2,2 | $80,3\pm6,2^{ab}$ |
| *S. granulosum-leprosum* | $38,4\pm4,3^{b}$ | $10,4\pm3,7^{c}$ | $29,9\pm4,7^{bc}$ | $0\pm0^{c}$ | $0\pm0^{c}$ | $37,4\pm3,6^{bc}$ | $40,0\pm6,2^{b}$ | $85,0\pm9,8^{ab}$ |
| *S. pilcomayense* (1) | $32,4\pm4,7^{b}$ | $100\pm0^{a}$ | $0\pm0^{c}$ | $100\pm0^{a}$ | $17,8\pm4,7^{c}$ | $100\pm0^{a}$ | $80,1\pm7,6^{ab}$ | $76,0\pm7,2^{b}$ |
| *S. pilcomayense* (2) | $32,8\pm4,8^{b}$ | $100\pm0^{a}$ | $27,4\pm3,7^{bc}$ | $100\pm0^{a}$ | $0\pm0^{c}$ | $100\pm0^{a}$ | $35,5\pm1,2^{c}$ | $100\pm0^{a}$ |
| *S. caavurana* | $50,4\pm5,5^{b}$ | $88,3\pm2,2^{a}$ | $18,2\pm3,2^{bc}$ | $55,7\pm4,3^{b}$ | $71,0\pm3,9^{bc}$ | $100\pm0^{a}$ | $75,2\pm6,0^{b}$ | $100\pm0^{a}$ |
| *L. megapotamica* | $62,9\pm5,4^{b}$ | $23,6\pm5,3^{b}$ | $34,6\pm4,2^{b}$ | $22,5\pm4,4^{bc}$ | $0\pm0^{c}$ | $34,6\pm3,4^{bc}$ | $42,8\pm1,2^{bc}$ | $56,0\pm2,3^{b}$ |

A partir de las Tablas 12 y 13 se pueden destacar algunos comentarios: de todos los extractos DCM obtenidos de las 21 especies evaluadas frente a *P. digitatum*, ninguno de ellos presentó 100% de inhibición contra este patógeno, pero los más activos después de 7 días de

incubación fueron los correspondientes a *T. tricholepis*, *A. inundata*, *P. stelligerum* y *P. acuminata* (80,0, 79,3, 75,2 y 79,5% de inhibición del crecimiento fúngico, respectivamente). Estos porcentajes disminuyeron después de 14 días de incubación a 76,8, 60,3, 50,2 y 64,0%, respectivamente. La inhibición de *P. italicum* por los extractos de DCM resultó menor que la de *P. digitatum*, ya que ningún extracto de este tipo superó el 70% de inhibición del crecimiento a los 7 días después de la inoculación, excepto el extracto DCM de *P. acuminata* que arrojó un 85,2% de inhibición contra este patógeno causante del moho azul. En contraste, varios extractos DCM mostraron una alta inhibición contra *G. citri-aurantii* (*O. virgata*, *T. tricholepis*, *A. inundata*, *P. lapathifolium*, *P. acuminata* y algunas especies de *Solanum* disminuyeron el crecimiento fúngico en más del 70%) y sorprendentemente, los extractos DCM de *F. clausum*, *P. alliacea* y *P. acuminata* interrumpieron completamente el crecimiento de *G. citri-aurantii* incluso 14 días después de la inoculación, lo que representa potentes productos fungicidas. Respecto a *P. citricarpa*, ninguno de los extractos DCM presentó 100% de inhibición, pero los más activos después de 7 días de incubación se obtuvieron de *A. brachystephana* (96,4%), *O. virgata* (2) (90,0%), *T. tricholepis* (95,2%), *A. inundata* (84,6%), *V. caven* (96,6%), *P. alliacea* (92,0%), *P. stelligerum* (84,8%), *P. lapathifolium* (90,0%), *C. montevidensis* (94,2%), *P. zapallo* (96,3%), *S. argentinum* (1) (80,2%), *S. pilcomayense* (1) (88,1%) y *S. caavurana* (90,6%). Estos porcentajes disminuyeron después de 14 días de incubación al 78,4%, 50,5%, 77,2%, 73,2%, 35,0%, 47,4%; 49,5%, 19,0%, 75,1%, 65,7%, 44,2%, 80,1% y 75,2%, respectivamente.

En cuanto a los extractos MeOH, se puede observar que fueron más activos que los extractos DCM, probablemente debido a las diferentes capacidades de extracción y a la presencia de sustancias más polares como compuestos fenólicos, alcaloides o glucósidos flavonólicos. Los extractos metanólicos de *O. virgata* (2), *F. clausum*, *T. tricholepis*, *P. alliacea*, *P. stelligerum*, *P. lapathifolium*, *P. zapallo* y *S. caavurana* inhibieron el crecimiento de *P. digitatum* en más del 80%. Además, los extractos MeOH correspondientes a *A. inundata*, *P. acuminata* y las dos colecciones de *S. pilcomayense* presentaron 100% de inhibición frente a *P. digitatum* incluso pasados los 14 días después de la inoculación. La inhibición de *P. italicum* por extractos MeOH no fue tan alta como la inhibición de *P. digitatum*: los extractos de *P. alliacea* y *S. caavurana* inhibieron en 81.3 y 87.8% respectivamente, pero esta actividad disminuyó después de 14 días. Sorprendentemente, *A. inundata*, *P. acuminata* y ambas colecciones de *S. pilcomayense* mantuvieron el 100% de actividad inhibidora de *P. italicum* durante más de 14 días. Respecto a *G. citri-aurantii*, su crecimiento fue inhibido al 100% por más de 14 días por los extractos MeOH de *O. virgata* (2), *P. acuminata*, ambas colecciones de *S. pilcomayense* y *S. caavurana*, siendo también destacable la actividad del extracto MeOH de *A. inundata* mostrando más del 90% de inhibición incluso 14 días post-inoculación. Finalmente,

para el caso de *P. citricarpa*, si bien varios extractos MeOH mostraron importantes inhibiciones (mayores al 80%) al día 7 de la inoculación, solo los correspondientes a *S. pilcomayense* (2), *S. caavurana* y *P. acuminata* conservaron el 100% de inhibición del agente causal de la mancha negra luego de 14 días de incubación.

**Análisis de los porcentajes de extractos activos, moderadamente activos e inactivos**

Los resultados se dividieron en las siguientes categorías de acción fungicida para el análisis porcentual: extracto inactivo (inhibición del crecimiento de hongos inferior al 50%), extracto moderadamente activo (inhibición del crecimiento de hongos entre 50 y 80%) y extracto activo (inhibición del crecimiento de hongos superior al 80%). Según esta clasificación, el 5% de los extractos DCM probados contra *P. digitatum* fue clasificado como activo, el 76% de ellos fueron moderadamente activos y el 19% resultaron inactivos después de 7 días de inoculación. El porcentaje de extractos de DCM moderadamente activos disminuyó del 76% al 48% y el porcentaje de extractos inactivos aumentó del 19% al 52% a los 14 días de incubación. Estos resultados pueden sugerir que algunos extractos de DCM podrían ser fungistáticos por un período corto, pero no fungicidas. Para *P. italicum*, la mayoría de los extractos DCM fueron inactivos (90%), y solo el 5% de ellos resultaron activos y moderadamente activos después de 7 días de incubación. Luego de los 14 días, ese 5% de extractos DCM activos pasaron a ser moderadamente activos, quedando un 10% de extractos en esta última categoría y el 90% de ellos inactivos. Este hongo representa el más resistente a los extractos DCM entre las cuatro cepas fitopatógenas en estudio. Por el contrario, *G. citri-aurantii* fue el fitopatógeno más susceptible a los extractos de DCM, ya que el 38% de ellos resultaron activos a los 7 días, pero disminuyeron al 24% a los 14 días después de la inoculación; el 57% fueron moderadamente activos después de los 7 días y disminuyeron al 14% después de 14 días; y el porcentaje de extractos DCM inactivos DCM contra *G. citri-aurantii* fue del 5 % después de 7 días, aumentando al 62 % después de 14 días. Esto indica también varios extractos con propiedades fungistáticas y no fungicidas. En el caso de *P. citricarpa,* el 62% de los extractos DCM fueron activos, el 38% de ellos fueron moderadamente activos, y no hubo extractos DCM inactivos a los 7 días de inoculación; pero luego de 14 días, el porcentaje de extractos activos disminuyó considerablemente al 5%, aumentando concomitantemente el porcentaje de extractos DCM inactivos que alcanzó un 52% (Figura 16).

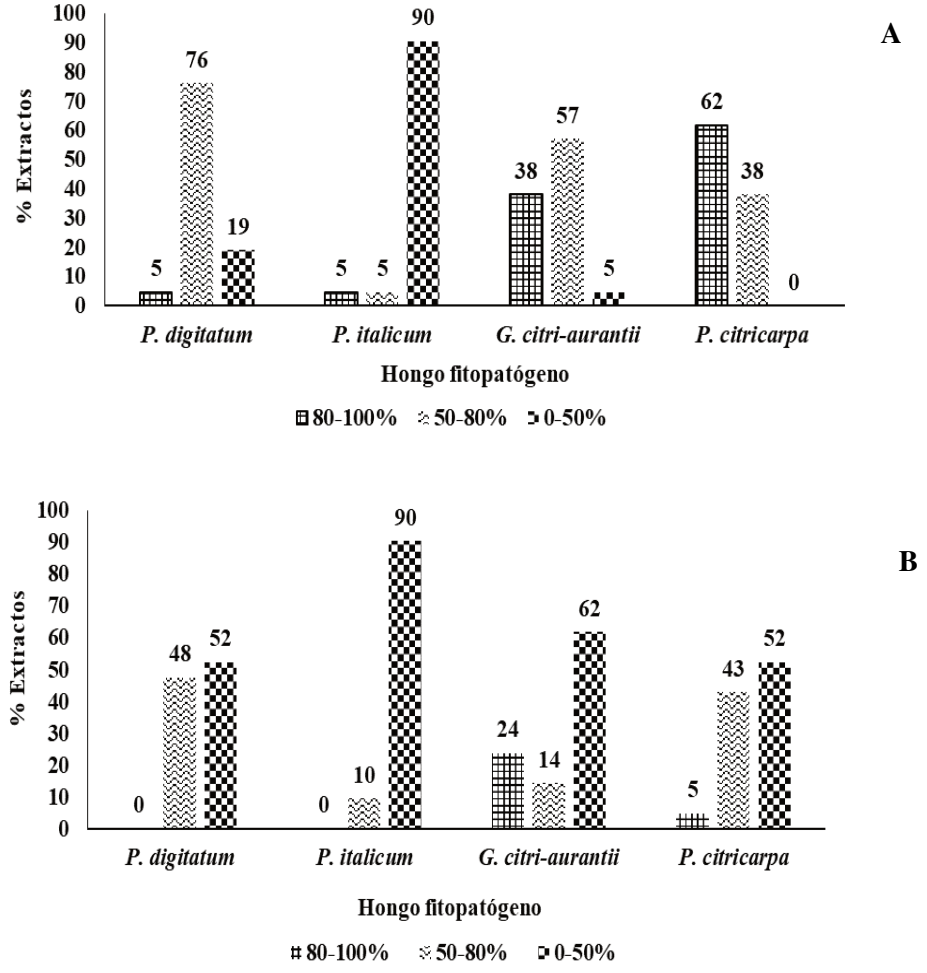



**Figura 16**: Porcentaje de extractos DCM activos, moderadamente activos e inactivos evaluados contra cada hongo fitopatógeno. **A.** 7 días y **B.** 14 días después de la inoculación.

Respecto a los extractos MeOH (Figura 17), el 57% fueron activos, el 33% moderadamente activos y el 10% inactivos contra *P. digitatum* a los 7 días post inoculación; y después de 14 días, el 24% permanecieron activos, el 24% resultaron moderadamente activos, y el porcentaje de extractos MeOH inactivos frente a este hongo se incrementó al 52%. Además, 29%, 33% y 38% de los extractos MeOH fueron activos, moderadamente activos e inactivos, respectivamente, contra *P. italicum* 7 días después de la inoculación; mientras tanto, los porcentajes de extractos activos y moderadamente activos disminuyeron después de 14 días a 19 y 10%, respectivamente, aumentando al 71% los extractos MeOH inactivos. Los porcentajes de extractos MeOH activos contra *G. citri-aurantii* fueron los mismos a los 7 y 14 días post-inoculación (29%), pero los extractos moderadamente activos a los 7 días (48%) disminuyeron al 0% después de 14 días, aumentando los porcentajes de extractos inactivos al 71%. Estos resultados pueden sugerir que los extractos MeOH que mostraron fuertes actividades contra *G.*

*citri-aurantii* tienen potencial como fungicidas debido a que su actividad se mantiene durante más de 14 días (Figura 17). Respecto a *P. citricarpa*, 67%, 33% y 0% de los extractos MeOH fueron activos, moderadamente activos e inactivos, respectivamente; estos porcentajes disminuyeron a 24% y 38% respectivamente, aumentando concomitantemente el porcentaje de extractos MeOH inactivos al 38% luego de 14 días.

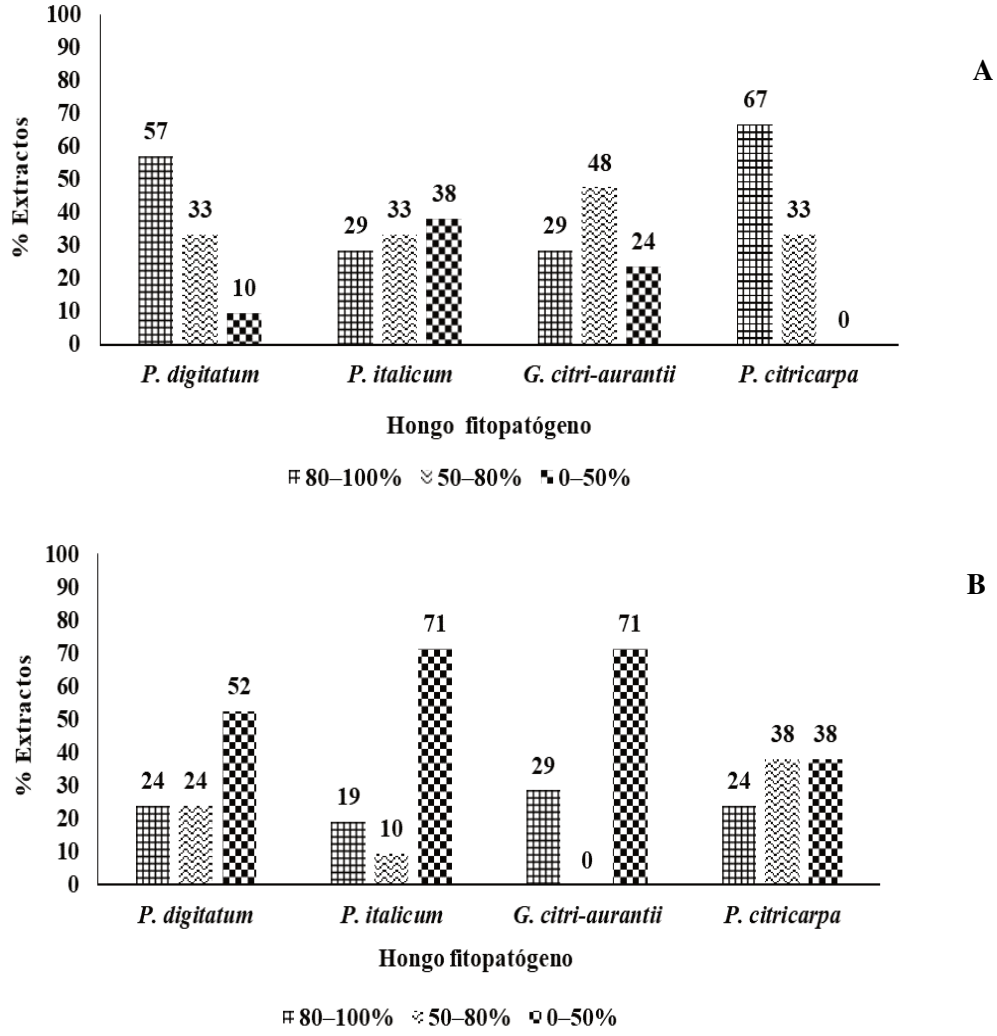



**Figura 17**: Porcentaje de extractos MeOH activos, moderadamente activos e inactivos evaluados contra cada hongo fitopatógeno. **A.** 7 días y **B.** 14 días después de la inoculación.

### Determinación del porcentaje de inhibición fúngica mediante bioensayo de volátiles para las especies productoras de aceites esenciales

En la Tabla 14 se muestran los resultados de los intervalos de confianza para el valor de la media de inhibición.

**Tabla 14**: Promedios de los porcentajes de inhibición en placas por triplicado (%) de los aceites esenciales evaluados. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) con respecto al control + y -.

| | | **Porcentajes de inhibición (%)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Nombre científico | Abreviatura | *P. digitatum* | *P. italicum* | *G. citri-aurantii* | *P. citricarpa* |
| *S. molle* | AE Sm | 43,3±1,8 $^{bc}$ | 58,1±1,3 $^{b}$ | 27,5±1,2 $^{cd}$ | 33,5±2,3 $^{bc}$ |
| *P. graveolens* | AE Pg | 100±0 $^{a}$ | 100±0 $^{a}$ | 49,8±2,2$^{b}$ | 4,8±1,4$^{cd}$ |
| *M. linearis* | AE Ml | 100±0 $^{a}$ | 100±0 $^{a}$ | 27,5±1,6$^{cd}$ | 36,4±1,4 $^{bc}$ |
| *L. alba* | AE La | 47,6±1,4$^{bc}$ | 65,0±1,3$^{b}$ | 47,3±3,2 $^{b}$ | 29,2±1,5 $^{cd}$ |
| *L. turbinata* | AE Lt | 100±0$^{a}$ | 60,7±1,5$^{b}$ | 41,4±9,2 $^{bc}$ | 50,6±2,1$^{b}$ |
| Control + 0±0$^{d}$ Control – (IMZ) 100±0$^{a}$ | | | | | |

Basado en los resultados mostrados en la Tabla 14, se puede observar que el AE de *S. molle* inhibió el crecimiento de *P. italicum* en un 58,1%, siendo este el mayor porcentaje alcanzado de inhibición respecto a los demás hongos fitopatógenos; el menor porcentaje de inhibición fue del 27,5% contra *G. citri-aurantii.* El AE de *P. graveolens*, inhibió el 100% del crecimiento de ambas cepas de *Penicillium*, equiparando su acción al fungicida comercial IMZ; mientras que la acción contra *G. citri-aurantii* fue intermedia y nula la inhibición contra *P. citricarpa*. En el caso de *M. linearis,* el AE alcanzó el 100% de inhibición frente a *P. digitatum* y *P. italicum*; mientras que frente a *G. citri-aurantii* y *P. citricarpa* los valores no alcanzaron el 40% de inhibición. El AE de *L. alba* inhibió en un 65,0% el crecimiento de *P. italicum*; pero frente a los demás hongos, los valores de inhibición alcanzados fueron considerablemente inferiores. En cuanto al AE de *L. turbinata*, logró el 100% de inhibición contra *P. digitatum*, para *P. italicum* fue inhibitorio al 60,7%, mientras que frente a *G. citri-aurantii* y *P. citricarpa* inhibió el 41,4% y 50,6% del crecimiento, respectivamente.

El análisis de los AE en relación a las distintas categorías de actividad para cada especie fúngica es indicativo de su sensibilidad a los AE evaluados (Figura 18).

Se observó que el 60% de los AE evaluados fue activo contra *P. digitatum* y el 40% de ellos fue inactivo contra este hongo. Para el caso de *P. italicum*, el 40% de las muestras de AE evaluadas fueron activas y el 60%, moderadamente activas. Ninguno de los AE evaluados alcanzó la categoría de moderadamente activo o activo (≥ 50% de inhibición) contra *G. citri-aurantii*, por lo que el 100% de las muestras de AE evaluadas resultaron inactivas para este patógeno. Finalmente, solo un 20% de las muestras de AE evaluadas resultaron moderadamente activas contra *P. citricarpa*.

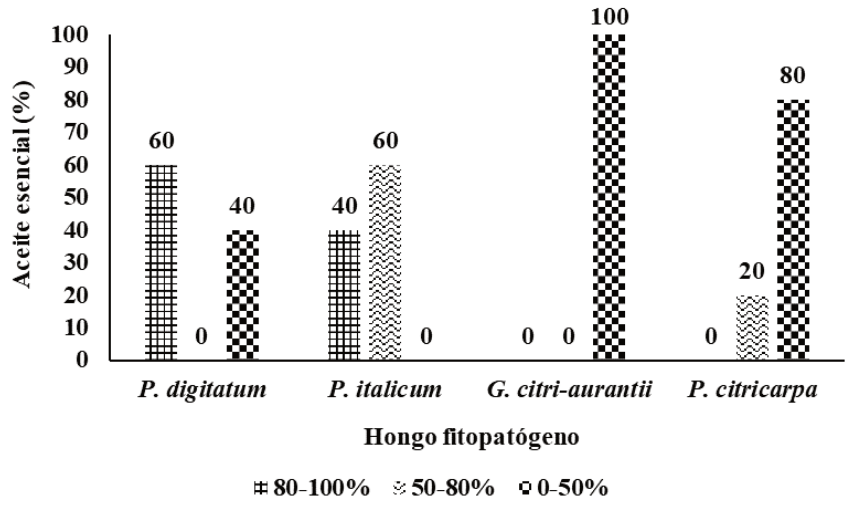



**Figura 18**: Porcentajes de aceites esenciales activos, moderadamente activos e inactivos evaluados contra cada hongo fitopatógeno a los 7 días después de la inoculación.

**Discusión**

En este capítulo se evaluó un número considerable de especies de plantas nativas argentinas por sus propiedades fungicidas contra cuatro patógenos de cítricos económicamente importantes; sólo siete de ellas han demostrado una alta inhibición fúngica de sus extractos fijos, y otras tres han demostrado actividad por sus aceites esenciales. Un resultado interesante a destacar son los casos de *O. virgata* y *S. pilcomayense*, que fueron colectadas en dos localidades diferentes en la misma fecha. La elevada actividad fungicida de *O. virgata* solo se observó en una de las colecciones (Gral. Obligado, Santa Fe, 28°42'54.8"S 59°23'13.7"O); mientras tanto, la potente actividad de *S. pilcomayense* se evidenció para ambas colecciones (Gral. Obligado, Santa Fe, 28°13'42.2"S 59°06'52.6"O y San Javier, Santa Fe, 30°03'23.2"S 59°51'34.8"O). Este hecho indica la importancia de las condiciones ambientales en la producción de metabolitos secundarios bioactivos (Derita *et al*., 2009). Además, los extractos MeOH fueron más activos que los extractos de DCM, especialmente contra ambas especies de *Penicillium*, los dos fitopatógenos que fueron más difíciles de controlar en este trabajo. Respecto a *Geotrichum*, ambos tipos de extractos (DCM y MeOH) mostraron más del 50% de inhibición en su mayoría. En cuanto a *P. citricarpa,* tanto los extractos DCM como los MeOH presentaron actividades destacadas a los 7 días de incubación, pero decayeron a los 14 días.

Una revisión bibliográfica de las siete especies más activas por sus extractos fijos, permite afirmar que apenas han sido evaluadas frente a otras actividades microbiológicas, y en algunos casos se encontraron pocas referencias. Destacando la importancia del conocimiento de

nuestras fuentes nativas, a continuación, se presenta una discusión sobre sus actividades biológicas y estudios fitoquímicos encontrados en la literatura:

*O. virgata* pertenece a la familia Apocynaceae y se la conoce comúnmente como "Liana de leche" (Paye *et al*., 2021). Hasta donde sabemos, no existen reportes sobre las bioactividades y fitoquímica de esta especie e incluso de su género, lo que convierte a *O. virgata* en una fuente interesante para seguir estudiando. Se ha informado ampliamente sobre la familia Apocynaceae por compuestos que contienen el núcleo alcaloidal indol y que están bajo uso clínico, incluidos vinblastina y vincristina (anticancerígenos), atevirdina (anti-VIH), yohimbina (disfunción eréctil), reserpina (antihipertensión), ajmalicina (trastornos vasculares), ajmalina (antiarrítmico) y vincamina (vasodilatador). Los principales géneros de la familia Apocynaceae son *Alstonia*, *Rauvolfia*, *Kopsia*, *Ervatamia* y *Tabernaemontana*. Estos géneros constan de 400 miembros que representan el 20% de las especies de Apocynaceae, pero solo se investigaron 30 (7,5%) especies, mientras que el resto promete ser investigado. *Orthosia* no pertenece al género más estudiado de esta familia, hecho que lo hace aún más atractivo. Los alcaloides indol monoterpénicos presentes en esta familia merecen la curiosidad y atención de los investigadores debido a su diversidad química y actividades biológicas (Mohammed *et al*., 2021). Los resultados de actividad fungicida obtenidos para esta especie, amplían los usos antes descriptos para la familia, probablemente debidos a los alcaloides indólicos terpénicos descriptos en ella.

*F. clausum*, también pertenece a la familia Apocynaceae y se le conoce comúnmente como "Bejuco sapo" (Rodríguez *et al*., 2021). Estas plantas exudan látex blanco pegajoso que contiene las endopeptidasas funastrain y funastrain c II que exhiben actividad proteolítica de cisteína (Morcelle *et al*., 2006). Este hecho puede ser la razón por la cual los productos obtenidos de esta especie proporcionaron una potente acción fungicida durante los ensayos desarrollados en este trabajo. Este fue el único reporte encontrado en la literatura para esta especie y su género, por lo que constituye una de las especies prometedoras pertenecientes a la familia Apocynaceae mencionada anteriormente (Mohammed *et al*., 2021).

*A. inundata* pertenece a la familia Fabaceae y comúnmente se la conoce como "Pacará", "Timbó blanco" o "Palo flojo" (Zabala *et al*., 2021). El género *Albizia* se caracteriza fitoquímicamente por la presencia de lignanoides, flavonoides y glucósidos fenólicos (He *et al*., 2020). Además, las saponinas triterpénicas del tipo ácido oleanólico aisladas de *A. inundata* mostraron citotoxicidad contra células de melanoma y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en humanos (Hussain, 2018; Zhang *et al*., 2011). Estos compuestos mostraron también altas actividades antiplasmodiales y anticándidas, probablemente debido a la capacidad de las saponinas triterpénicas para alterar las membranas celulares (Shetu, 2015). Por lo tanto,

es posible que las saponinas de *A. inundata* sean responsables de las actividades antifitopatógenas encontradas en este trabajo.

*P. alliacea* pertenece a la familia Phytolaccaceae y se la conoce comúnmente como "Guiné", "Pipi" o "Mucuracaá" (Luz *et al*., 2016; Blainski *et al*., 2010). Los estudios farmacológicos informaron que los extractos obtenidos de diferentes partes de *P. alliacea* mostraron diversos efectos sobre el comportamiento animal que afectan el sistema nervioso central (Blainski *et al*., 2010). Se demostró que los extractos metanólicos obtenidos del tallo y las hojas presentaron 100% de mortalidad larvaria y adulta del parásito bovino *Rhipicephalus microplus*. Este resultado propuso que *P. alliacea* puede ser un acaricida prometedor contra cepas resistentes de *R. microplus* (Rosado-Aguilar *et al*., 2010). Se ha informado ampliamente sobre las actividades antimicrobianas de *P. alliacea*: (1) los extractos hexánicos inhibieron *Staphylococcus aureus* con una CIM de 240 µg/ml; (2) el extracto metanólico mostró actividad contra *Enterococcus faecalis* (CIM = 240 µg/mL); (3) el extracto hidroalcohólico fue activo contra *Candida parapsilosis* (CIM = 250 µg/mL), *C. kefyr* y *C. albicans* (CIM = 760 µg/mL); (4) El principio activo (Z)-tiobenzaldehído-S-óxido obtenido de *P. alliacea* demostró actividad antimicrobiana contra *C. albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *S. aureus* y *S. agalactiae* (Silva do Nascimento *et al*., 2018). Además, los tiosulfonatos aislados de esta planta y sus productos de degradación inhibieron a bajas concentraciones (valores CIM $\leq$ 64 µg/mL) los siguientes microorganismos: *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *E. coli*, *Stenotrophomonas maltophila*, *K. pneumoniae* y los hongos *Aspergillus flavus*, *Mucor racemosus*, *Pseudallescheria boydii*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Issatchenkia orientalis* (Silva do Nascimento *et al*., 2018; Ramos y Machado, 2020). Un compuesto llamado DTS, que es un polisulfuro identificado a menudo en *P. alliacea*, provocó un desmontaje reversible de los microtúbulos mediante la disminución de la expresión total de tubulina (0,1 µM) y provocó una disminución en la fosforilación de las proteínas quinasas erk1/erk2 (0,5 µM) en la línea celular SH-SY5Y, lo cual puede ser el modo de acción de sus actividades biocidas (Silva do Nascimento *et al*., 2018). Algunos estudios afirman que la bioactividad de los extractos de hojas de *P. alliacea* podría atribuirse al principal metabolito triterpénico denominado isoarborinol (Zavala-Ocampo *et al*., 2017).

*S. pilcomayense* pertenece a la familia Solanaceae y se le conoce comúnmente como "Tomatillo del monte" (Palchetti *et al*., 2020). Se han encontrado pocos reportes en la literatura sobre sus componentes o bioactividades; en un estudio muy destacado demostraron cierta actividad antiprotozoaria de extractos de partes aéreas contra *Trypanosoma cruzi* y *Trichomonas vaginalis* (Muelas-Serrano *et al*., 2000). Más recientemente, un estudio examinó las composiciones antioxidantes y sus capacidades en tres cultivares de tamarillo (*Solanum* spp.) de

Nueva Zelanda. Demostraron que las cáscaras de tamarillo poseían mayores cantidades de compuestos fenólicos, contenido fenólico total y actividad antioxidante que las pulpas. Las pulpas presentaron mayor concentración de antocianinas que las cáscaras. La capacidad antioxidante de los tamarillos exhibió valores relativamente altos y estuvo fuertemente correlacionada con un alto contenido fenólico total. La presencia de estos compuestos bioactivos resalta el potencial del tamarillo para una mayor utilización en las industrias alimentaria y farmacéutica. El tamarillo sigue estando infrautilizado a pesar de sus componentes bioactivos (Diep *et al*., 2020).

*S. caavurana* también pertenece a la familia Solanaceae y se la conoce comúnmente como "Palo agui", "Laranjinha do mato" o "Jurubeba-branca" (Palchetti *et al*., 2020). Los frutos maduros de *S. caavurana* contienen una amplia variedad de alcaloides esteroidales como 4-tomatiden-3-ona, 5α-tomatidan-3-ona y caavuranamida, así como glicoalcaloides. En cuanto a los componentes nutricionales del fruto, contiene proteínas (4,2%), lípidos (1,5%) y carbohidratos (56,7%). La caavuranamida bioactiva (alcaloide esteroideo) mostró una actividad antibacteriana significativa (CIM = 135 µg/mL) contra *Rhodococcus equi*, un valor similar al cloranfenicol comercial (CIM = 124 µg/mL) (Vaz *et al*., 2012). Los frutos de las solanáceas constituyen una fuente de alimento en muchos países. En un estudio reciente, se evaluó la composición aproximada de dos frutos de Solanaceae de la región del Cerrado brasileño. Los resultados mostraron que la pulpa tenía un alto contenido de humedad (74,6–85,4 g/100 g) y fibra soluble (1,3–2,0 g/100 g), y bajo contenido de grasa, proteína y cenizas. El potasio es el principal mineral que se encuentra en ambas frutas. Los componentes principales revelaron 24 compuestos fenólicos, la mayoría derivados de ácidos hidroxicinámicos y ácido clorogénico. La capacidad antioxidante de los frutos osciló entre 1,3 y 11,5 µmol TE/100 ml de extracto (Pereira *et al.,* 2019). Estos resultados indicaron que el género *Solanum* puede ser interesante para el mercado frutícola brasileño y que tiene potencial para ser explotado para la diversificación agroindustrial de productos frutícolas. Además, nuestro trabajo demostró la capacidad fungicida de una especie relacionada de *Solanum*.

Finalmente, *P. acuminata* pertenece a la familia Polygonaceae, es conocida comúnmente como "catay grande", "yerba del bicho", "sanguinaria del agua", "cien nudos", "lagunilla", "yerba picante", "plumerillo del campo", "capiticova", "erva de bicho", "smarteed, bloodroot", "knotweed" o "ca´atái" (Lahitte *et al*., 1998). Diferentes extractos de partes aéreas de *P. acuminata* se utilizan en la medicina tradicional argentina para curar heridas infectadas y para otras dolencias relacionadas con las infecciones fúngicas (Derita *et al*., 2009). El género es conocido por producir una gran variedad de metabolitos secundarios, como fenilpropanoides, acetofenonas, chalconas, cumarinas, flavonoides, lignanos, naftoquinonas, antraquinonas,

sesquiterpenoides, triterpenoides, estilbenoides y taninos (Derita *et al*., 2009). En varias especies se encontraron sesquiterpenos del tipo drimano, los cuales serían los responsables de la actividad antifúngica de los extractos. Se demostró que el extracto diclorometánico de las partes aéreas cosechadas en otoño poseía actividad antifúngica frente a los patógenos humanos *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* (Derita *et al*., 2009; Derita y Zacchino, 2011). El compuesto poligodial demostró que una CIM de 16 µg/ml inhibió el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* y con CIM de 64 µg/mL a *F. oxysporum* y *Phytophthora spp*, todos estos patógenos de tomate (Montenegro *et al*., 2018). Los resultados de esta tesis, aportan nuevos hallazgos sobre la actividad fungicida de esta especie.

En cuanto a las especies evaluadas en función del aceite esencial producido, sólo tres de ellas han demostrado una alta inhibición fúngica: *P. graveolens*, *M. linearis* y *L. turbinata.*

*P. graveolens* presentó actividad antifúngica frente a *P. digitatum* y *P. italicum.* Pertenece a la familia Geraniaceae, se conoce comúnmente como: "malva rosa", "gerânio", "rose geranium", "rose-scent geranium", "gerânio", "sardinheira" (IRUPE, 2021; USDA, 2019). Los principales compuestos del aceite esencial son geraniol (24,89%), citronelol (19,50%), linalool (10,92%) y γ-eudesmol (8,93%) (Stegmayer *et al*., 2022b). Posee propiedades antibacterianas, antifúngicas e insecticidas (Ghannadi *et al*., 2012). El aceite de *P. graveolens* presentó un fuerte efecto inhibitorio sobre cepas de bacterias gram positivas como *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. aureus* (Silva y Fernandes, 2010). Evaluaron la capacidad antifúngica en *Rhizoctonia solani* siendo efectivo en una dosis de 12,5 mL/20mL de APD y se además, se demostró su efecto antifúngico contra cinco cepas de *Aspergillus* con CIMs y CFMs (mg/ml) de 0,25 a 2,5 (Bouzenna y Krichen, 2013).

*M. linearis* presentó actividad antifúngica frente a *P. digitatum* y *P. italicum*. Pertenece a la familia Myrtaceae, es conocida comúnmente como "Limpiatubo" o "Narrow leaf bottle rush" (Das *et al.,* 2009). Los miembros del género *Melaleuca* se han utilizado durante mucho tiempo en medicinas populares en varias partes del mundo (Sharifi-Rad *et al*., 2017). El aceite esencial de *M. quinquinervia* (Cav.) S.T. Blake, presentó actividad antihelmíntica, antimicrobiana, antifúngica, antiviral y como repelente de insectos (moscas y mosquitos). Los aceites esenciales se destacan como productos con un rápido desarrollo y posibilidades de aplicación en el tratamiento de semillas (hortalizas) y como plaguicidas (en cítricos, hortalizas y otros) (Pino *et al.*, 2011). La composición principal de esta mezcla compleja es de 1,8-cineol (63%), α-pineno, β-pineno, α-felandreno, limoneno, p-cimeno, linalool, terpinen-4-ol y α-terpineol (Brophy *et al*., 1998). El aceite esencial del género *Melaleuca* spp. se ha informado que posee propiedades antibacterianas y antifúngicas eficaces *in vitro* (Sharifi-Rad *et al*., 2017). Inhibió a *S. aureus, E. coli, B. cereus* con CIM = 0,0625 mg/ml (Silva *et al*., 2010). El extracto

metanólico demostró propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. Inhibió bacterias Gram positivas (*B. subtilis*, *B. megaterium*), Gram negativas (*E. coli*, *Vibrio mimicus*) (Kumar *et al*., 2015). Haque *et al*., (2013) realizaron maceraciones y posteriormente extractos con éter de petróleo, tetracloruro de carbono, metanol y acetato de etilo; estos fueron evaluados mediante el método de difusión en disco contra un panel de diez bacterias (5 Gram positivas y 5 Gram negativas) y tres hongos *S. cereviceae, C. albicans* y *A. niger*; y resultaron en una sensibilidad moderada a potente contra casi todos.

*L. turbinata,* presentó actividad antifúngica frente *P. digitatum*. Integra la familia Verbenaceae, es una especie conocida como "poleo", "poleo fino", "hierba poleo", "té criollo", "menta poleo" o "té del país" (IRUPE, 2021; Hurrell *et al*., 2011). Su parte aérea se emplea en Argentina como digestivo, diurético, tónico amargo, emenagogo, y abortivo (Campos-Navarro y Scarpa, 2013). La esencia de las partes aéreas presentó efecto antiviral (Hurrell *et al*., 2011). Sus hojas contienen iridoides, flavonoides, aceite esencial (0,2-0,8%) compuesto principalmente por lipiona (1,2-epoxipulegona), d-limoneno, cineol, lipiafenol, dihidrolipiona, carvona, y 1,8-cineol, entre otros (Terblanche y Kornelius, 1996; Bailac *et al*., 2006). Extractos metanólicos que poseían flavonoides de plantas de la zona de Tucumán (Argentina), exhibieron actividades antimicrobianas en bacterias Gram positivas y Gram negativas con dosis equivalentes a cloranfenicol (Hernández *et al*., 2000). La exposición de maníes a vapores del aceite esencial de poleo permitió evitar la contaminación con hongos del género *Aspergillus* (Passone y Etcheverry, 2014). En otros usos no microbianos, el aceite esencial demostró efectos repelentes frente al ácaro *Verroa destructor* y larvicida frente a *Culex quinquefasciatus* (Ruffinengo *et al*., 2005; Kembro *et al*., 2009).

**Conclusión**

Se han realizado muchos esfuerzos para promover la reducción del uso de fungicidas químicos en la poscosecha de frutas en todo el mundo. En este sentido, el uso de microorganismos como controladores biológicos ha estado muy desarrollado en las últimas décadas, pero en ocasiones se ha cuestionado su seguridad. La alta capacidad de mutación puede convertir una bacteria benéfica en una patógena que podría causar enfermedades en las plantas o en los humanos. Por otro lado, las especies vegetales contienen una mezcla compleja de moléculas que deberían explorarse, no sólo para tratar enfermedades humanas sino también para prevenir y controlar enfermedades de frutas o plantas. Por lo que se debe incentivar este tipo de estudios para reducir el uso de agroquímicos, especialmente en fincas pequeñas. Mediante un método de detección de alto rendimiento, en este capítulo se demostró que productos obtenidos de siete plantas nativas argentinas (*O. virgata*, *P. alliacea*, *F. clausum*, *A. inundata*, *S. caavurana*, *S. pilcomayense* y *P. acuminata*) inhibieron el 100% del crecimiento de al menos

uno de los cuatro fitopatógenos estudiados (*P. digitatum*, *P. italicum*, *G. citri-auranti* y *P. citricarpa*). Además, los AE obtenidos de *P. graveolens*, *M. linearis* y *L. turbinata* demostraron un buen desempeño frente a dos de los patógenos estudiados (*P. digitatum* y *P. italicum*) que fueron inhibidos en el 100% de su crecimiento *in vitro*.

Los productos naturales obtenidos a partir de los aceites esenciales y extractos estudiados en esta tesis constituyen una alternativa de interés para el control de patógenos *in vitro*. Se necesitan más estudios, como la estandarización química de los extractos y aceites esenciales, su evaluación frente a otros fitopatógenos para detectar espectros y mecanismos de acción, citotoxicidad humana y formulaciones tecnológicas para determinar la dosis correcta para el control de cada enfermedad en frutos.

## Capítulo IV: Ensayos *in vivo* en naranjas var. ´Salustiana´

### Introducción

En cada enfermedad infecciosa, se llevan a cabo una serie de eventos sucesivos más o menos diferentes que propician el desarrollo y la prevalencia de la enfermedad y del patógeno; a esta serie de eventos se llama ciclo de enfermedad. El ciclo de una enfermedad incluye los cambios y síntomas que sufre una planta, así como los que se producen en el patógeno, y los períodos comprendidos en una estación de crecimiento o al cabo de estaciones de crecimiento consecutivas. Los eventos principales del ciclo de una enfermedad incluyen: la inoculación, penetración, establecimiento de la infección, colonización (invasión), crecimiento, reproducción, dispersión y supervivencia del patógeno en ausencia de su hospedante. Por lo tanto, en la enfermedad participan los siguientes factores: la planta (hospedante), el patógeno (total de abundancia, virulencia, etc.), el ambiente (total de condiciones que favorecen a la enfermedad) y el tiempo (Agrios, 2005).

De acuerdo a lo expuesto en el capítulo 2, las pérdidas causadas por enfermedades poscosecha se encuentran entre los principales problemas de la industria de los cítricos en todo el mundo (Sayago *et al*., 2012) que obstaculizan la inocuidad del producto a comercializar, causando daños económicos de hasta un 15% (FEDERCITRUS, 2020). Si bien existen programas a nivel nacional y sistemas de mitigación de riesgos bien desarrollados y diagramados para ciertas plagas y enfermedades, las actividades llevadas a cabo no resultan suficientes ante la amplia presencia en el país que tienen algunas enfermedades. A su vez, existen otros factores que dificultan la realización de tareas de prevención por parte de los productores, como los recursos financieros, la falta de capacitación técnica y el manejo sanitario inadecuado, y la comercialización informal de material de propagación que no cumple la normativa vigente (Carciofi *et al*., 2021). En cuanto a la sanidad vegetal, se han utilizado diversos agroquímicos, desarrollados para promover el crecimiento de las plantas y minimizar el impacto de los hongos patógenos en la salud. Sin embargo, debido a los efectos ambientales adversos de muchos pesticidas y la estricta regulación de su uso, existe una necesidad urgente de reducir aún más su uso, e identificar métodos más sostenibles para la protección de cultivos (Hillocks, 2012).

Como fue expuesto en el capítulo 3, las plantas brindan oportunidades para evaluar y aislar nuevos compuestos antifúngicos (Stegmayer *et al*, 2022; Svetaz *et al*, 2010). En este capítulo se presenta la capacidad fungicida *in vivo* en poscosecha de naranjas de aquellos productos naturales que resultaron más activos en la evaluación *in vitro,* así como también de los que se dispuso en mayor cantidad. Asimismo, se evaluaron parámetros de calidad de las

frutas tratadas con los fungicidas alternativos. Es necesario aclarar que el patógeno *P. citricarpa* no fue evaluado *in vivo* con los productos naturales resultantes de este trabajo, debido a la complejidad de su ciclo de infección que presenta un período de incubación muy largo.

La variedad ´Salustiana´ integra el grupo de naranjas blancas o de jugo. Son importantes por su consumo en fresco y por sus posibilidades de industrialización. Este grupo se destaca por la ausencia de ombligo en sus frutos, mayor acidez que el grupo de naranjas 'navel' y tendencia natural a la alternancia de cosecha; también integran este grupo las variedades ´Delta seedless´, ´Midknight´ y ´Valencia late´ (Micheloud & Pilatti, 2014).

## Materiales y Métodos

### Ensayo de inhibición de patógenos de poscosecha en naranjas var. ´Salustiana´

Se realizaron evaluaciones semanales de frutos de la variedad ´Salustiana´ en estadios correspondiente a la madurez comercial, utilizándose 10 unidades experimentales por cada tratamiento. Las naranjas fueron adquiridas de productores de la zona del centro de Santa Fe que realizan tratamientos convencionales. Se efectuó la desinfección de las naranjas durante 1 minuto con hipoclorito de sodio al 3% V/V y posterior enjuague con agua desmineralizada y luego se secaron al aire (Figura 19).

**Figura 19: A.** Desinfección de las naranjas. **B.** Secado de las frutas.

Los frutos fueron pesados con balanza portátil modelo MH-500 marca Pocket Scale y distribuidos aleatoriamente en grupos de 5 unidades cada uno, con dos repeticiones para cada tratamiento. Se realizó la inoculación en la zona cercana a la incisión del pedúnculo de cada fruta con 10 µl de una suspensión de conidios de $1x10^5$ UFC/mL del patógeno *P. digitatum*, *P. italicum* y *G. citri-aurantii*. Luego de 3 horas de realizada la inoculación, se procedió a la

aspersión de 3 gatillados con las soluciones tratantes T1, T2, T3, T4, T5 y T6. A continuación, se detallan los tratamientos:

T1: Extracto seco diclorometánico de *Persicaria acuminata* a 1000 ppm.

T2: Extracto seco diclorometánico de *Persicaria acuminata* a 2000 ppm.

T3: Extracto seco diclorometánico de *Solanum pilcomayense* a 1000 ppm.

T4: Aceite esencial de *Lippia turbinata* a 1000 ppm.

T5: Control químico Imazalil a dosis comercial

T6: Agua desmineralizada

**Calidad de fruta**

Luego de 7 días expuestas a los tratamientos T1-T6 a 24 °C se evaluó la calidad de las frutas (Plaza *et al*., 2004) y se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad según las siguientes fórmulas propuestas por Matny (2015):

$$\text{Incidencia de la enfermedad (\%)} = (\text{número de frutos de naranja infectados / número total}) * 100$$

$$\text{Severidad de la enfermedad (\%)} = \frac{\sum (\text{N° de frutas naranjas infectadas} \times \text{Escala N°})}{\text{Total de naranjas frutas x N° de escala más alto usado}} * 100$$

La escala de enfermedad que se utilizó para la severidad fue: Grado 0 = no infección; Grado 1 = cuarto de naranja, pudrición de la fruta; Grado 2 = mitad de naranja, pudrición de fruta; Grado 3 = tres cuartos de descomposición de la fruta; Grado 4 = toda la naranja en pudrición (Matny, 2015).

Los parámetros de calidad evaluados fueron: el tamaño (calibre o diámetro ecuatorial) el peso, el porcentaje de jugo, la concentración de sólidos solubles totales y la acidez total titulable (Campana, 2007).

Peso: se determinó mediante balanza portátil modelo MH-500 marca Pocket Scale precisión 0,1g para el total de los frutos para cada tratamiento, al inicio y final del ensayo.

Porcentaje de jugo: Se extrajo el jugo, obtenido de una muestra de 10 frutos por tratamiento, constituyendo cada fruta una réplica por tratamiento para asegurar la aleatorización, con un exprimidor eléctrico Peabody, y se midió la cantidad obtenida con una probeta graduada de 50 mL. Las muestras se filtraron y homogeneizaron para su análisis (Campana, 2007).

Para la obtención del valor de porcentaje de jugo se utilizó la siguiente relación:

| (Volumen de jugo/Peso de las unidades de fruta) * 100 |
|---|

Contenido de sólidos solubles totales (SST): se colocaron 1000 µL de jugo exprimido de cada fruto en forma individual en microtubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, de los cuales se tomaron unas gotas para depositarlas sobre el prisma del refractómetro digital HI 96803 marca Hanna Instruments Rumania de rango 0 a 85% con precisión 0,1 °Brix, previamente calibrado con agua destilada, con el objetivo de que cubra la totalidad del prisma, calibrándose a cero con agua destilada después de cada medición.

Determinación de acidez total titulable: Se tomaron 0,5 mL de jugo de cada Eppendorf y se colocaron en un Erlenmeyer conteniendo 5 ml agua destilada. Luego se incorporó fenoftaleína como indicador. Se procedió así a la titulación del jugo de cada muestra de naranja, con una solución de NaOH 0,1N hasta el viraje del indicador (rosa claro persistente durante 30 s). Los contenidos de ácidos totales fueron determinados como equivalentes de ácido cítrico a través de la siguiente fórmula, según la metodología de Campana (2007):

| Porcentaje de ácido cítrico = ml utilizados de NaOH 0,1N * CTE<br><br>CTE= constante que depende del tipo de ácido predominante en el producto.<br><br>En cítricos el CTE= ácido cítrico= 0,064 |
|---|

Análisis Estadístico: Los datos obtenidos de los distintos parámetros evaluados fueron analizados estadísticamente por medio del Software Estadístico InfoStat®, versión 2016. Las variables se evaluaron empleando el test LSD de Fisher, con un nivel de confianza del 95% (Di Rienzo *et al*., 2008).

## Resultados

### Características externas de calidad

En cuanto a la cuantificación de la severidad de las podredumbres (Matny, 2015), en las figuras 20, 21 y 22, se representan diagramáticamente las escalas que se utilizaron para *P. digitatum*, *P. italicum* y *G. citri-aurantii,* respectivamente.

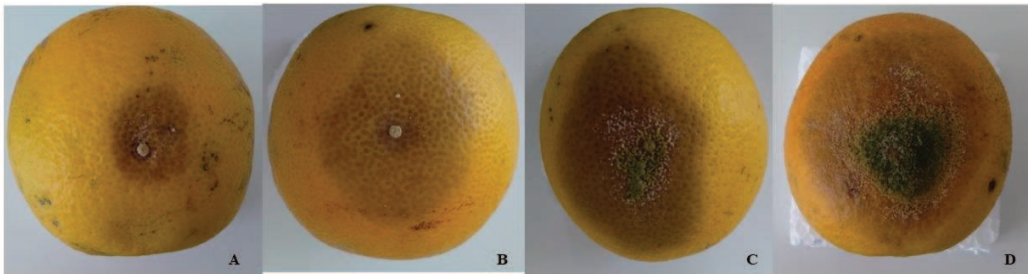



**Figura 20***:* Escala de severidad para *P. digitatum* **A.** Grado 1 = cuarto de naranja, pudrición de la fruta; **B.** Grado 2 = mitad de naranja, pudrición de fruta; **C.** Grado 3 = tres cuartos de descomposición de la fruta; **D.** Grado 4 = toda la naranja en pudrición.

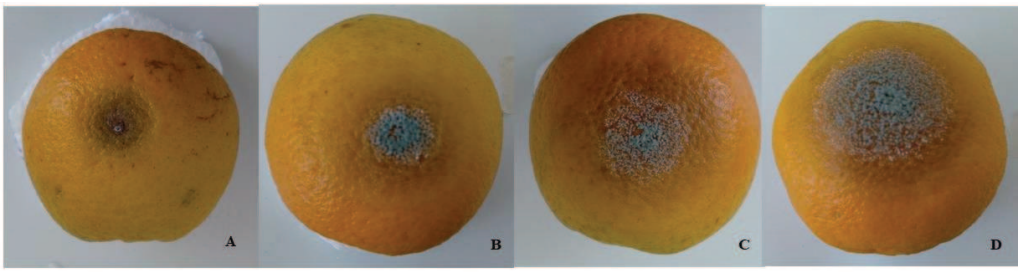



**Figura 21**: Escala de severidad para *P. italicum* **A.** Grado 1 = cuarto de naranja, pudrición de la fruta; **B.** Grado 2 = mitad de naranja, pudrición de fruta; **C.** Grado 3 = tres cuartos de descomposición de la fruta; **D.** Grado 4 = toda la naranja en pudrición.

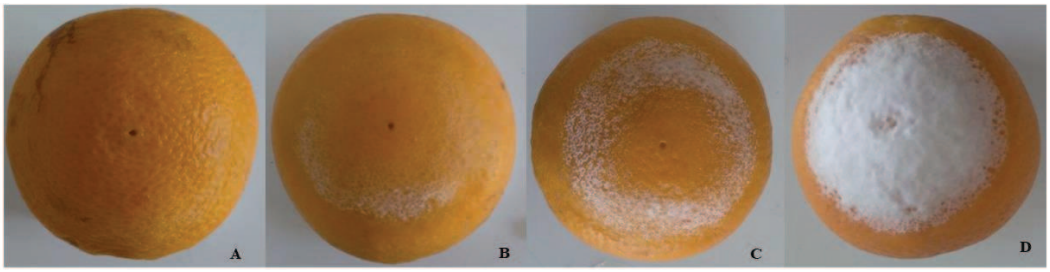


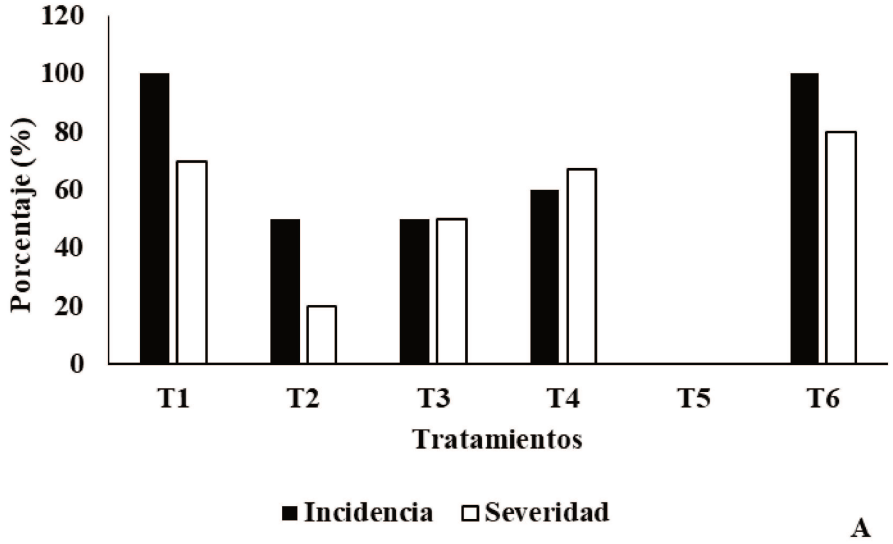

**Figura 22***:* Escala de severidad para *G. citri-aurantii* **A.** Grado 1 = cuarto de naranja, pudrición de la fruta; **B.** Grado 2 = mitad de naranja, pudrición de fruta; **C.** Grado 3 = tres cuartos de descomposición de la fruta; **D.** Grado 4 = toda la naranja en pudrición.

**Incidencia y severidad de la enfermedad**

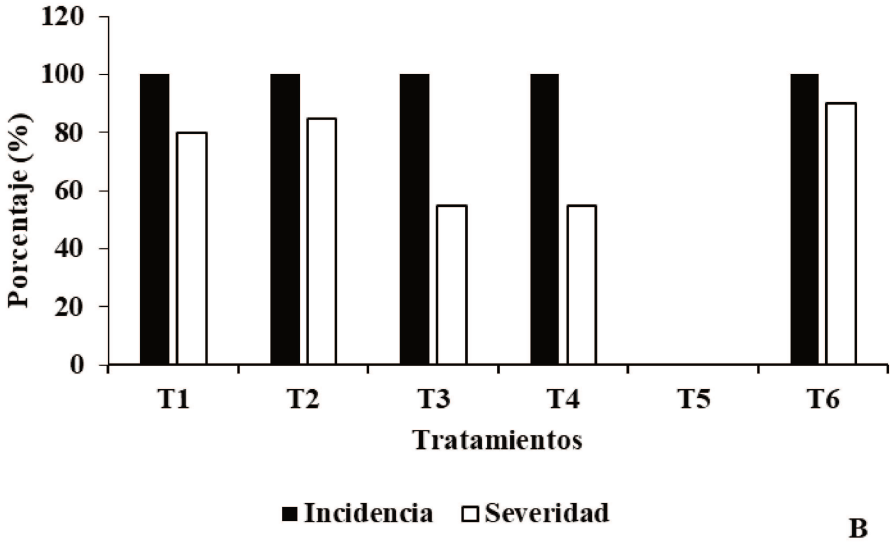
En la Figura 23.A se muestra la incidencia y la severidad de la enfermedad, luego de 7 días de la inoculación con *P. digitatum*. Los tratamientos T1 y T6 alcanzaron el 100% de incidencia, seguidos por el tratamiento T4 que alcanzó el 60%; mientras que los tratamientos T2 y T3 alcanzaron el 50%; y en el caso de T5 resultó nulo el valor de incidencia. Respecto a la severidad, T6 obtuvo un 80%, seguidos por T1 (70%), T4 (67%), T3 (50%), T2 (20%) y por último el tratamiento T5 (0%).

En la Figura 23.B se muestra la incidencia y la severidad de la enfermedad luego de 7 días de la inoculación con *P. italicum*. Los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T6 alcanzaron el mayor porcentaje de incidencia (100%), mientras que para el tratamiento T5 resultó nulo el valor de incidencia. En el caso de severidad, el tratamiento T6 alcanzó el mayor porcentaje (90%), seguidos por T2 (85%), T1 (80%), T3 (55%), T4 (55%) y para el tratamiento T5 el porcentaje de severidad resultó nulo.

En la Figura 23.C se muestra la incidencia y la severidad de la enfermedad luego de 7 días de la inoculación con *G. citri-aurantii*. Los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T6 alcanzaron el mayor porcentaje de incidencia (100%), mientras que en T5 resultó nulo el valor. Cuando se analizó la severidad, el mayor porcentaje lo obtuvo T3 (80%), seguidos por T6 (73%), T1 (70%), T4 (63%), T2 (53%); y por último el tratamiento T5 (0%).




A




B

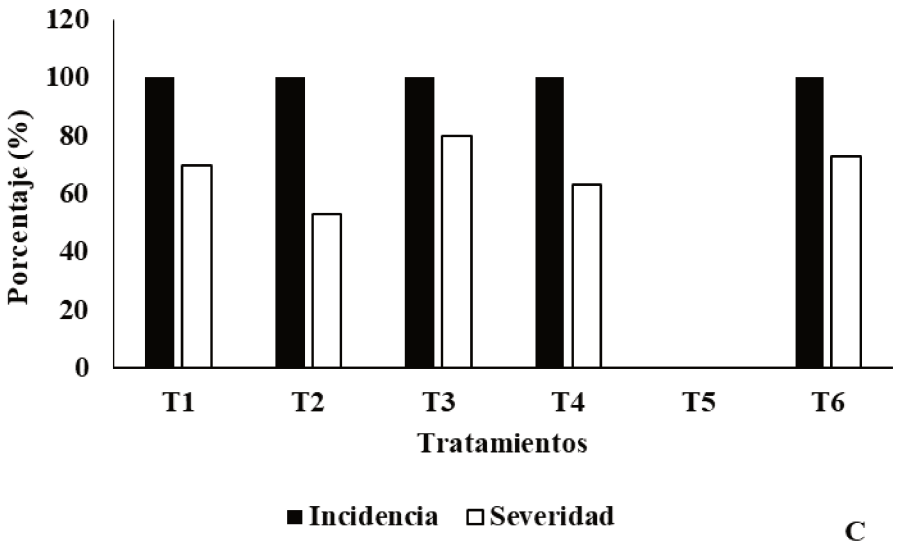



**Figura 23:** Incidencia y severidad de la enfermedad en relación a la infección de **A.** *P. digitatum;* **B.** *P. italicum;* **C.** *G. citri-aurantii*. Tratamientos: extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 1000 ppm (T1), extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 2000 ppm (T2), extracto diclorometánico de *S. pilcomayense* a 1000 ppm (T3), aceite esencial de *L. turbinata* a 1000 ppm (T4), control químico Imazalil a dosis comercial (T5) e inoculado + agua desmineralizada (T6).

**Calidad de fruta**

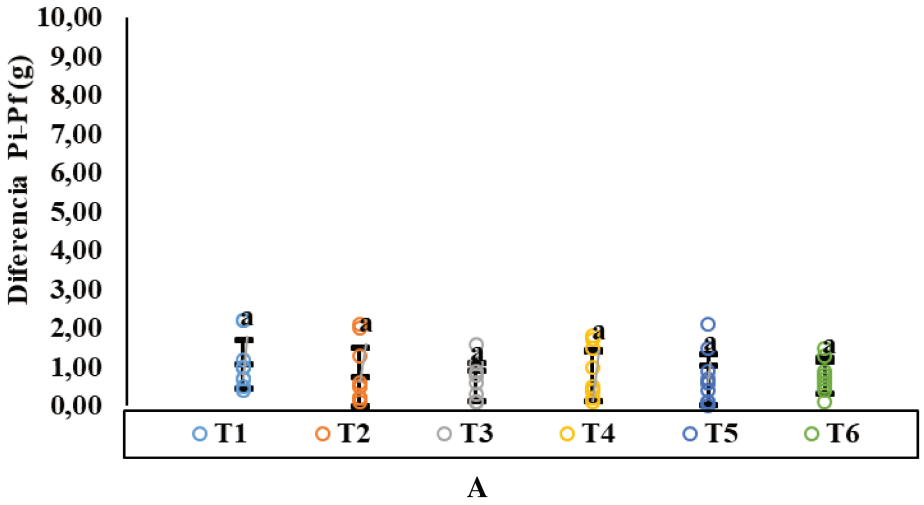
**Peso**

La Figura 242.A muestra la variación de pesos en los frutos inoculados con *P. digitatum* para los distintos tratamientos. La mayor diferencia de peso inicial y final promedio la presentó el tratamiento T1 (1,09 g), seguido por T3 (0,94 g), T4 (0,8 g), T2 (0,77 g), T6 (0,76 g) y por último T5 (0,70 g). En todos los casos los valores de los pesos iniciales fueron superiores a los pesos finales. Se realizó el ANOVA y se observó que no hubo diferencias significativas en la variable diferencia de peso entre los tratamientos para el ensayo con *P. digitatum* (Figura 24.A).

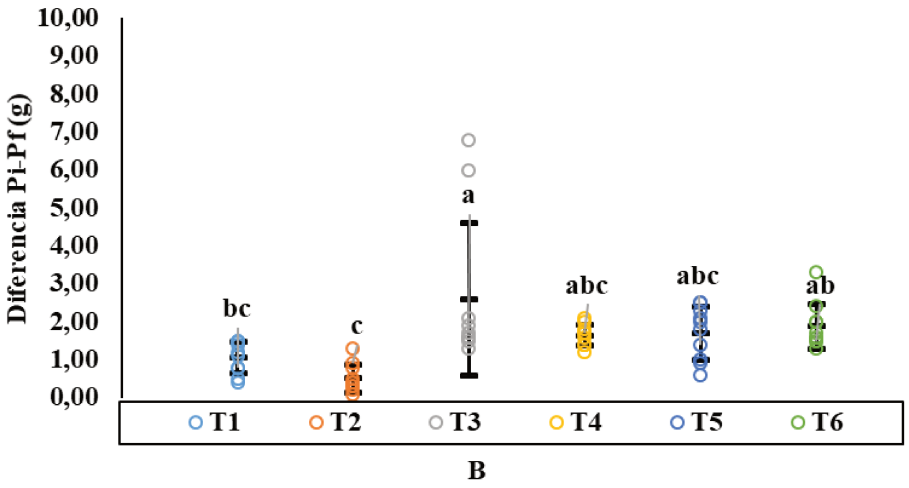
La Figura 24.B muestra la variación de pesos en los frutos inoculados con *P. italicum* para los distintos tratamientos. La mayor diferencia promedio de peso inicial y final la presentó el tratamiento T3 (2,61 g), seguido por T6 (1,89 g), T5 (1,71 g), T4 (1,66 g), T1 (1,07 g) y por último T2 (0,52 g). Se realizó el ANOVA y se muestran las diferencias significativas entre los valores obtenidos.

La Figura 24.C muestra la variación de pesos en los frutos inoculados con *G. citri-aurantii* para los distintos tratamientos. La mayor diferencia de peso promedio la presentó el

tratamiento T6 (5,26 g), seguido por T3 (4,94 g), T4 (4,84 g), T5 (2,8 g), T1 (2,73 g) y por último T2 (1,91 g). Se realizó el ANOVA y se muestran las diferencias significativas entre los valores obtenidos.




A




B

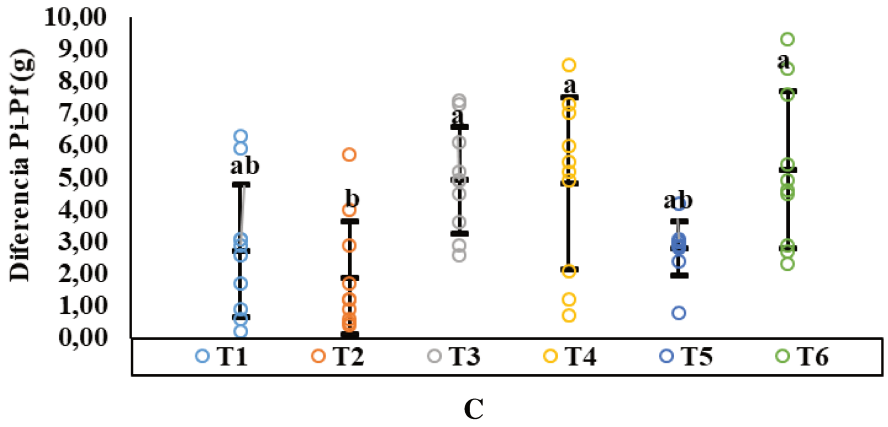


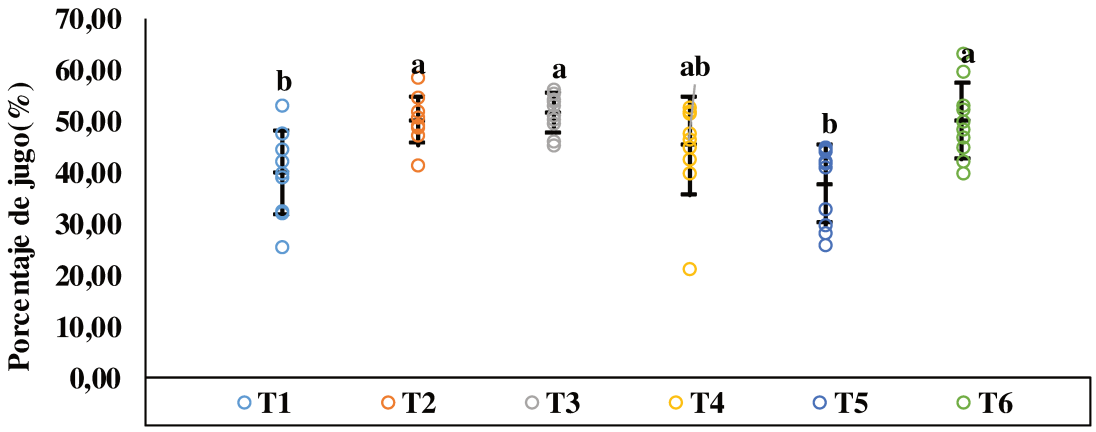

**Figura 24:** Diferencia de Peso inicial (Pi) y peso final (Pf) por tratamiento para cada patógeno. **A.** *P. digitatum;* **B.** *P. italicum;* **C.** *G. citri-aurantii*. Tratamientos: extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 1000 ppm (T1), extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 2000 ppm (T2), extracto diclorometánico de *S. pilcomayense* a 1000 ppm (T3), aceite esencial de *L. turbinata* a 1000 ppm (T4), control químico Imazalil a dosis comercial (T5) e inoculado + agua desmineralizada (T6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

**Porcentaje de jugo**

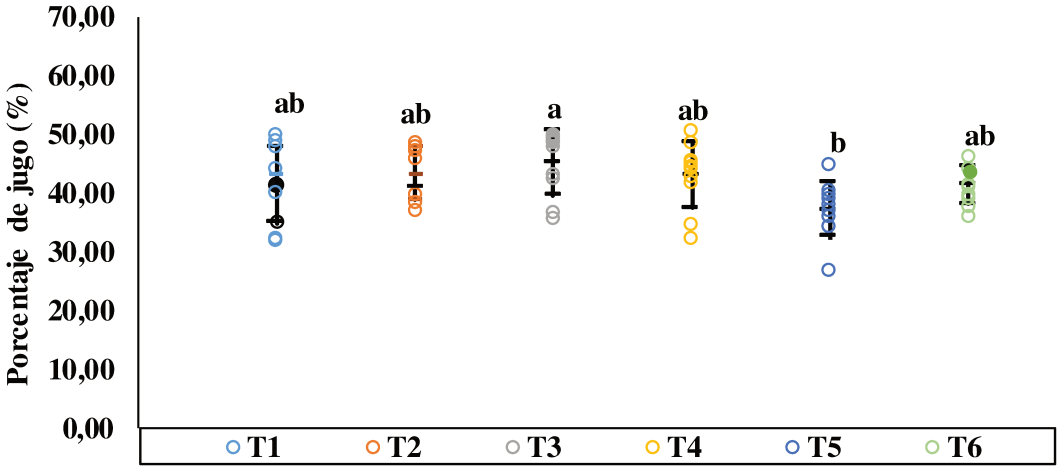
El porcentaje de jugo de las frutas sometidas a los diferentes tratamientos, se muestra en la Figura 23. Al evaluar las naranjas inoculadas con *P. digitatum* (Figura 25.A), los valores de porcentaje de jugo alcanzaron un máximo y un mínimo de 53,21-25,6 para T1; 58,97-41,19 para T2; 56,14-45,10 para T3; 52,48-21,18 para T4; 44,94-25,62 para T5 y 59,65-39,70 para T6. Se realizó ANOVA, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos.

Para el caso de las naranjas inoculadas con *P. italicum* (Figura 25.B), los valores de porcentaje de jugo alcanzaron un máximo y un mínimo de 49,85-31,97 para T1; 48,55-36,88 para T2; 49,79-35,74 para T3; 50,51-32,18 para T4; 44,80-26,62 para T5 y 46,21-35,87 para T6. Se realizó ANOVA, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos.

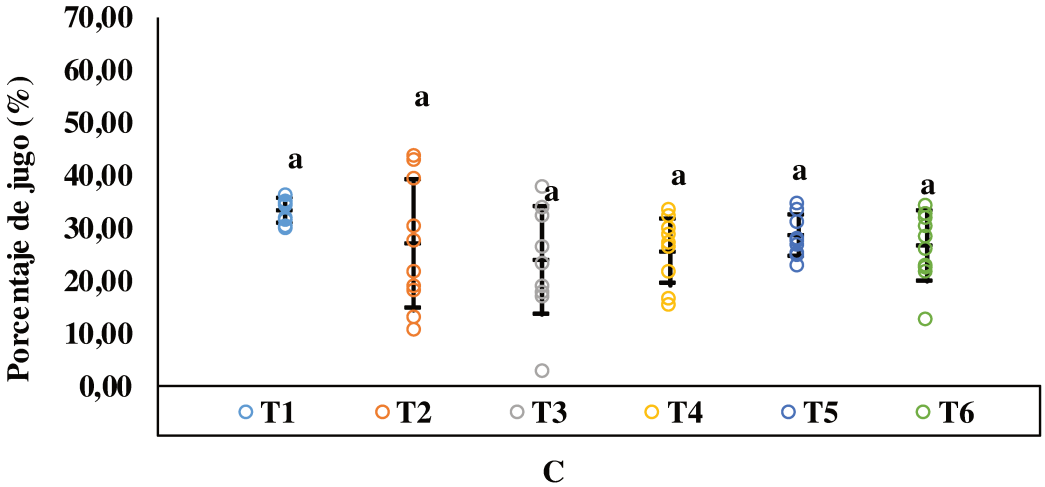
Por último, al evaluar las naranjas inoculadas con *G. citri-aurantii* (Figura 25.C), los valores alcanzaron un máximo y un mínimo de 36,22-29,91 para T1; 43,48-10,64 para T2; 37,83-12,84 para T3; 33,25-15,34 para T4; 34,57-22,68 para T5 y 34,31-12,46 para T6. Se realizó ANOVA, no se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos.


Porcentaje de jugo(%)
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
b
a
a
ab
b
a
T1
T2
T3
T4
T5
T6

A


Porcentaje de jugo (%)
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
ab
ab
a
ab
b
ab
T1
T2
T3
T4
T5
T6

B


Porcentaje de jugo (%)
70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
a
a
a
a
a
a
T1
T2
T3
T4
T5
T6

C

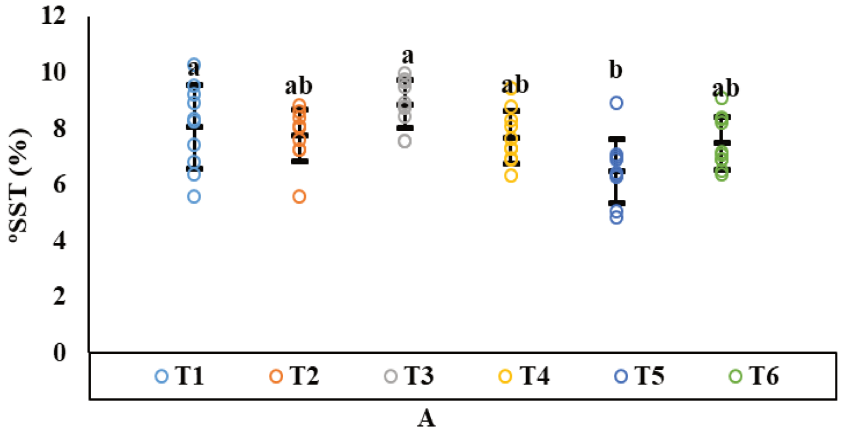
**Figura 25** Porcentaje de jugo (%) por tratamiento para cada patógeno. **A.** *P. digitatum;* **B.** *P. italicum;* **C.** *G. citri-aurantii*. Tratamientos: extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 1000 ppm (T1), extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 2000 ppm (T2), extracto diclorometánico de *S. pilcomayense* a 1000 ppm (T3), aceite esencial de *L. turbinata* a 1000 ppm (T4), control químico Imazalil a dosis comercial (T5) e inoculado + agua desmineralizada (T6). Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Contenido de sólidos solubles totales (SST)**

Los sólidos solubles totales en (%) de las frutas sometidas a los diferentes tratamientos, se muestra en (Figura 24). Al evaluar las naranjas inoculadas con *P. digitatum* (Figura 26.A), los valores de SST alcanzaron un máximo y un mínimo de 10,27-5,60 para T1; 8,83-5,57 para T2; 9,97-7,53 para T3; 9,43-6,33 para T4; 8,90-4,83 para T5 y 9,10-6,37 para T6. Se realizó ANOVA, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos.

Para el caso de las naranjas inoculadas con *P. italicum* (Figura 26.B), los valores de SST alcanzaron un máximo y un mínimo de 11,17-7,13 en T1; 9,90-5,60 en T2; 8,87-3,97 en T3; 8,40-4,80 en T4; 8,37-4,43 en T5 y 6,67-4,50 en T6. Se realizó ANOVA, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos.

Por último, al evaluar las naranjas inoculadas con *G. citri-aurantii* (Figura 26.C), los valores de SST alcanzaron un máximo y un mínimo de 9,80-7,33 en T1; 8,87-5,23 en T2; 10,40-6,20 en T3; 10,27-7,60 en T4; 9,10-7,93 en T5 y 10,53-4,93 en T6. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al realizar ANOVA.



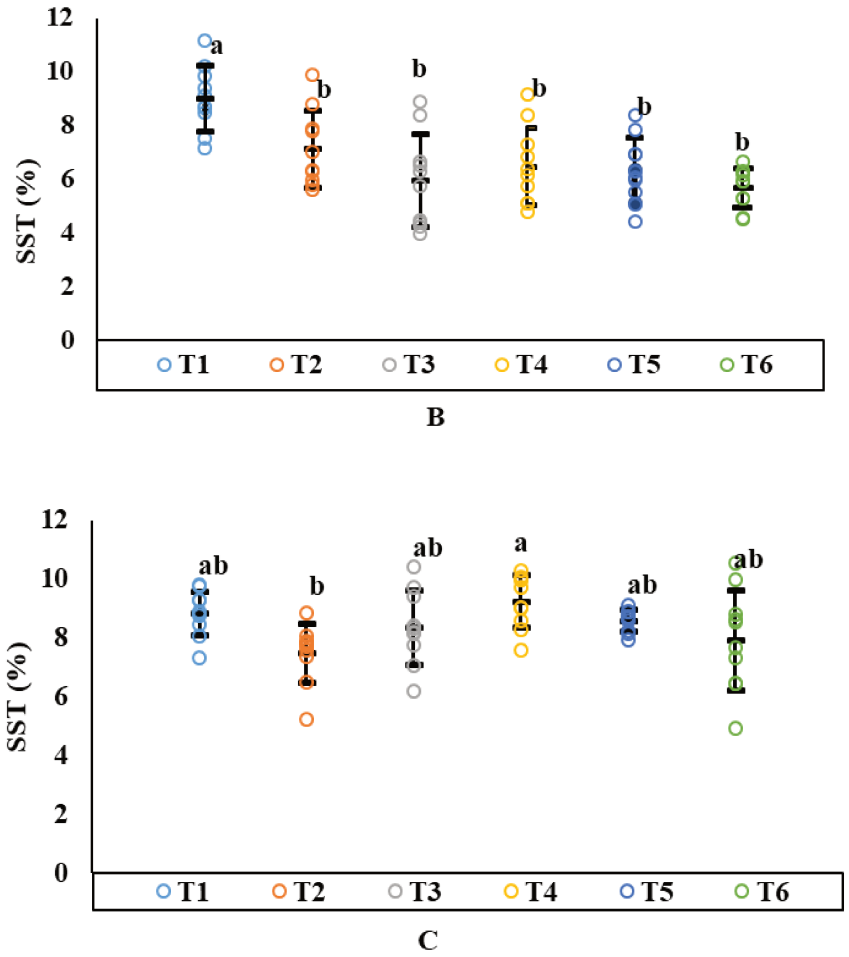


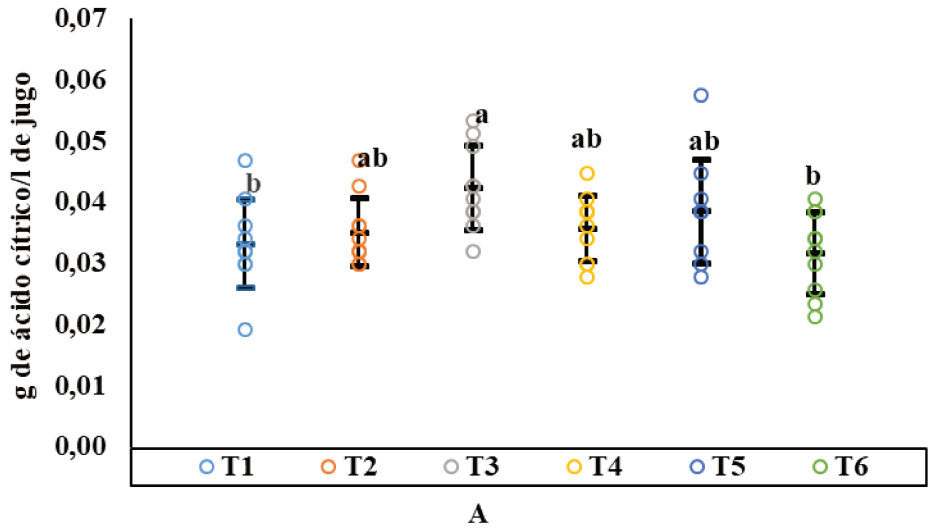

**Figura 26**: Sólidos Solubles Totales (SST) por tratamiento para cada patógeno. **A.** *P. digitatum;* **B.** *P. italicum;* **C.** *G. citri-aurantii*. Tratamientos: extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 1000 ppm (T1), extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 2000 ppm (T2), extracto diclorometánico de *S. pilcomayense* a 1000 ppm (T3), aceite esencial de *L. turbinata* a 1000 ppm (T4), control químico Imazalil a dosis comercial (T5) e inoculado + agua desmineralizada (T6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

**Determinación de acidez total titulable**

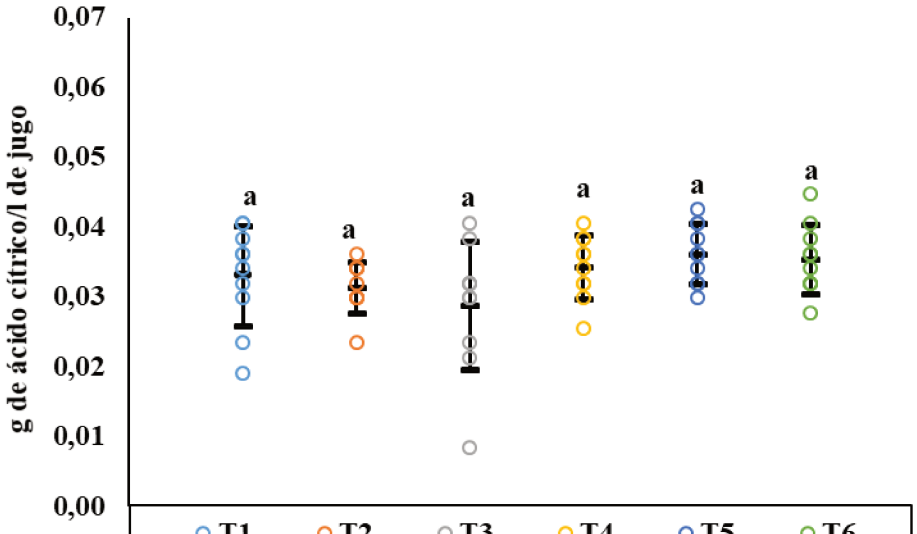
La acidez, expresada en g de ácido cítrico/l de jugo de las frutas sometidas a los diferentes tratamientos, se muestra en la Figura 27. Al evaluar este parámetro en las naranjas inoculadas con *P. digitatum* (Figura 27.A), se observó que alcanzó un máximo y un mínimo de 0,047-0,019 para T1; 0,047-0,030 para T2; 0,053-0,032 para T3; 0,045-0,028 para T4; 0,045-0,028 para T5, y 0,041-0,021 para T6. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al realizar ANOVA.

En el caso de naranjas inoculadas con *P. italicum* (Figura 27.B), los valores de acidez alcanzaron un máximo y un mínimo de 0,041-0,019 en T1; 0,036-0,023 en T2; 0,041-0,009 en T3; 0,041-0,026 en T4; 0,043-0,030 en T5 y 0,05-0,028 en T6. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al realizar ANOVA.

Al evaluar las naranjas inoculadas con *G. citri-aurantii* (Figura 27.C), los valores de acidez alcanzaron un máximo y un mínimo de 0,055-0,049 en T1; 0,055-0,047 en T2; 0,055-0,043 en T3; 0,068-0,045 en T4; 0,070-0,045 en T5 y 0,064-0,047 en T6. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al realizar ANOVA.




A




B

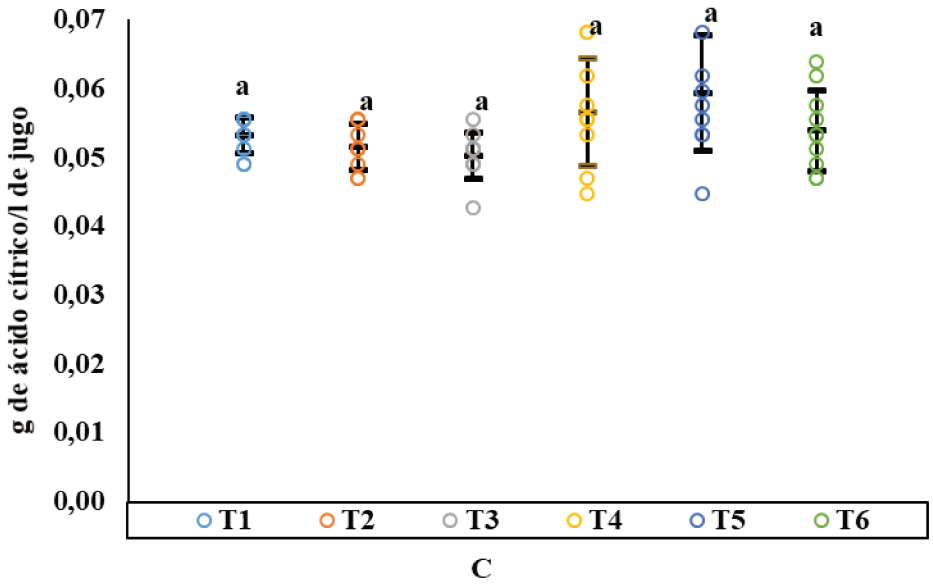



**Figura 27:** Acidez total titulable por tratamiento para cada patógeno. **A.** *P. digitatum;* **B.** *P. italicum;* **C.** *G. citri-aurantii*. Tratamientos: extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 1000 ppm (T1), extracto diclorometánico de *P. acuminata* a 2000 ppm (T2), extracto diclorometánico de *S. pilcomayense* a 1000 ppm (T3), aceite esencial de *L. turbinata* a 1000 ppm (T4), control químico Imazalil a dosis comercial (T5) e inoculado + agua desmineralizada (T6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

**Discusión**

En el ensayo de poscosecha de naranjas inoculadas con *P. digitatum*, las frutas control (T6) alcanzaron una incidencia del 100% de la enfermedad, el doble que las tratadas con T2 y T3 (extracto seco diclorometánico de *P. acuminata* a 2000 ppm y extracto seco diclorometánico de *S. pilcomayense* a 1000 ppm, respectivamente). Además, la severidad de la enfermedad no superó el 50% para ambos tratamientos, siendo del 20% para T2 y del 50% para T3, lo que indica un importante efecto curativo de la misma. La incidencia y severidad de la enfermedad para el tratamiento con AE de *L. turbinata* a 1000 ppm resultó de 60%, lo que indica un moderado efecto controlador de la misma. La incidencia y severidad de la enfermedad para el fungicida químico (T5) resultó nula como era de esperar.

En relación al desarrollo de la enfermedad producida por *P. italicum*, se observó que la incidencia alcanzó el 100% en todos los tratamientos, exceptuando al control químico (T5). Respecto a la severidad, es destacable el comportamiento de T3 (extracto de *S. pilcomayense* a 1000 ppm) y T4 (AE de *L. turbinata* a 1000 ppm), que manifestaron un 55 % de severidad, siendo los porcentajes más bajos exceptuando al control químico T5. Esto indicaría que ambos productos naturales tienen un potencial curativo moderado de la enfermedad.

En cuanto al desarrollo de la enfermedad producida por *G. citri-aurantii*, se observó que la incidencia alcanzó el 100% en todos los tratamientos, exceptuando al control químico (T5). Respecto a la severidad, se observó que el T2 (extracto de *P. acuminata* a 2000 ppm) alcanzó solamente un 50% y el T4 (AE de *L. turbinata* a 1000 ppm) un 60% de severidad, indicando moderadas posibilidades de controlar la enfermedad.

En referencia a estudios similares previos de las especies vegetales que resultaron más activas, *P. acuminata* es una planta perenne que crece en la zona central de Argentina y es comúnmente utilizada en la medicina tradicional para curar heridas infectadas y otras afecciones relacionadas con infecciones fúngicas, por su acción antiséptica (Schmeda-Hirschmann *et al*., 1992). En un estudio reciente se demostró que el extracto de acetato de etilo de *P. acuminata* fue el más activo *in vitro* contra los fitopatógenos *P. digitatum*, *P. italicum* y *M. fructicola* (CIM y CFM entre 62,5 y 1000 µg/mL) (Di Liberto *et al*., 2021); siendo mucho menos activo que contra patógenos humanos, como lo publicaron Derita *et al*. (2009).

Respecto a la especie *S. pilcomayense*, el único estudio publicado hasta el momento referido a la actividad fungicida de esta planta, fue el derivado de esta tesis (Alvarez *et al*., 2023).

Los AE pueden inducir el sistema de defensa de las plantas, aumentando la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa y, al menos, mejorar la capacidad antioxidante (Khumalo *et al*., 2017). Los AE obtenidos de diferentes partes de las plantas y ampliamente utilizados como aromatizantes alimentarios, desde hace mucho tiempo han sido reconocidos por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, insecticidas y antioxidantes (Srivastava *et al*., 2011; Ding *et al*., 2019). El reciente interés en sustancias naturales alternativas ha llevado a una nueva conciencia científica de estos productos. Se han evaluado extractos metanólicos de *L. turbinata* recolectadas en la zona de Tucumán y presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas a dosis equivalentes al antibiótico cloranfenicol (Hernández *et al*., 2000). En otro estudio, la exposición de maníes a vapores del AE de *L. turbinata* permitió evitar la contaminación con hongos del género *Aspergillus* (Passone y Etchevery, 2014). En un estudio realizado por Stegmayer *et al*., se evaluó el potencial fungicida *in vitro* contra los fitopatógenos *B. cinerea, C. acutatum, R. stolonifer, F. semitectum* y *M. fructicola*, de los AE obtenidos de *L. alba* (1000 ppm) y *L. turbinata* (1000 ppm). Ambos productos impidieron el desarrollo de todos los hongos evaluados en las condiciones del ensayo, excepto el crecimiento de *F. semitectum* que fue apenas de un 2% (Stegmayer *et al*., 2021c).

Al momento de comparar los distintos artículos relacionados que aparecen en la literatura, es importante mencionar que los resultados obtenidos en diferentes laboratorios son difícilmente comparables para las evaluaciones *in vivo* o poscosecha, debido a los diferentes factores que influyen en el resultado final (El Khetabi *et al*., 2022). Se debe considerar que los ensayos de inoculaciones presentan ciertas dificultades debido a que se trabaja con organismos biológicos que van experimentando cambios, a medida que transcurre el tiempo. A esto debemos sumarle el hecho de que tanto los microorganismos como las plantas son seres vivos que interactúan con el ambiente y modifican sus comportamientos (Gally *et al*., 2016; Gally y Rona, 2006).

En cuanto a la variación de peso inicial y peso final, en todos los casos los valores disminuyeron en relación al inicio de los ensayos. Las mayores diferencias de pesos se obtuvieron para todos los tratamientos del ensayo con *G. citri-aurantii*, lo que indicaría que la infección con este patógeno afecta mucho más a la pérdida de peso de las frutas que la infección con los hongos del género *Penicillium*. Asimismo, se destacan los valores de pérdida de peso de las naranjas tratadas con T2 (extracto de *P. acuminata* a 2000 ppm) en los ensayos con *P. italicum* y *G. citri-aurantii*, cuya diferencia de peso fue significativamente menor respecto al control. Esto sumaría el interés por T2, que resultó ser uno de los tratamientos que mejor resultado arrojó en la cuantificación de incidencia y severidad *in vivo*, y su comportamiento en el ensayo de pérdida de peso también fue adecuado. Lo que se buscó con este ensayo, fue confirmar que los tratamientos alternativos con productos naturales, no conllevarían a una pérdida de peso sustancial de las frutas respecto al control con agua, y esto quedó demostrado.

Los porcentajes de jugo obtenidos en este trabajo cuando las naranjas fueron infectadas con *P. digitatum* y *P. italicum* y luego se aplicaron los diferentes tratamientos, alcanzaron valores que permiten su comercialización en el mercado interno, conforme a lo establecido por la Secretaría de Agricultura y Ganadería, 1983. Además, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control con agua para los ensayos con los 3 patógenos, lo que indicaría que los tratamientos con productos naturales no afectarían al porcentaje de jugo de las frutas. Sin embargo, en el caso del ensayo de infección con *G. citri-aurantii*, los porcentajes de jugo no alcanzaron los mínimos permitidos para su comercialización en mercado interno, a excepción de las naranjas tratadas con *P. acuminata* (2000 ppm), lo que agrega un valor más a este tratamiento.

Respecto a los SST cuando las naranjas fueron infectadas con *P. digitatum*, los mayores valores con diferencias significativas fueron para los tratamientos con *P. acuminata* (2000 ppm) y con *S. pilcomaense* (1000 ppm); mientras que para las infectadas con *P. italicum*, el mayor valor se obtuvo cuando fueron tratadas con *P. acuminata* (2000 ppm). Los SST en las naranjas

infectadas con *G. citri-aurantii*, arrojaron el mayor valor para el tratamiento con AE de *L. turbinata* (1000 ppm). Todos estos valores son cercanos a los obtenidos para la variedad ´Salustiana´ en la región central de Santa Fe (Micheloud & Pilatti, 2014). Sin embargo, los valores de SST encontrados en esta tesis son menores a los presentados en naranja ´Valencia´ por Chabbal *et al*., (2019) y Barón & Villa, (2013).

La titulación de ácidos evalúa el contenido de ácidos orgánicos de las frutas y es un factor importante para el mantenimiento de la calidad (Abd-Elkader *et al*., 2021). Los valores de acidez encontrados en esta tesis son menores a los reportados para ´Salustiana´ (Micheloud & Pilatti, 2014), y para ´Valencia´ (Chabbal *et al*., 2019; Flores *et al*., 2010; Barón & Villa 2013). Hay que tener en cuenta que, en nuestro caso, esa diferencia puede deberse a la infección intencional que llevamos a cabo para inocular los patógenos. Entre los factores que modifican la acidez se encuentra la maduración de la fruta, demostrando que el proceso de senescencia se está desarrollando (González *et al*., 2021). Lo más importante de nuestros resultados, es que se demostró que las naranjas tratadas con los productos naturales no presentaron diferencias significativas frente al control con agua para el parámetro de acidez titulable.

**Conclusión**

La comunidad científica ha reconocido en las últimas décadas la importancia del reino vegetal como una enorme fuente de moléculas novedosas que podrían actuar contra diferentes tipos de infecciones o enfermedades. Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran la gran riqueza que posee la flora nativa argentina como fuente de potenciales antifúngicos naturales. Los productos naturales preparados como una solución acuosa a 1000 ppm del extracto diclorometánico seco de *S. pilcomayense* y a 2000 ppm del extracto diclorometánico seco de *P. acuminata*, resultaron en la reducción de incidencia y severidad de la enfermedad en naranjas inoculadas con *P. digitatum*. Para el ensayo de inoculación con *P. italicum*, se destacan la aplicación del mismo producto preparado con *S. pilcomayense* y un producto acuoso preparado con el AE de *L. turbinata* a 1000 ppm en la reducción de la incidencia y severidad del moho azul. Finalmente, para el ensayo de inoculación con *G. citri-aurantii*, se observó la disminución de la severidad de la enfermedad cuando las naranjas fueron tratadas con una solución acuosa del extracto diclorometánico de *P. acuminata* preparada a 2000 ppm. Asimismo, resultó importantísimo que los parámetros de calidad de las frutas evaluados no presentaran diferencias significativas entre los tratamientos con los productos naturales y el control con agua, indicando que estos no se verían afectados.

A pesar de estos importantes hallazgos, es necesario continuar con estudios referidos a la estandarización química de los extractos, su evaluación frente a otros fitopatógenos para

detectar espectros y mecanismos de acción, citotoxicidad humana y formulaciones tecnológicas para determinar la dosis correcta para el control de cada enfermedad en frutas.

## Capítulo V: Caracterización fitoquímica de los aceites esenciales obtenidos y evaluados por su acción fungicida

### Introducción

Para su adaptación ambiental y la tolerancia al estrés las plantas producen, a través de su metabolismo secundario, moléculas variables en su química y estructura, como terpenos, flavonoides, taninos y alcaloides, entre otros (Ninkuu *et al*., 2021; Boncan *et al*., 2020).

Los terpenos, con más de 80000 estructuras conocidas, comprenden la clase de sustancias químicas más abundante y funcionalmente más diversa presente en los organismos vivos (Zhou y Picherski, 2020; Christianson, 2017). Las combinaciones de las unidades precursoras de cinco átomos de carbono (isopreno) dan lugar a los terpenos, mientras que los terpenoides poseen un resto de oxígeno y reordenamientos estructurales adicionales (Boncan *et al*., 2020). Todas las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos terpenoides que provienen de vías biosintéticas básicas; sin embargo, descubrimientos recientes han revelado variaciones en la síntesis de terpenos específicos en determinados taxones (Zhou y Picherski, 2020).

Varios factores estresantes abióticos, particularmente cuando las plantas sufren un exceso severo de energía radiante, activan la biosíntesis de flavonoides (un gran grupo de polifenoles) que actúan como amortiguadores de los niveles de especies reactivas de oxígeno y mejorando la resistencia al estrés (Zeng *et al*., 2019; Brunetti *et al*., 2018). Otras funciones que se le atribuyen a este grupo de moléculas son: proporcionar colores a las flores y otras partes de la planta, y desempeñar un papel importante en el transporte de auxina para proteger a las plantas contra el estrés abiótico y biótico (Khalid *et al*., 2019). Los flavonoides poseen un esqueleto básico de 15 carbonos, C6-C3-C6, con dos anillos bencénicos unidos por un anillo pirano de tres átomos de carbono, que puede estar ciclado o no en el heteroátomo de oxígeno. El número y la posición de los grupos hidroxilos en los anillos, influyen en la capacidad antioxidante (D'Amelia *et al*., 2019). De la misma manera que los flavonoides, los taninos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y su rol tiene que ver también con foto-protección contra los rayos UV, radicales libres, defensa contra otros organismos y condiciones ambientales (Fraga-Corral *et al*., 2021). Su función se encuentra íntimamente relacionada a la estructura química de 12 a 16 grupos fenólicos con cinco a siete anillos aromáticos capaces de unirse a una amplia gama de moléculas y actuar como captadores de electrones para atrapar iones y radicales (De Hoyos-Martinez *et al*., 2019; Vuolo *et al*., 2019).

Los alcaloides son productos naturales que contienen nitrógeno y derivan de varias rutas biosintéticas (Gutiérrez-Grijalva *et al*., 2020). En una planta dada, la concentración de alcaloides puede variar ampliamente de una parte a otra, y algunas partes pueden no contener ninguno (Bribi, 2018). Generalmente, la producción de alcaloides se produce para facilitar la supervivencia de las plantas en el ecosistema, comportándose como compuestos alelopáticos (Jing *et al*., 2014), para la protección contra los depredadores y está asociada con la formación de semillas.

Ngo *et al*., (2020) afirmaron que los productos vegetales son fuentes importantes de compuestos antifúngicos con baja toxicidad para los mamíferos y el medio ambiente y presentan escasa bioacumulación porque se degradan rápidamente en el suelo. Dichas características han ocasionado que en los últimos años la demanda de moléculas bioactivas o nano construcciones cargadas de agentes bioactivos con estas propiedades, haya aumentado considerablemente (Vallesi *et al*., 2020). Estos metabolitos secundarios bioactivos son fuentes importantes para la búsqueda de fungicidas y brindan oportunidades para la producción de productos farmacéuticos y agroquímicos (Fonmboh *et al*., 2020).

Los AE, por su naturaleza volátil, pueden ser caracterizados a través de la técnica de CG-EM (Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas), que a lo largo de los años ha devenido en una técnica muy robusta para este fin. Esta tesis no tuvo como objetivo el aislamiento de principios activos, pero en este capítulo se presenta una caracterización química mayoritaria de los AE evaluados como fungicidas en el Capítulo III.

## Materiales y Métodos

### Caracterización de los perfiles químicos de los AE por CG-EM

Los aceites esenciales fueron analizados con un Cromatógrafo gaseoso Agilent modelo 7890B acoplado a un *Espectrómetro de Masas Agilent modelo 5977*, columna: HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm con 0,25 µm de film). Las condiciones de corrida fueron las siguientes: Inyector 250 ºC; temperatura de la columna: 160 ºC mantenido por 3 min llevado a 5 ºC/min hasta 30 ºC; tiempo de corrida: 31 min. Espectrómetro de Masas: full SCAN: 50-400, volumen de inyección: 1 µl- Split: 1:20. Para identificar los principales componentes, se compararon los espectros de masas de los picos más abundantes con la base de datos que dispone el equipo [Biblioteca de Espectro de Masas del NIST (*The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library versión 2.0 Build*). Los AE se caracterizaron de acuerdo a la presencia de compuestos que representaran más del 1% de su composición. Los cromatogramas obtenidos de los cinco AE analizados, se incluyen en los resultados.

## Resultados

### Composición química mayoritaria de los AE obtenidos y evaluados

En lo que refiere al análisis de los cromatogramas obtenidos mediante CG-EM, se pudo determinar que:

En el aceite esencial *S. molle* se detectó la presencia de limoneno (30,4%), τ-cadinol (25,9%), γ-cadineno (6,31%), β-cariofileno (4,85%), β-cubebeno (4,39%), β-cadineno (4,33%), aromadendreno (3,21%), cubenol (1,93%), espatulenol (1,93%), α-cadinol (1,76%), óxido de alloaromadendreno-(2) (1,62%) y α-muuroleno (1,09%), que representaron el 89,16% del total de sus componentes (Figura 28).

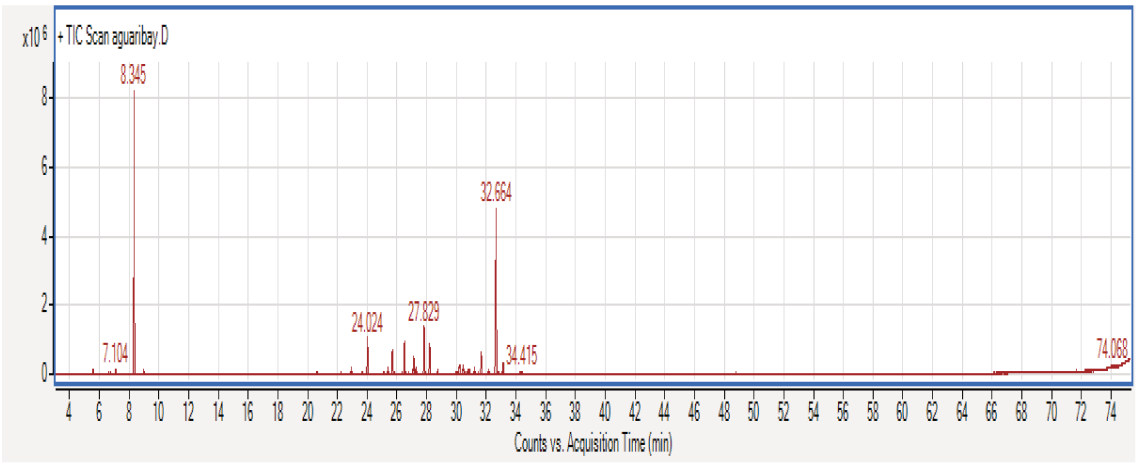



**Figura 28**: Cromatograma del aceite esencial de *S. molle*.

El aceite esencial de *P. graveolens* se caracterizó por la presencia de geraniol (24,89%), citronelol (19,5%), β-linalol (10,92%), γ-eudesmol (8,93%), formiato de citronelilo (6,30%), isomentona (3,73%), tiglato de geranilo (3,3%), D-germacreno (2,55%) y formiato de geranilo (2,14%), representando el 82,26% del total de la composición del aceite esencial (Figura 29).

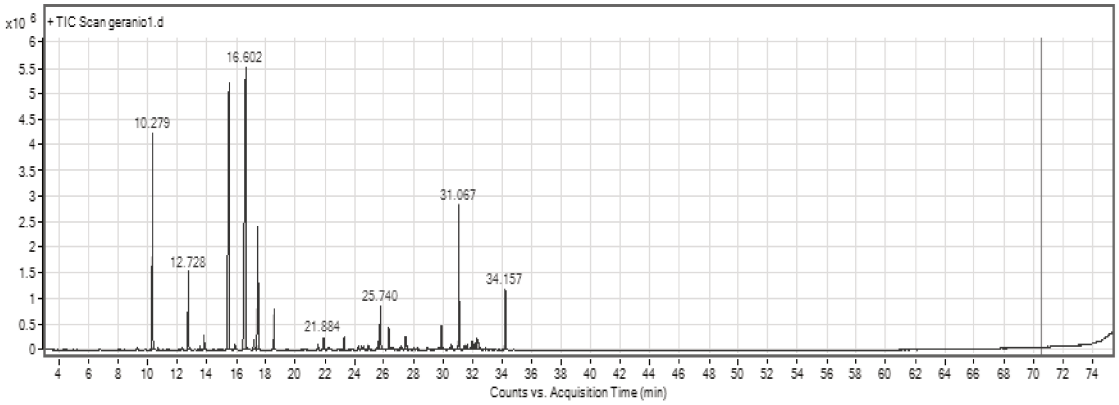



**Figura 29**: Cromatograma del aceite esencial de *P. graveolens.*

El contenido de aceite esencial de *M. linearis* presentó cineol (72,71%), $\alpha$-terpinol (7,89%), $\alpha$-pineno (5,01%), terpinen-4-ol (2,8%), $\beta$-pineno (4,81%) representaron el 93,22% del total de la composición del aceite esencial de *M. linearis* (Figura 30).

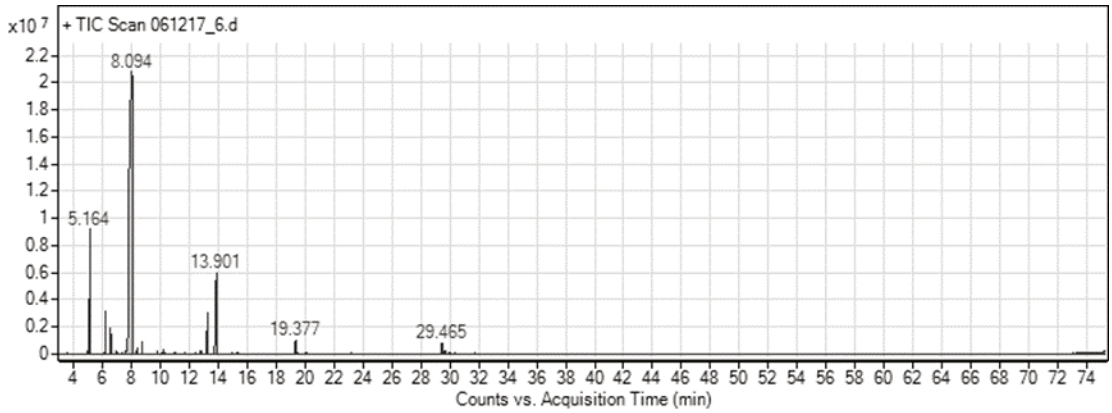



**Figura 30**: Cromatograma del aceite esencial de *M. linearis*.

El aceite esencial de *L. alba* se caracterizó por la presencia de $\beta$-linalol (26,72%), trans-dihidrocarvona (16,29%), cineol (9,28%), dihidrocarvona (6,19%), $\alpha$-citral (4,58%), $\beta$-citral (3,51%), cariofileno (2,41%) y óxido de cariofileno (2,19%). Los compuestos que se hallaron en el rango de 1% al 2% fueron sabineno (1,2%) y 1-octen-3-ol (1,14%). Todos los compuestos contabilizaron el 74,05% del AE (Figura 31).

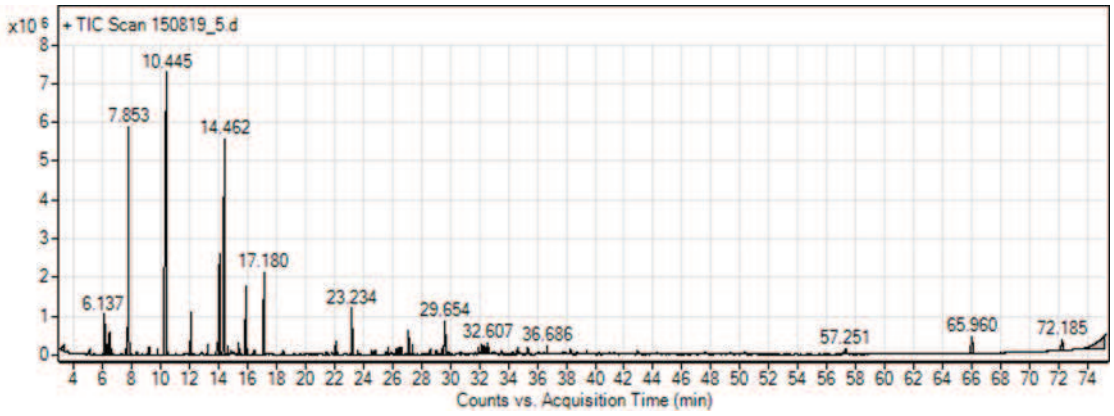



**Figura 31**: Cromatograma del aceite esencial de *L. alba*.

El contenido del aceite esencial de *L. turbinata* presentó (-)-carvona (58,23%), D-limoneno (27,72%), cariofileno (2,48%), cis-carvil acetato (2,25%), ester cis-lachnophyllum (1,9%), metil eugenol (1,66%), $\alpha$-terpinol (1,64%), cis-carveol (1,61%), representaron el 97,49% del total de la composición de este AE (Figura 32).

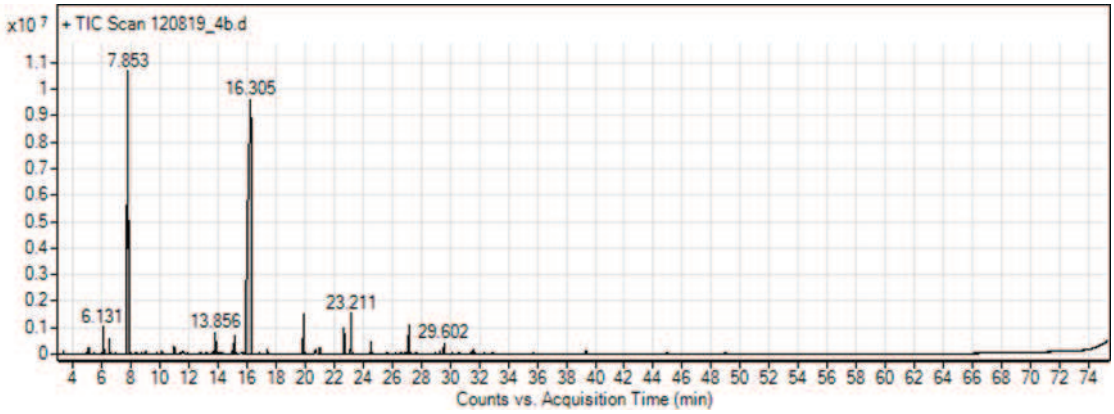



**Figura 32**: Cromatograma del aceite esencial de *L. turbinata*.

**Discusión**

La formación de metabolitos secundarios es el resultado de la evolución de millones de años de interacción de las plantas con los patógenos, cuya producción es clave para su crecimiento y reproducción (Zaynab *et al*., 2018).

Para el AE de *S. molle*, la bibliografía refiere un gran porcentaje de hidrocarburos monoterpénicos, entre los cuales se encuentran $\alpha$ y $\beta$ pineno, mirceno, limoneno, *p*-cimeno, $\alpha$ y $\beta$ felandreno y sabineno (Bendaoud *et al*., 2010, de Mendonça Rocha *et al*., 2012, Gomes *et al*., 2013, Martins *et al*., 2014, do Prado *et al*., 2019). A pesar de que el componente mayoritario de este aceite obtenido aquí es uno de los esperados para la especie, los restantes mayoritarios involucran grupos oxigenados o esqueletos sesquiterpénicos, que, si bien aparecen en la bibliografía citada, se encuentran a nivel de compuestos minoritarios o trazas. Los dos compuestos principales (limoneno y $\tau$-cadinol), que en su conjunto constituyen más del 50% de la mezcla, presentan antecedentes como compuestos con fuerte actividad antifúngica (Ho *et al*., 2011, Mahdavi Omran *et al*., 2011, Marei *et al*., 2012).

El AE de *P. graveolens* se caracterizó por la presencia de monoterpenos oxigenados como geraniol (24,89%), citronelol (19,5%), $\beta$-linalol (10,92%), $\gamma$-eudesmol (8,93%), entre otros. La fracción principal de citronelol (35,2%) y geraniol (28,8%) del aceite obtenido aquí, coincide con lo hallado por otros autores (Bouzenna y Krichen, 2013; Rana *et al*., 2002; Babu y Kaul, 2005), aunque se obtuvo con menor rendimiento que lo expresado por ellos. El geraniol presentó actividad sinérgica cuando se combinó con cloranfenicol, norfloxacina y tetraciclina contra *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Lira *et al*., 2020). El citronelol, que sólo se diferencia del geraniol por tener un doble enlace en su estructura, también demostró

acción antifúngica, inhibiendo la germinación de conidios y la producción de micelios (Pereira *et al*., 2015).

El AE de *M. linearis* presentó 1,8-cineol como compuesto principal y $\alpha$-pineno, $\alpha$-terpinol, y (-)-4-terpineol, entre otros. Autores proponen que este género, podría utilizarse como base para la identificación y ser fuentes de 1,8-cineol, metil eugenol y terpinen-4-ol (Farag *et al*., 2004; Gad *et al*., 2015). Al mismo tiempo, está demostrado que el 1,8-cineol alivia las respuestas inflamatorias y el estrés oxidativo principalmente a través de la vía de señalización del factor nuclear kappa (BNF-jB) y el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2); pero en lo que respecta a la actividad antimicrobiana del 1,8-cineol en solitario, no es tan efectiva como la de los AE donde está presente, debido a los efectos sinérgicos de los compuestos en la mezcla (Cai *et al*., 2021). Las proporciones de estos compuestos explicarían la actividad antifúngica encontrada en los ensayos *in vitro* en esta tesis.

El análisis químico del AE de *L. alba* demostró la presencia de $\beta$-linalol (26,72%), trans-dihidrocarvona (16,29%) y 1,8-cineol (9,28%), mientras que para el AE de *L. turbinata* sus componentes principales fueron: (-)-carvona (58,23%), D-limoneno (27,72%) y $\beta$-cariofileno (2,48%). Uno de los principales usos del D-limoneno, disponible a bajo costo en la producción de cítricos, es como precursor químico de S-(+)-carvona (Trytrek y Fiedurek, 2002). Un estudio reveló que ambos isómeros ópticos de la carvona, aislados del aceite de *Mentha spicata* y *Anethum sowa,* eran activos frente a un amplio espectro de bacterias y hongos patógenos (Aggarwal *et al*., 2002). Los resultados de actividad fungicida *in vitro* para *L. alba* confirman lo publicado por diferentes autores en cuanto a la variedad de microorganismos que son inactivados por este producto botánico (Rao *et al*., 2000; de Oliveira *et al*., 2006; Shukla *et al*., 2009; De Oliviera Arruda *et al*., 2019). La actividad antifúngica frente a patógenos de cítricos se reporta por primera vez en esta tesis para *L. turbinata*.

**Conclusión**

La caracterización de los AE de las especies vegetales estudiadas, arrojó los porcentajes de los distintos compuestos que podrían producir las inhibiciones de los patógenos de cítricos aislados, entre los que se destacan el D-limoneno, 1,8-cineol, isómeros de terpineol y geraniol como los principales agentes antifúngicos. Se hallaron variaciones respecto a la bibliografía en referencia a los porcentajes de los principales componentes de los AE cuyas causas subyacen en el origen, es decir, el ambiente, la colecta, el organismo vivo (estado fenológico) y las interacciones entre los factores anteriormente mencionados. Esto es común cuando se trabaja con productos botánicos que constituyen aceites esenciales.

## DISCUSIÓN GENERAL

Los principales productores de cítricos son China, Brasil y Estados Unidos. A nivel sudamericano, Brasil produce prácticamente el 50% del jugo de naranja consumido en todo el mundo. Argentina presenta un bajo desempeño respecto al resto de los países productores de naranjas, la producción nacional creció a una tasa inferior que el resto (Carciofi *et al*, 2021). Lo hallado en esta tesis muestra que la producción mundial se encuentra en aumento, mientras que el aporte nacional es bajo. No obstante, la posibilidad de producir en contra estación es una capacidad comparativa que puede ser aprovechada. Nuestros análisis de producción nacional mostraron que una de las características más importantes es su mano de obra intensiva, la diversidad de productos a desarrollar con posibilidad de consumo en fresco o industrial, como así también sus exportaciones. En este sentido, existe un desafío en cuanto al diseño de políticas públicas adecuadas que puedan contribuir a superar la situación de estancamiento que enfrenta la producción citrícola del país.

Tradicionalmente, la mayoría de los hongos fitopatógenos han sido identificados en base a características morfológicas y fisiológicas (Alexopoulos y Mims, 1996; Stajich *et al.*, 2009). Sin embargo, en muchos casos estos criterios no son suficientes para la diferenciación entre especies debido a la variación de la morfología y del fenotipo bajo influencia de diferentes factores ambientales. Es por ello que resulta más apropiado para la identificación de fitopatógenos, el uso combinado del diagnóstico molecular y la caracterización morfológica tradicional. En esta tesis se obtuvieron cepas monospóricas a partir de frutas enfermas, y se identificaron las secuencias de los aislamientos que presentaron porcentajes de similitudes mayores al 99% con cepas previamente caracterizadas de *P. digitatum* Grapefruit PD (Wang y Deng, 2020), *P. italicum* AK37 (Khan *et al*., 2019), *G. citri-aurantii* GcaCC015 (Hernández-Montiel *et al*., 2010), y *P. citricarpa* CBS 127452 (Vu *et al*., 2019).

La búsqueda bibliográfica arrojó que el inadecuado uso de fungicidas con único sitio de acción ocasionó la disminución de los principios activos disponibles para el control de los hongos de poscosecha. Los principios activos multisitio, se utilizan en proporciones más altas, generalmente tienen más eficacia y un perfil de toxicidad menos favorable en comparación con los fungicidas de sitio único (Schnabel y Brannen, 2022). Asimismo, tienen un bajo riesgo de desarrollar resistencia y presentan combinaciones efectivas de mezcla/alternancia para fungicidas de riesgo medio a alto, previniendo o retrasando el desarrollo de varios patógenos en muchos cultivos. La presencia de fungicidas en frutas y hortalizas ha sido una preocupación creciente en Argentina,

sólo tres de los principales mercados mayoristas tienen la infraestructura necesaria para determinar los residuos de pesticidas; por lo que se recomienda con urgencia la implementación de programas diseñados para facilitar la sensibilización, capacitación y seguimiento del uso de estos productos (Mac Loughlin *et al*., 2018). La preocupación pública sobre la inocuidad de los alimentos, ha aumentado el interés por encontrar alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de enfermedades en frutas, lo que induce a los países importadores a reforzar las estrictas regulaciones de importación con respecto a los LMR.

Las plantas desarrollaron un complejo sistema de defensa para superar el estrés biótico y abiótico (Ballhorn *et al*., 2009); presentan sistemas de señalización y reconocimiento específicos que les permiten detectar la entrada de patógenos rápidamente e inducir una respuesta de defensa que en la mayoría de las interacciones resulta eficaz para detener la penetración y/o infección (Schaller y Ryan, 1996). La formación de metabolitos secundarios es el resultado de millones de años de interacción de las plantas con los patógenos y se considera que más de 100.000 metabolitos se encuentran involucrados en el sistema de defensa (Zaynab *et al*., 2018).

En esta tesis se realizaron fichas descriptivas de 26 especies de base etnobotánica, se obtuvieron 42 extractos fijos utilizándose una purificación preliminar en base a las propiedades lipofílicas/hidrófilas y/o ácidas/básicas según lo informaba la literatura (Brusotti *et al*., 2014); y 5 aceites esenciales obtenidos por arrastre con vapor de agua. Los rendimientos hallados se encontraron dentro de los valores esperables para extractos diclorometánicos y metanólicos, logrando el material de partida para los ensayos *in vitro*. Respecto a la evaluación *in vitro*, siete especies vegetales han demostrado una alta inhibición fúngica de sus extractos fijos, y otras tres han demostrado actividad fungicida por sus aceites esenciales. *O. virgata*, *P. alliacea*, *F. clausum*, *A. inundata*, *S. caavurana*, *S. pilcomayense* y *P. acuminata* inhibieron el 100% del crecimiento de al menos uno de los cuatro fitopatógenos estudiados (*P. digitatum*, *P. italicum*, *G. citri-auranti* y *P. citricarpa*). Los AE obtenidos de *P. graveolens*, *M. linearis* y *L. turbinata* demostraron un buen desempeño frente a dos de los patógenos estudiados (*P. digitatum* y *P. italicum*) que fueron inhibidos al 100% de su crecimiento *in vitro*.

Los productos naturales obtenidos a partir de los AE y extractos fijos estudiados en esta tesis, constituyen una alternativa de interés para el control de patógenos *in vitro*. Los resultados obtenidos en los ensayos de poscosecha de naranjas var. ´Salustiana´ inoculadas con los patógenos aislados, demostraron la gran riqueza que posee la flora nativa argentina como fuente de potenciales fungicidas naturales. Las soluciones acuosas a 1000 ppm del extracto diclorometánico de *S.*

*pilcomayense* y a 2000 ppm del extracto diclorometánico de *P. acuminata*, fueron altamente fungicidas (teniendo en cuenta la incidencia y severidad de la enfermedad luego de los tratamientos) en naranjas inoculadas con *P. digitatum*. En cuanto a *P. italicum* se destaca la acción fungicida del extracto diclorometánico de *S. pilcomayense* y del aceite esencial de *L. turbinata*; mientras que para *G. citri-aurantii*, el extracto diclorometánico de *P. acuminata* fue el tratamiento que resultó más adecuado para controlar la incidencia y severidad de la enfermedad. Asimismo, resultó importantísimo que los parámetros de calidad de las frutas evaluados (pérdida de peso, porcentaje de jugo, contenido de SST, y acidez total titulable), no presentaran diferencias significativas importantes entre los tratamientos con los productos naturales y el control con agua, indicando que estos no se verían afectados. Desafortunadamente, no se logró poner a punto el ensayo de sensibilidad *in vivo* para *P. citricarpa* dada la complejidad del ciclo del patógeno, que presenta un período de incubación muy prolongado, sumado a la falta de tiempo y el período de pandemia durante 2020-2021.

Autores como Derita *et al*., (2009), Derita *et al*., (2011) y Derita *et al*., (2011a) hallaron también actividad antifúngica contra hongos patógenos humanos utilizando extractos de *P. acuminata*. En cuanto a *S. pilcomayense*, fue por primera vez evaluado en esta tesis y se logró una publicación en la revista *Horticulturae* con los resultados obtenidos para esta especie (Alvarez *et al*., 2023). Los AE obtenidos, desde hace mucho tiempo han sido reconocidos por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, insecticidas y antioxidantes (Srivastava *et al*., 2011; Ding *et al*., 2019). En un artículo se evaluó el potencial fungicida para el control de los fitopatógenos *B. cinerea, C. acutatum, R. stolonifer, F. semitectum* y *M. fructicola*, de los AE obtenidos de *L. alba* (a 1000 ppm) y *L. turbinata* (a 1000 ppm); en ese caso, ambas especies impidieron el desarrollo de todos los hongos evaluados en las condiciones del ensayo excepto el de *F. semitectum* (Stegmayer *et al*., 2021). Sin embargo, es necesario continuar con estudios respecto a la estandarización química de los extractos y AE, su evaluación frente a otros fitopatógenos para detectar espectros y mecanismos de acción, citotoxicidad humana y formulaciones tecnológicas para determinar la dosis correcta para el control de cada enfermedad en frutas.

Finalmente, se procedió a la caracterización fitoquímica de los AE por CG-EM, que arrojó los porcentajes de los distintos compuestos que podrían producir las inhibiciones de los patógenos de cítricos aislados, entre los que se destacan D-limoneno, 1,8-cineol, isómeros de terpineol y geraniol como los principales agentes antifúngicos. Se hallaron variaciones respecto a la bibliografía en referencia a los porcentajes de los principales componentes de los AE (do Prado *et al*., 2019, Gad *et al*., 2015, Bouzenna y Krichen, 2013, Stegmayer *et al*., 2021); esto es común

cuando se trabaja con productos botánicos que constituyen aceites esenciales. La actividad fungicida frente a patógenos de cítricos se reporta por primera vez en esta tesis para *L. turbinata*.

Según los resultados hallados en esta tesis, se logró demostrar la hipótesis de que los productos naturales provenientes de especies vegetales nativas, controlan algunos patógenos de cítricos en la etapa de poscosecha en las condiciones de nuestros ensayos.

Esta tesis, junto a otras tres dirigidas por el Dr. Derita, posibilitó la identificación de especies vegetales con potencial fungicida contra varios fitopatógenos de poscosecha de frutas. En este sentido, se sentaron las bases para continuar con estudios referidos a mejorar y optimizar las formulaciones de los extractos desde un punto de vista tecnológico. Así como también, posibilitar estudios de solubilidades en distintas matrices, biodisponibilidad de los activos en las frutas, identificación de los activos y detección de sinergismos, tecnologías para la aplicación de los extractos y aceites esenciales, entre otras, son aspectos a seguir trabajando.

## Anexo I: Especies vegetales presentadas en orden alfabético de las familias botánicas

### *Schinus molle* L. (Anacardiaceae)

Nombres vulgares: aguaribay, árbol de la pimienta, bálsamo, curunguay, gualeguay, molle, pimienta del diablo, pimientero, terebinta (IRUPÉ, 2021). Es un árbol perenne, aromático y hermafrodita. Alcanza los 15 m de altura, con una copa de 4-5 m de diámetro formada por ramas colgantes. Las hojas son imparipinnadas o paripinnadas, con folíolos opuestos o alternos, lanceolados. Las flores se disponen en inflorescencias terminales y axilares. El fruto es globoso y de color rosado a rojo-rosado cuando madura. Es una especie nativa, se encuentra desde una elevación de 0 hasta 500 m.s.m.; en Argentina (Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe) y en países limítrofes como Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay (Figura 1) (Flora Argentina, 2020).

Las hojas, corteza y raíz se utilizan en la medicina popular para el reumatismo, el dolor de muelas, los trastornos menstruales, problemas pulmonares, infección de las vías urinarias, hipertensión, úlceras, tumores, ansiedad, depresión e inflamación y como antibacteriano, antiviral, antiséptico, antimicótico, antioxidante, antiespasmódico, analgésico y estimulante (do Prado *et al*., 2019). El aceite esencial presenta componentes como pineno, mirceno, limoneno, cimeno, felandreno y otros monoterpenos como cadineno y sabineno (do Prado *et al*., 2019). El aceite esencial de *S. molle* fue fungicida contra hongos fitopatógenos de los géneros *Alternaria, Botrytis*, *Colletotrichum* y *Fusarium*, mediante la técnica de difusión en disco (dos Santos *et al*., 2010). En otro estudio, el aceite esencial mostró actividad significativa contra *Paracoccidioides brasiliensis* (39,06 µg/mL), acción débil contra *C. neoformans* y *Trichophyton quinckeanum* (625 µg/mL) e inactividad contra *Candida* spp. (do Prado *et al*., 2019), mediante el método de dilución en caldo. Existen trabajos sobre la actividad antifúngica de nanopartículas de quitosano con aceite esencial de *S. molle* contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Aspergillus parasiticus*, se observó gran efecto inhibitorio del crecimiento radial, germinación y viabilidad de esporas de *C. gloeosporioides* a una concentración de 160 µg/mL (Chávez-Magdaleno *et al*., 2018).

**Figura 1**: *Schinus molle.* A. Vista general del árbol. B. Detalle del tronco. C. Inflorescencias (World Flora, 2022).

***Araujia brachystephana* (Griseb.) Fontella & Goyder (Apocynaceae)**

Nombres vulgares: tasi, isopa, tase y doca (Chiari *et al.*, 2015; IRUPE, 2021). Es un subarbusto perenne voluble, albo pubescente (Figura 2). Sus hojas son ovado-oblongas hasta triangular, acuminadas en el ápice, pubescentes en ambas caras con pubescencia más densa en la cara abaxial, de 3 a 5 cm de longitud x 2 a 3 cm de ancho; pecíolos de 10 a 15 mm de longitud. Las cimas umbeliformes, paucifloras, cortamente pedunculadas; el cáliz de lacinias lanceoladas, de 5 a 6 mm de longitud, pubescentes en ambas caras. La corola rotácea, de tubo muy breve y lóbulos lanceolados, obtusos, pubescentes en la cara externa, de 5 a 7 mm de longitud x 1,8 a 2 mm de ancho y la corona acampanada, de 2 a 3 mm de longitud, con manchones de pelos barbados en la cara interna. Presenta apéndice estigmático muy corto y las semillas son oblongas, ensanchadas en el ápice, de 6 mm de longitud (Quiroga y Esnarriaga, 2014). Se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Luis, Catamarca y Tucumán. También se encuentra presente en Uruguay, Brasil y Paraguay. Es común en los bosques y en los alambrados (Quiroga y Esnarriaga, 2014; Carpintero y Testoni, 2013). En cuanto al uso, es una especie que forma parte de la dieta del ganado caprino (Quiroga *et al.*, 2014), es también utilizada como planta ornamental y medicinal (Trillo y Audisio, 2018). Se cultiva como ornamental por sus flores vistosas y su floración prolongada. Los indios payaguá del Paraguay, comen frutos luego de tostarlos (Hieronymus, 1930). Las fibras de los tallos son tenaces y se han utilizado como textil, y los pelos de las semillas pueden utilizarse como lana. En medicina popular, con el látex se realizan buches para calmar el dolor de caries o favorecer la caída de los dientes (antiodontálgico). Para impedir la circulación del veneno, en caso de

mordedura de víboras, se recomienda efectuar ligaduras con sus tallos volubles (Martínez- Crovatto, 1981). Contiene peroxidasas en los tallos y caucho y resinas en el látex (Domínguez, 1928; Jankowski *et al*., 2000). No existen mayores estudios sobre su fitoquímica y actividades biológicas.

**Figura 2**: *Araujia brachystephana*. A. Vista general de la planta. B. Flores. C. Fruto abierto (IRUPE, 2021).

***Forsteronia glabrescens* Müll. Arg. (Apocynaceae)**

Nombres vulgares: enredadera leche, enredadera lechosa, isipí, isipó cambuí, isipó deSan Vicente, jazmín del monte y jazmín trepador (IRUPE, 2021). Es una liana robusta con tallos ramificados y glabros. Las hojas son opuestas con pecíolo de 0,2 a 0,5 cm longitud; lámina elíptica a levemente ovada u obovada, de 2,5 a 6 x 0,8 a 3 cm, con pequeños domacios en las axilas de los nervios secundarios en el envés, en lo demás glabras; base cuneada (excepcionalmente obtusa) y ápice agudo, levemente acuminado, muchas veces apiculado. Las inflorescencias son piramidales, de 3 a 6 cm longitud y 2 a 4 cm de diámetro aproximadamente; pedúnculo de hasta 2 cm longitud, glabro, brácteas triangular-ovadas, diminutas. Las flores son cortamente pediceladas, color crema, fragantes. El cáliz de lóbulos ovados, de 1 a 2 mm de longitud. La corola rotácea de 0,5 a 0,6 cm diámetro, las anteras oblongas, de 1,5 mm longitud. La semilla de 0,6 a 0,8 cm de longitud, con penacho de pelos de 2,5 a 3,5 cm de longitud (Flora Argentina, 2020). Se encuentra en el este de Bolivia, Paraguay oriental, sur de Brasil, norte de Uruguay y Argentina, en la zona de la cuenca de los ríos Paraná y Uruguay. En nuestro país es común en el este de Chaco y Formosa y en Misiones, Corrientes, norte de Santa Fe y norte de Entre Ríos, haciéndose más rara en el norte de Salta y Jujuy. Habita preferentemente en bordes o claros de selvas, bosques y matorrales húmedos (elevación de 0 a 800 m.s.n.m.) y florece en primavera (Flora Argentina, 2020).

Las lianas son explotadas exclusivamente para el comercio de artesanía, se utilizan para fabricar piezas pequeñas y delicadas como árboles de Navidad, aparadores y fruteros. El consumo

de lianas, así como la fabricación y venta de artesanías, variaban mucho de un mes a otro (Guadagnin y Gravato, 2013). *F. glabrescens* está poco estudiado por su fitoquímica y actividades biológicas, pero los órganos aéreos se utilizan popularmente en medicina tradicional como febrífugo; además, el género ha despertado interés para la obtención de látex (Larrosa, 2004). Algunos de los compuestos fitoquímicos aislados de esta familia fueron: glucósido de caudatina, flavonoides, kaureno, aspidospermina y quebrachamina; estos dos últimos también presentes en la corteza del árbol de quebracho (Alvarez, 2019).

**Figura 3**: *Forsteronia glabrescens*. A. Planta en general. B. Flores. C. Inflorescencia (IRUPE, 2021)

***Funastrum clausum* (Jacq.) Schltr. (Apocynaceae)**

Nombre vulgar: tasi, tasi chico (Flora Argentina, 2020; IRUPE, 2021). Es una enredadera, perenne, voluble, con tallos cilíndricos, cortamente pubescentes. Sus hojas son elípticas, de 2,5 a 7 cm de longitud x 5 a 30 mm de ancho; los pecíolos pubescentes, de 5 a 10 mm de longitud. Las cimas son umbeliformes y plurifloras. La corola es blanca, de 10 mm de diámetro, con lóbulos ovados, de 7 a 9 mm de longitud x 4 a 5 mm de ancho. En Argentina se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Santa Fe; es decir, en las regiones biogeográficas de Yungas y Paranaense, entre los 0-1400 m.s.n.m. En cuanto a los países limítrofes está presente en Brasil, Paraguay y Uruguay (Figura 4) (Flora Argentina, 2020).

Estas plantas exudan látex blanco pegajoso que contiene las endopeptidasas, que presentan actividad proteolítica de cisteína (Morcelle *et al*., 2004). Este es el único trabajo disponible sobre esta especie y su género, lo que la destaca dentro de la familia para investigaciones futuras (Morcelle *et al*., 2006).

**Figura 4**: *Funastrum clausum*. A. Planta general. B. Flores. C. Fruto. (Flora Argentina, 2020)

***Orthosia virgata* (Poir.) E. Fourn. (Apocynaceae)**

Es una enredadera, perenne, voluble, muy ramificada, con ramas de 3-4 m de longitud, con corteza suberosa, en los entrenudos apicales casi siempre con una línea de pubescencia de pelos recurvos a lo largo de los entrenudos, el resto de la superficie de los entrenudos es glabra o casi glabra. Sus hojas son angostas, ovales, acuminadas, de 15-38 mm longitud. Las inflorescencias de 5-8 flores, pedúnculo de 0,5-1 mm y pedicelos de 2-3 mm. Las flores de cáliz persistente, sépalos ovales de 0,8-1,2 mm longitud. Corola blanquecina de tubo breve y lóbulos oblongos, reflejos, de 2 mm longitud. La corona de lóbulos angostos, de ápice entero o bífido, de 1,5 mm longitud (Flora Argentina, 2020). Es una especie nativa, se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones y Santa Fe, es decir en lugares que varían de elevación entre 0-1000 m.s.n.m. En el litoral, habita en montes de suelo arcilloso, subhúmedos y también en las orillas de los bosques y selvas en galería. También está presente en países limítrofes como Brasil, Paraguay y Uruguay (Figura 5) (Flora Argentina, 2020).

La familia Apocynaceae es reconocida por la producción de alaloides indólicos con aplicaciones clínicas, como vinblastina y vincristina (anticancerígenos), atevirdina (anti-VIH), yohimbina (para disfunción eréctil), reserpina (antihipertensiva), ajmalicina (trastornos vasculares), ajmalina. (antiarrítmico) y vincamina (vasodilatador). Los principales géneros de la familia Apocynaceae son *Alstonia*, *Rauwolfia*, *Kopsia, Ervatamia* y *Tabernaemontana*. Debido a que *Orthosia* no pertenece a los géneros más analizados de esta familia, su estudio podría revelar nuevos alcaloides con una diversidad química y actividades biológicas significativas (Mohammed *et al*., 2021).

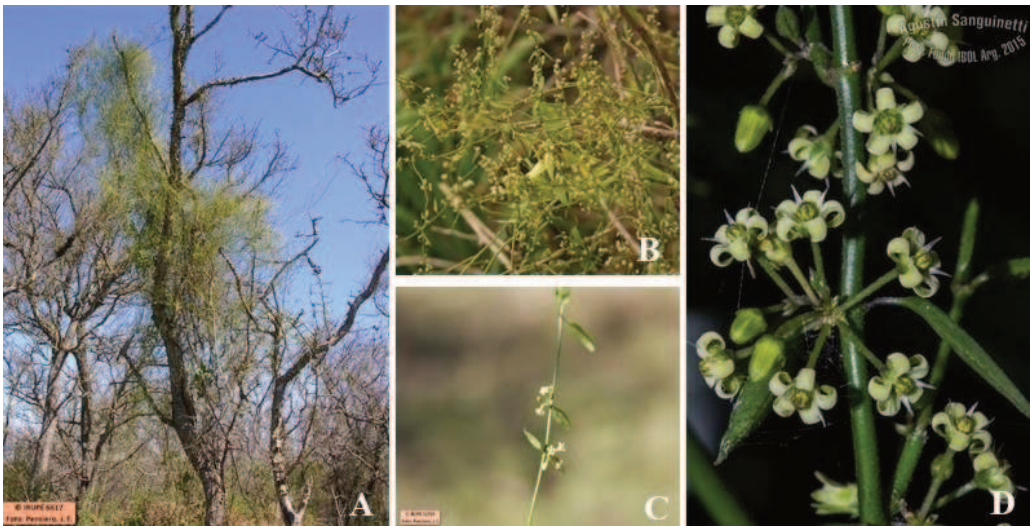



**Figura 5**: *Orthosia virgata.* A. Planta trepada a un chañar. B. Aspecto general. C. Flores. D. Rama florífera. Disponible en IRUPE, 2021 (4A y 4C), y en Flora Argentina, 2020 (4B y 4D).

***Tillandsia tricholepis* Baker (Bromeliaceae)**

Es una planta pequeña, epífita, perenne y caulescente con aspecto de musgo, de 25-45 mm de altura. Las hojas polísticas, triangulares, numerosas, de 6-9 x 1,5 mm, erectas, carnosas, imbricadas y vaina grabra. La inflorescencia pauciflora, de 1 a 5 flores, los pétalos de 2,5-3 x 1 mm, amarillos, lingüiformes y erguidos. Los estambres incluidos, gineceo de 1,2 mm, estilo más corto que el ovario. Las semillas son fusiformes (Flora Argentina, 2020). En Argentina se encuentra en las provincias de Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán; respecto a los países limítrofes en Brasil, Paraguay y Uruguay (Figura 6) (Flora Argentina, 2020). Las especies de *Tillandsia* tienen un alto endemismo, potencial ornamental, valor ecológico y/o posibles usos en las industrias química y farmacéutica (de Oliveira *et al*., 2021; Monteiro *et al*., 2011).

El género *Tillandsia*, en medicina tradicional, se reporta para tratar leucorrea, reumatismo, úlceras, hemorroides, remedio antidiabético, emético, analgésico, purgante, anticonceptivo, antiespasmódico y diurético (Keller *et al*., 1981; Adonizio *et al*., 2006; Vasconcelos *et al*., 2013; Delaporte *et al*., 2004; Bennett, 2000; Acebey *et al*., 2006). Los compuestos principales del género *Tillandsia* son: triterpenoides y esteroles (51%), flavonoides (45%) y ácidos cinámicos (4%) (Clemes *et al*., 2008; Vasconcelos *et al*., 2013); también se reportó la presencia de compuestos fenólicos en diferentes plantas de *Tillandsia* (Delaporte *et al*., 2006; Lowe *et al*., 2014). El género *Tillandsia* posee importancia también en la industria cosmética. Extractos de la parte aérea de *T.*

*usneoides*, *T. cyanea*, *T. tectorum*, *T. ionantha*, y *T. stricta* mejoran la piel áspera y mantienen la humedad (Ohara y Hori, 2001; Shoji *et al*., 2003; Kurokawa *et al*., 2004; Yokozeki, 2010). Los extractos y compuestos del género *Tillandsia* se han reportado con propiedades antineoplásicas, hipolipidémicas, antifúngicas, anti-HSV-1, hipoglucemiantes y microbicidas (Andrighetti-Fröhner *et al*., 2005; Keller *et al.,* 1981; Medon *et al*. ,1985; Li y Cui, 2013; Wang, 2013). También se informó que un hongo (*Xylariaceae* sp.), que es huésped de *T. usneoides*, sintetiza citocalasina, un metabolito con efecto citotóxico en líneas celulares tumorales humanas (Xu *et al*., 2015). *Tillandsia* tiene importancia cultural, económica y farmacológica, con gran potencial en muchos aspectos esenciales de la sociedad moderna (Estrella-Parra *et al*., 2019).

**Figura 6**: *Tillandsia tricholepis*. A. Aspecto general de la planta. B. Detalle de la planta. C. Flor (IRUPE, 2021).

***Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W. Grimes (Fabaceae)**

Nombres vulgares: anchi blanco, guejnuá, palo flojo, poctem, timbó, timbó atá, timbó atí, timbó blanco, pacará y timbó morotí (IRUPE, 2021; Flora Argentina, 2020; Scarpa, 2012). Es un árbol perenne de 2-18 m altura, arbustivos cuando juveniles; ramas hornótinas glabras. Las estípulas son triangulares, glabras o pubérulas. Las hojas tienen pecíolo con una glándula nectarífera elíptica a circular; los folíolos 12 a 27 mm x 3 a 8 mm. Los capítulos con flores heteromórficas, la central con disco nectarífero prominente y cáliz de 0,9 a 4 mm longitud (Figura 7) (Flora Argentina, 2020). Especie presente en Paraguay, Brasil, Uruguay y Argentina; en Argentina se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta y Santa Fe, es decir en las regiones biogeográficas Paranaense y Chaqueña. Es una especie que crece en suelos bajos e inundables; florece en diciembre y los frutos maduran en abril. Es empleada como buena madera para múltiples usos (Flora Argentina, 2020).

El género *Albizia* se caracteriza fitoquímicamente por la presencia de saponinas triterpénicas, lignanoides, flavonoides y glucósidos fenólicos (He *et al*., 2020; Hussain, 2018; Zhang *et al*., 2011).

**Figura 7**: *Albizia inundata*. A. Aspecto general. B. Hoja C. Fruto. (Flora Argetina, 2020).

***Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger (Fabaceae)**

Nombres vulgares: aroma, aromita, aromito, aromo, bebuja, caven, churque, churqui, espinillo, espinillo del bañado, espinillo negro, espinillo Santa Fe, junshatatayuc, quirinka, tusca, yaampa´alva (IRUPE, 2021). Es un arbusto perenne nativo, se encuentra desde los 0 a 3000 m.s.n.m. En Argentina se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán; también está presente en países como Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. Florece en agosto-setiembre y sus frutos maduran entre enero y abril (Figura 8) (IBODA, 2020; Lahitte *et al*., 1998).

El polvo de las hojas y corteza, en aplicación externa, es vulnerario; la infusión de la corteza, rica en taninos, en gárgaras, es expectorante y en gotas, antiotítico; en fomentos, es pectoral (Zacchino *et al*., 2012). En casos de otitis, se aplica como gotas óticas y por vía externa para cicatrizar llagas, quemaduras y heridas. La decocción de las flores se utiliza en Salta como antitusivo y digestivo. El polvo de las hojas y corteza se aplica por vía externa como vulnerario como también expectorante por vía interna (Alonso y Demachellier, 2005). Se ha informado acerca de varios metabolitos secundarios de diversas especies de *Vachellia*, incluidas aminas y alcaloides, ácidos grasos y aceites de semillas, aminoácidos no proteicos, terpenos, taninos hidrolizables, flavonoides y taninos condensados, entre otros (Seigler, 2003). Extractos de *V. caven* demostraron

propiedades antioxidantes sobre el radical DPPH y actividad antimicrobiana moderada sobre algunos agentes patógenos intrahospitalarios (Alonso y Demachallier, 1990). El extracto etanólico de la parte aérea demostró una inhibición *in vitro* entre el 20 y 40% frente a *Fusarium oxysporum* y *Pycnoporus sanguineus* (Quiroga *et al*., 2001).

**Figura 8**: *Vachellia caven*. A. Vista general del árbol. B. Flores. C. Fruto. (IRUPE, 2021).

***Pelargonium graveolens L'Hér.* (Geraniaceae)**

Nombres vulgares: malva rosa, geranio, rose geranium, rose-scent geranium, gerânio, sardineira (IRUPE, 2021; USDA, 2019). Es una especie ornamental y aromática, posee tricomas glandulares en los que se biosintetiza el aceite esencial (Blerot *et al*. 2016). Por destilación de sus hojas, se extrae un aceite esencial con perfume similar al de la rosa, se multiplica por gajos y existen unas 250 especies originarias perteneciente al género, en su mayoría de África (Figura 9) (Del Vitto *et al*., 1998; Dimitri y Parodi, 1977). El rendimiento del aceite oscila dependiendo del sistema de extracción (entre 0,16 y 0,22%) (Bouzenna y Krichen, 2013).

El aceite de *P. graveolens* mostró un alto efecto inhibitorio contra cepas de bacterias gram positivas como B. *cereus*, *B. subtilis* y *S. aureus.* (Silva y Fernandes, 2010).

**Figura 9**: *Pelargonium graveolens*. A. Aspecto general de la planta. B. Hojas. C. Flores (Alvarez, Norma).

***Melaleuca linearis* Schrad. & J.C. Wendl (Myrtaceae)**

Nombre vulgar: limpiatubo, narrow leaf, bottle rush (Das *et al.,* 2009). Es un arbusto de follaje persistente con hojas lineares de 5-10 cm de largo, ornamental, originario de Australia, florece en primavera y es utilizado por los australianos indígenas como medicamentos para la tos y los resfriados y como agentes antisépticos (Figura 10) (Lassak y McCarthy, 1983).

En sanidad vegetal, los aceites esenciales se destacan en la aplicación en el tratamiento de semillas y como plaguicidas (Pino *et al.*, 2011).

Las especies del género *Melaleuca* han sido utilizadas desde hace tiempo en la medicina popular en diversas regiones del mundo (Sharifi-Rad *et al*., 2017).

**Figura 10**: *Melaleuca linearis*. A. Aspecto general al estado reproductivo. B. Hojas C. Inflorescencias. (Alvarez, Norma).

***Pisonia zapallo* Griseb (Nictaginaceae)**

Nombres vulgares: alfiler, alpong, caspi zapallo, dochiya, mata pájaro, ombú-rá, palo bobo, palo zapallo, sopatach, tupasirí, yucurubuzú, yuquerí-ru-ruzú, yuquerí-si, yuqui-ribazú, y zapallo caspi (IRUPE, 2021). Es un árbol perenne de 4 a 15 m de alto, tronco de 0,60-1 m de diámetro; corteza grisácea y poco rugosa. Sus hojas son pecioladas, pecíolo de 0,8-5 cm de largo, opuestas o casi, fasciculadas en los braquiblastos, anchamente elípticas, de 2,6-9,5 × 1,5-6,6 cm, con base aguda. Las inflorescencias en cimas aglomeradas globosas, de 0,9-2 cm de diámetro. Las flores pistiladas cilíndricas, tubulosas y tomentosas (Figura 11) (Flora Argentina, 2020). Se encuentra en las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe y Tucumán, también está presente en Paraguay; habita entre los 0-1500 m.s.n.m. (IBODA, 2020). Por sus flores, es muy visitada por ápidos (*Apis mellifera* L.) (Nores *et al*., 2013).

Es utilizada por su madera para la fabricación de utensilios varios, también para confeccionar roldanas para pozos de agua. Respecto al uso medicinal, es utilizada contra la hidrocele testicular (Scarpa. 2012), como antidiabético, analgésico y depurativo sanguíneo; también se utiliza para tratar hernias (Rosso y Scarpa, 2019).

La especie emparentada *P. grandis*, se utiliza tradicionalmente como antirreumático y antifúngico; también se estudió por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antidiabéticas, diuréticas, analgésicas y cicatrizantes. Presenta diversos constituyentes fitoquímicos, principalmente alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides (Elumalai *et al*., 2012). *P. aculeata* es nativa de los trópicos de América y se considera introducida en África, Asia y Filipinas. Las tribus y los médicos nativos utilizan las hojas y la corteza para tratar trastornos hepáticos, inflamación, hinchazón, tos y tumores (Brown, 1980). El análisis fitoquímico preliminar de los extractos revela la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, saponinas y flavonoides (Gupta *et al*., 2015)

**Figura 11**: *Pisonia zapallo*. A. Aspecto general del árbol. B. Hojas. C. Flores. (IRUPE, 2021)

***Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae)**

Nombres vulgares: árbol lillo, calauchín, pimentón y pipí (IRUPE, 2021). Es una hierba nativa, perenne de 0,3-2 m de alto. Sus hojas con el pecíolo de 0,1-1 cm de largo; láminas de 3-15 × 1,7-6 cm; estípulas de 1-2,9 mm de largo. Las inflorescencias de 5-25 cm de largo. El fruto de 6-9 × 1,5-2,5 mm. En Argentina se encuentra en Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán; presente también en Brasil, Paraguay y Uruguay (Flora Argentina, 2020; IBODA, 2020).

Rosado-Aguilar *et al*., 2010, demostró que los extractos metanólicos obtenidos del tallo y las hojas lograron un 100% de mortalidad de larvas y adultos de *Rhipicephalus microplus,* lo que sugiere su potencial como acaricida. Estudios sugieren que la bioactividad de los extractos de hojas de *P. alliacea* podría estar relacionada al metabolito llamado isoarborinol (Zavala-Ocampo *et al*., 2017). Las propiedades antimicrobianas de *P. alliacea* han sido ampliamente documentadas (Silva *et al*., 2018).

**Figura 12**: *Petiveria alliacea*. A. Aspecto general. B. Hojas. C. Inflorescencia. D. flor (IRUPE, 2021).

***Polygonum stelligerum* Cham. (Polygonaceae)**

Nombre vulgar: catay amargo, catay, lambedor, yerba picante, hierba picante (IRUPE, 2021). Es una hierba perenne, flotante arraigada o palustre, de 1-3 m de altura, los tallos con pelos estrellados. Sus hojas de 5- 16 cm, alternas, simples, sagitadas o hastadas, discolores, híspidas, de ápice agudo; ócreas infundibuliformes de borde ciliado. Las flores son blancas, pequeñas, en inflorescencias terminales densas, de 1 a 2 cm de largo por 1 cm de diámetro. Sus frutos son aquenios de 3,5-4 × 2-3 mm, biconvexos. Se encuentra en el noreste de Argentina (Chaco, Misiones, Santa Fe, Corrientes, Entre Ríos, Buenos Aires e Isla Martín García), sur de Brasil (Paraná, Rio Grande do Sul y Sta. Catarina), Paraguay (Dptos. Misiones y Presidente Hayes). Habita en lugares bajos, inundables, a orillas de ríos y lagunas formando parte de pajonales, catayzales y camalotales. Florece en otoño (Lahitte *et al*., 2004; Flora Argentina, 2020

Los extractos de hojas de *P. stelligerum* se utilizan en la medicina popular para curar heridas infectadas (Zacchino *et al*., 1998). Se ha reportado la presencia de compuestos flavonoides, la mayoría de los cuales son derivados 3-O-glicosilados de los flavonoles quercetina e isoramnetina, 7-O-glicosilados de las flavonas crisoeriol y luteolina y C-glicosilflavonas de luteolina (Iwashina, 2013). Zacchino *et al*., 1998 reportaron la actividad del extracto DCM de *P. stelligerum* contra los dermatofitos *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum* con CIMs de 600 y 500 µg/mL, respectivamente.

**Figura 13**: *Polygonum stelligerum*. A. Comunidad. B. Hojas (IRUPE, 2021).

***Polygonum lapathifolium* L. (Polygonaceae)**

Es una hierba perenne, de 1-1,5 m de alto; los tallos son ascendentes o algo decumbentes, simples o ramificados, glabros o con escasos pelos adpresos, a veces glandulosos. Las hojas tienen pecíolos muy breves, láminas de 1-22 x 0,3-5 cm, lanceoladas hasta estrechamente lanceoladas, en algunos casos algo acuminadas, en general nervios y márgenes estrigosos, a veces los nervios secundarios son glabros, en algunos casos la cara abaxial de las hojas inferiores es tomentosa. Presenta inflorescencias y los frutos son aquenios lenticulares (Flora Argentina, 2020). Crece en zonas bajas, inundables y como maleza en arrozales y forma parte de los "cataysales" del Delta. Se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, Santa Cruz, Santa Fe, San Juan y San Luis, es decir desde 0-1000 m.s.n.m; también presente en Chile, Paraguay y Uruguay (IBODA, 2020).

Algunas especies de *Polygonum* se utilizan en la medicina tradicional como agentes diuréticos, antihemorrágicos y antisépticos (Ozarowski y Jaroniewski, 1987). Los extractos acuosos y etanólicos de flores, hojas y raíces tienen actividad antimicrobiana (bacterias Gram+ y microbacterias). Presenta compuestos no identificados capaces de provocar dermatitis e intoxicaciones en vacunos (Marzocca, 1997). Se ha demostrado que varios flavonoides aislados de estas plantas tienen actividades antivirales, antioxidantes y anticancerígenas. Pinostrobina (5-hidroxi-7-metoxiflavona) es una flavona aisalada de *P. lapathifolium* L. ssp. *nodosum*, que ingresa rápidamente del citoplasma hasta el núcleo celular de las células cultivadas y proporciona una respuesta apoptótica intensiva; por ello, puede considerarse un buen candidato como agente quimiopreventivo contra la leucemia (Smolarz *et al*., 2006). *P. lapathifolium* exhibió efectos sobre la inducción de EBV-EA y efectos antitumorales sobre la carcinogénesis de la piel en dos etapas de estudio en ratones (Dong *et al*., 2014).

Existe efecto antihelmíntico del extracto metanólico de raíces de *P. lapathifolium*. (Bulbul *et al*., 2013). La composicón química del aceite esencial de esta especie está constituida por dodecanal (25,65%), óxido de cariofileno (13,35%), *β*-cariofileno (7,95%) y (E)-*β*-farneseno (6,20%) (Demirpolat, 2022).

**Figura 14**: *Polygonum lapathifolium*. Inflorescencia (IBODA, 2020)

***Persicaria acuminata* (Kunth) M. Gómez (Polygonaceae)**

Nombres vulgares: catay, catay grande, yerba de bicho, sanguinaria del agua, cien nudos, lagunilla, yerba picante, plumerillo del campo, capiticova y ca´atái (Lahitte *et al*., 1998). Las plantas varían ampliamente desde herbáceas anuales de menos de 5 cm de altura a herbáceas perennes erguidas que crecen hasta 3-4 m. Son acuáticas y crecen como plantas flotantes en estanques. Las hojas tienen entre 1 y 30 cm de largo, estrechas, lanceoladas. Los tallos son a

menudo rojos o rojizos. Las flores son pequeñas, blancas, y aparecen en verano en racimos oscuros de las juntas de las hojas o los ápices del tallo, floreciendo en otoño (Figura 15) (Narasimhulu *et al*., 2014). El género *Persicaria*, se distribuye en todo el mundo en climas templados. En Argentina, *P. acuminata* crece en las tierras bajas del noreste y centro de Argentina (Derita *et al*., 2008; Derita y Zacchino, 2011). Se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Luis y Tucumán, también está presente en Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay (IBODA, 2020).

Varias especies del género *Persicaria* se utilizan en la medicina popular en diferentes partes del mundo para tratar muchas enfermedades como infecciones de la piel, disentería, mordeduras de serpiente, hemorroides, insomnio, enfermedades cardíacas y también como protector hepático (de Almeida Alves *et al*., 2001).

**Figura 15**: *Persicaria acuminata*. A. Aspecto general de la planta. B. Tallo. C. Inflorescencia (IBODA, 2020).

***Clematis montevidensis* Spreng (Ranunculaceae)**

Nombres vulgares: barba de chivo, barba de viejo, bejuco, bejuco caústico, cabello de ángel, cabello de indio, cabello de vieja, centella, clematide, loconte, parra, parra plumero, plumero, tuyá redivivá, tuyá-rendivá y zocate (IRUPE, 2021). Es una enredadera amarga, liana, rizomatosa,

con tallos estriados, glabrescentes, sus hojas opuestas, pecioladas, con 3 a 5 folíolos enteros, dentados, partidos o sectados, asimétricos, ovados o elípticos, de 2 a 8 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho, subglabros. Las flores con pétalos de 10 mm de largo, en inflorescencia multifloras. Sus frutos son poliaquenios con estilos plumosos de 10 cm de largo. Florece en primavera y en verano (Flora Argentina, 2020). Se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Río Negro, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán. En los países limítrofes de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay, y es común en selvas, bosques higrófilos, bordes de caminos y sobre cercos (Lahitte *et al*., 2004; Flora Argentina, 2020).

En la medicina popular, las hojas son utilizadas en cataplasmas como antineurálgicas, cáusticas y rubefacientes; también sirven para curar lastimaduras agusanadas de los animales, y como antídoto para mordeduras de víboras. La infusión de las hojas se aplica externamente para combatir las pecas, lepra, sarna y otras enfermedades cutáneas. Con las flores se confeccionan colchones antirreumáticos, y los estilos plumosos se utilizan secos, externamente, como vulnerario. Contiene oxidasas, heterósidos y resinas en los tallos, y también clematina, principio tóxico, por lo cual sólo se emplea externamente (Lahitte *et al*., 2004).

**Figura 16**: *Clematis montevidensis*. A. Hojas. B. Infrutescencia. C. Aspecto general. D. Infrutescencia femenina (IRUPE, 2021).

***Solanum argentinum* Bitter & Lillo (Solanaceae)**

Nombres vulgares: hediondillo del monte, afata, yuyo cabra, duraznillo blanco, malfato, ruma yuyo y duraznillo del burro (Alaria *et al.*, 2013; Trillo *et al*., 2014; Solis *et al*., 2011). Es un

arbusto perenne, que puede alcanzar hasta de 2 m de altura, posee multiplicación vegetativa mediante raíces gemíferas; sus tallos son erectos, con pubescencia densa a esparcida de tricomas, ramas viejas con corteza castaño rojiza, brillante; brotes y órganos jóvenes con pubescencia densa o esparcida. Presenta inflorescencia internodal o terminal, de 2,5-10 cm, ramificada hasta 6 veces; corola hendida hasta ¾ de su longitud, blanca, de 0,8-1 cm de diámetro. La baya es globosa, de 5-6 mm de diámetro, amarilla o anaranjada en la madurez (Figura 17) (Flora Argentina, 2020). Es una especie nativa presente en las provincias de Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe y Tucumán, es frecuente en los bosques chaqueños y vegetación secundaria. Muy frecuente en terrenos modificados del valle de Lerma (Novara *et al*., 2010). En cuanto a los países limítrofes, se encuentra también en Bolivia y Paraguay.

Sus raíces y hojas presentan diversas propiedades medicinales, las primeras se usan por su acción antivenérea; las segundas se emplean como febrífugo para aliviar el dolor de huesos, de cabeza, resfríos (Scarpa, 2004; Barboza, 2006) y por su acción antimalaria, inhibiendo la maduración de esquizontes de *Plasmodium falciparum* (Paco *et al*., 2004; Bourdy *et al*., 2004). Existen trabajos que documentan el uso de la farmacopea natural en la prevención y cuidado de la salud oral entre los tobas del Chaco Central (Argentina). Se utilizan raíces y hojas en infusiones como antiodontálgico (Martínez, 2010). También presentan interés en la actividad apícola de acuerdo a información relevada en el Departamento Ojo de Agua (Santiago del Estero), así como también en el sureste de la provincia de Córdoba (Carrizo *et al*., 2015; Solis *et al*., 2011). También, *S. argentinum* presenta valor forrajero (Scarpa, 2007). Se utilizan sus hojas y ramas, por su característica tintórea (amarillo o amarillo verdoso) (Palacio, 2007). Presenta acción repelente: extractos etanólicos de *S. argentinum* repelieron el 55.0% de *Sitophilus oryzae* (Suleiman *et al*., 2018). Se observó efecto repelente del extracto héxanico de *S. argentinum* sobre *S. oryzae* (Viglianco *et al*., 2008); y presentó actividad inhibitoria de la tirosinasa (Chiari *et al*., 2010).

Esta planta posee esteroides, lípidos y aceites en sus semillas. Las semillas se destacan por ser fuente de aceites, entre ellos se encuentran los ácidos grasos linoleico, oleico y palmítico (Lucini *et al.,* 1994; Barboza *et al.*, 2006). *S. argentinun* presentó baja inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* (Carpinella *et al.*, 2010).

**Figura 17**: *Solanum argentinum.* A. Aspecto general de la planta. B. Inflorescencia. C. Infrutenscencia (IRUPE, 2021).

***Solanum granulosum-leprosum* Dunal (Solanaceae)**

Nombres vulgares: tabaquillo del monte, fumorado, fumo bravo y cambará (Ríos *et al*., 2010; Cabrera *et al*., 2013). Es un árbol de 2-10 m de alto, tallos adultos glabrescentes, los más jóvenes pubescentes, con tricomas ramificados. Las hojas solitarias; pecíolos de 15-42 mm; láminas angostamente ovadas a elípticas, de 10-24 × 2,5-7,8 cm; hojas axilares ausentes a presentes y muy desarrolladas, ovadas. Presenta inflorescencia terminal o subterminal, ramificada varias veces, pluriflora, con más de 60 flores; cáliz violeta pálido, celeste, lila, o púrpura. El fruto es una baya de 10-17 mm, amarilla a castaño-amarillenta, tomentosa; semillas castaño claras, de 1,7-2,8 × 1,5-2,3 mm. Posee una corteza semi-lisa con fisuras cortas (Figura 18) (Flora Argentina, 2020; Von Lücken, 2015). Es una especie nativa, se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones y Santa Fe. Desde el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y nordeste de la Argentina hasta Buenos Aires; crece en lugares húmedos, hasta los 1000 m.s.n.m. (Flora Argentina, 2020). Es utilizada como planta ornamental (Roger *et al.*, 2016), posee un interés apícola, así como también es necesaria para la vida silvestre. El principal interés asociado a esta especie es la recuperación de ecosistemas degradados, dado que es considerada una especie pionera, de crecimiento rápido buena para la mejora del suelo y atrae fauna (Montagnini *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2010; Carpanezzi, 1998). Sus hojas son utilizadas como antiinflamatorio de uso externo y sus bayas se emplean como calmante (sobre todo del dolor de cabeza) y en cataplasmas contra úlceras y lesiones de la piel. La decocción de las hojas y de los frutos se emplean como fumigante contra mosquitos y piojos en el hombre y los animales (Petenatti *et al*., 1998); la decocción de la corteza se utiliza para dolor de dientes y en casos de picadura de víbora (Fogel *et al*., 2016).

Toda la planta es rica en solanina y contiene saponinas, siendo una de ellas la solasodina, presente en frutos y hojas; a ellas se agregan oxidasas y resinas. Además, han sido hallados alcaloides, sapogeninas esteroidales y taninos. Las flores y hojas han mostrado acción antibacteriana (Petenatti *et al*., 1998).

**Figura 18:** *Solanum granulosum-leprosum.* A. Aspecto general. B. Hojas. C. Inflorescencia (IRUPE, 2021).

***Solanum pilcomayense* Morong (Solanaceae)**

Nombre vulgar: tomatillo del monte (IRUPE, 2021). Es una hierba perenne o subarbusto, a veces apoyantes, puede alcanzar hasta 2 m de altura, muy poco ramificados; tallos aristados, angostamente alados, con procesos espinulosos evidentes, tallos adultos pubérulos, los más jóvenes con pubescencia de tricomas glandulares cortos o largos. Sus hojas son largamente pecioladas, posee inflorescencia extra-axilar a subopuesta a las hojas, alargada, con 5-9 flores; pedúnculos delgados, de 1,3-2,2 cm, pubescentes; corola profundamente estrellada, de 6-8,5 mm, blanca, lóbulos angostamente triangulares. El fruto es una baya globosa, de 6-8 mm de diámetro (Figura 20) (Flora Argentina, 2020). Es una especie nativa, se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán. Es bastante común en lugares húmedos, cercanos a ríos, entre los 400 y 1500 m.s.n.m. También se encuentra en Brasil y Paraguay (Flora Argentina, 2020; Palchetti *et al*., 2020; Cantero *et al*., 2016; Brumnich *et al*., 2019; Knapp *et al*., 2019).

Existen pocos reportes sobre sus sus componentes o bioactividades. El estudio más relevante, demostró la actividad antiprotozoaria de los extractos de la parte aérea (Muelas Serrano *et al*., 2000).

**Figura 19**: *Solanum pilcomayense.* A. Planta en flor. B. Flores. C. Frutos (IRUPE, 2021).

***Solanum caavurana* Vell. (Solanaceae)**

Nombres vulgares: palo agui, laranjinha do mato, jurubebaranaor o jurubeba-branca (Flora Argentina, 2020). Es un arbusto o árbol pequeño de 1-5 m de alto, troncos de hasta 10 cm de diámetro en la base; ramas jóvenes glabras, delgadas y oscuras, ramas viejas con corteza pálida y rugosa. Sus hojas mayores con pecíolos de 7-12 mm, láminas elípticas u ovadas, de 8-18 × 3-8 cm, con el ancho máximo en la zona media. Inflorescencia de 5-20 flores, opuesta a las hojas, simple, de 1-4,5 cm, glabra o finamente glandulosa. Posee baya globosa, de 1-1,5 cm de diámetro, blanco-verdosa, amarilla en la madurez (Figura 20) (Flora Argentina, 2020). Se encuentra en las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones, es decir, en el Nordeste de la Argentina. También está presente en los países limítrofes de Brasil y Paraguay, en las selvas lluviosas o bien, formando manchones a elevaciones cercanas a los 250 m.s.n.m. (Flora Argentina, 2020; Ferreira *et al*., 2013; Cielo-Filho *et al*., 2017; Silva, 2019; Lima-Verde *et al*., 2014). Es una especie pionera utilizada en el proceso de restauración de áreas degradadas, como por ejemplo en la Selva Atlántica brasileña, en uno de los biomas más diversos y amenazados del mundo (Bianconi *et al*., 2012). En la medicina popular es utilizada para el tratamiento de anemia, para los trastornos hepáticos y digestivos (Vaz *et al*., 2012), también posee un uso etnofarmacológico para combatir el mal de Hansen (Vaz., 2013).

Los frutos maduros de *S. caavurana* presentan una gran diversidad de alcaloides esteroidales (Vaz *et al*., 2012). Los frutos presentan capacidad antioxidante (Pereira *et al*., 2019).

**Figura 20**: *Solanum caavurana*. A. Aspecto general de la planta. B. Rama com frutos C. Flor (IRUPE, 2021).

***Lantana megapotamica* (Spreng.) Tronc. (Verbenaceae)**

Nombre vulgar: camará morado, camará (IRUPE, 2021, Lahitte *et al*., 1998). Es un arbusto de 40-60 cm de altura, sus hojas opuestas, pecioladas; con pecíolos hasta de 6 mm de largo; láminas de 1,5-3,5 x 0,8-2,5 cm. Las florescencias en cabezuelas axilares densas, pedunculadas; corola violácea a rosado con centro blanco y garganta amarilla, con tubo de 3-5 mm de largo. Los frutos esféricos a subesféricos, subcarnosos, negros a la madurez de 3,5-5 mm de diámetro (Figura 21) (Flora Argentina, 2020; IBODA, 2020). Se encuentra entre los 0-1000 m.s.n.m., en las regiones Monte, Pampeana, Espinal y Chaqueña. En las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, La Rioja, Misiones, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan y San Luis; también presente en Brasil, Paraguay y Uruguay (Flora Argentina, 2020; Martínez y Ferruci, 2005). Florece en verano y fructifica en otoño.

Es utilizada en infusiones, en tomas, es refrescante, sedativa, digestiva, carminativa, antirreumática, febrífuga y diurética (Lahitte *et al*., 1998; Arambarri *et al*., 2006). Es utilizada como ornamental, cultivada para los cercos vivos. Es tóxica para el ganado (Lahitte *et al*., 1998. Se documentó el conocimiento por la medicina tradicional de la “Sierra de Comechingones” (Córdoba,

Argentina), en la cual esta especie presenta acción febrífuga, utilizando sus hojas y tallos Goleniowski *et al*., 2006). También se caracteriza por presentar alcaloides, triterpenoides, oxidasas y aceites esenciales en su comosición (Lahitte *et al*., 1998).

**Figura 21**: *Lantana megapotamica*. A. Aspecto general de la planta. B. Hojas y flores. C. Flores (IRUPE, 2021).

***Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae)**

Nombres vulgares: lipia, poleo, romerillo, salvia, salvia colorada, salvia del campo, salvia del monte, salvia morada, salvia trepadora y yerba buena (IRUPE, 2021). Es un arbusto de 60 a 150 cm de alto, aromáticos; ramas delgadas. Sus hojas opuestas o ternadas; pecíolos de 1-10 mm de largo; láminas ovadas o elípticas; florescencias menores que las hojas terminales, 1-2 por axil. Cáliz bi-dentado, densamente pubescente; corola rosada, lilácea o blanca, amarilla en el interior del tubo. El fruto es subgloboso u obovoide, de 2,8-3 mm de diámetro. Florece en primavera y verano (Figura 22) (Flora Argentina, 2020). Se trata de un taxón muy variable y polimorfo, ampliamente distribuido en Sudamérica tropical y subtropical, presente en las regiones Yungas, Paranaense, Pampeana, Espinal y Chaqueña; crecen hasta los 1000 m.s.n.m. A nivel nacional, en Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Santa Fe; y en cuanto a la región, en Brasil, Paraguay y Uruguay (Flora Argentina, 2020; IBODA, 2020; Lahitte *et al.*, 1998).

En medicina popular, las decocciones de las hojas frescas se usan con frecuencia como analgésico, eupéptico y para tratar trastornos gastrointestinales como espasmos e indigestión (Di Stasi, 1994). En Chaco, se ha descrito que esta especie también se usa como antitusiva,

descongestiva, para el dolor de garganta y dolores de cabeza. Las partes aéreas se utilizan de forma externa para tratar enfermedades cutáneas, quemaduras, heridas y úlceras. La infusión de las raíces también se usa contra los resfriados y la tos (Scarpa, 2004). En otras regiones de Argentina, se usa como tintura preparada con 200 g de hojas secas y 70° de etanol (Alonso y Demachellier, 2005). Es una especie muy rica en aceites esenciales, se emplean para aromatizar y saborizar distintos productos medicinales, y para elaborar el mentol artificial (Pensiero y de la Peña, 2000). El rendimiento en hojas de aceite esencial alcanza el (0,51-5%), y su componente principal es el limoneno (Terblanché y Kornelius, 1996). En un estudio realizado en nuestro país, se han definido 5 variedades: tipo santafesina (con *α*-pineno, dihidrocarvona, alcanfor, citral y linalol), tipo entrerriana I (con *d*-limoneno y lipiona), tipo entrerriana II (con *d*-piperitona), tipo norte santafesino (con citral), y tipo tucumano con (-)-piperitona, limoneno y 1,8-cineol) (Blanco *et al.,* 2013).

El AE de esta especie, rico en monoterpenos oxigenados, se ensayó frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. neoformans*, *T. rubrum* y *Fonsecaea pedrosoi*, presentando halos de inhibición entre 1,1 a 5 cm (Oliveira *et al*., 2006). En hongos fitopatógenos, el aceite esencial fue probado en la germinación de teleutosporas de *Ustilago scitaminea*, conidios de *C. falcatum* y *Curvularia lunata*, siendo todos inhibidos a concentraciones desde 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm (Rao *et al*., 2000). Otros hongos fitopatógenos como *Fusarium sp*., *Penicillium funiculosum* y *Sclerotinia sclerotiorum* también fueron inhibidos a concentraciones de 1 µg/mL (De Oliveira Arruda *et al*., 2019).

**Figura 22**: *Lippia alba*. A. Planta en flor. B. Hojas e inflorescencia. C. Inflorescencia (IRUPE, 2021).

***Lippia turbinata* Griseb (Verbenaceae)**

Nombres vulgares: poleo, poleo fino, hierba poleo, té criollo, menta poleo y té del país (IRUPE, 2021; Hurrell *et al*., 2011). Son arbustos aromáticos que se extienden por el centro y oeste de la Argentina, habitan principalmente en las provincias fitogeográficas del Chaco, Monte y del Espinal (Figura 23). Es un arbusto nativo, de 1-2 m de altura, muy ramificado. Sus hojas opuestas o ternadas, elípticas. Inflorescencias en capítulos axilares. El cáliz persistente, corola blanca a blanco-lilacina, tubuloso-bilabiada, de limbo reducido y tubo de 2,5-3 mm de largo. Fruto obovoide; formado por clusas de 2 x 1,8 mm. Se encuentra en las regiones Yungas, Monte, Espinal y Chaqueña, es decir, entre los 0-1500 m.s.n.m. En Argentina, en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan y San Luis. También está presente en Perú, Chile y Paraguay (Hureell *et al.*, 2011; Flora Argentina, 2020).

Es una de las especies utilizadas tradicionalmente en Argentina contra el "empacho" (Martinez-Crovetto, 1981). Contraindicada en el embarazo, la lactancia, y en niños menores de 6 años (ANMAT, 2011). La esencia se obtiene en plena floración, es amarillenta y de olor similar al del limón (Hurrell *et al*., 2008).

**Figura 23**: *Lippia turbinata*. A. Aspecto general de la plantan. B. Hojas. C. Inflorescencia (IRUPE, 2021).

## BIBLIOGRAFÍA CITADA


Abd-Elkader, D. Y., Salem, M. Z., Komeil, D. A., Al-Huqail, A. A., Ali, H. M., Salah, A. H., & Hassan, H. S. (2021). Post-harvest enhancing and *Botrytis cinerea* control of strawberry fruits using low cost and eco-friendly natural oils. *Agronomy*, 11(6), 1246.

Acebey, A., Kessler, M., Maass, B., & Kromer, T. (2006). Araeas y bromelias de Bolivia. Botánica Económica de los Andes Centrales, 434-448.

Adonizio, A. L., Downum, K., Bennett, B. C., & Mathee, K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal Ethnopharmacology,* 105, 427-435.

Agarwal, K. K., Khanuja, S. P., Ahmad, A., Santha Kumar, T. R., Gupta, V. K., & Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 59-63. https://doi.org/10.1002/ffj.1040.

Agostini, J. P., Mackenzie, S. J., & Adaskaveg, J. E. (2006). Effect of Fungicides and Storage Conditions on Postharvest Development of Citrus Black Spot and Survival of *Guignardia citricarpa* in Fruit Tissues. *Plant Disease* 90 (11), 419-1424. https://doi.org/10.1094/PD-90-1419.

Agostini, J.P. (2008). Manejo integrado de enfermedades de los frutales cítricos. En: Sozzi, G.O. (Ed.). (481-511) Árboles Frutales, Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento. Editorial Facultad Agronomía, Universidad de Buenos Aires. pp. 805.

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. pp. 952.

Aguilar-Veloz, L. M., Calderón-Santoyo, M., Vázquez González, Y., & Ragazzo- Sánchez, J. A. (2020). Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: Advances and challenges. Food Sciences and Nutrition, 8(6), 2555-2568. https://doi.org/10.1002/fsn3.1437.

Aguilar-Vildoso, C. I., Ribeiro, J. G. B., Feichtenberger, E., Goes, A. D., & Spósito, M. B. (2002). Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos Citros. Brasilia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimiento, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. *Projeto CE-MERCOSUL ALA*, 93(143),59.

Alaria, A., Arroyo-Leuenberger, S., Barboza, G. E., Basso, A. V., Bernardello, G., Carrizo García, C., Clausen, A., Chiarini, F. E., Cocucci, A. A., Cosa, M. T., Giacomin, L., Greppi, J. A., Knapp, S., Machado, S., Matesevach Becerra, M., Peralta, I. E., Rodrigues, I. M. C., Romanutti, A.

A., Särkinen, T. E., Spooner, D. Stehmann, J. R., Stern, S., & Toledo, J. M. (2013). Solanaceae. *Flora Argentina* 13, 120-213.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & M. Blackwell. (1996). Introductory Micology. Wiley, New York, New York, USA.

Al-Fadhal, F. A., AL-Abedy, A. N., & Al-Janabi, M. M. (2018). Molecular identification of novel isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn and *Fusarium* spp. (Matsushima) isolated from petunia plants (*Petunia hybrida* L.). *Plant Archives*, 18(1), 703-711. http://plantarchives.org/PDF%20181/703-711%20(PA3%204178).

Alonso, J. R. (1998). Tratado de Fitomedicina: Bases Clínicas y Farmacológicas. Buenos Aires, Argentina, Editorial Isis.

Alonso, J., & Desmarchelier, C. (2005). Plantas autóctonas medicinales de la Argentina. Buenos Aires, Argentina, LOLA.

Alvarez, M. A. (2019). Pharmacological properties of native plants from Argentina Cham, Switzerland: Springer. pp. 1-242.

Alvarez, N. H., Stegmayer, M. I., Seimandi, G. M., Pensiero, J. F., Zabala, J. M., Favaro, M. A., & Derita, M. G. (2023). Natural Products Obtained from Argentinean Native Plants Are Fungicidal against Citrus Postharvest Diseases. *Horticulturae*, 9(5), 562.

Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Encinar, J. A., Rodríguez-Díaz, J. C., & Micol, V. (2020). Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. *Current Medicinal Chemistry*, 27(15), 2576-2606.

Andrighetti-Fröhner, C. R., Sincero, T. C., Da Silva, A. C., Savi, L. A., Gaido, C. M., Bettega, J. M., Mancini, M., de Almeida, M. T., Barbosa, R. A., Farias, M. R., Barardi, C.R., & Simões, C.M. (2005). Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia* ,76, 374-378.

ANMAT. (2011). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. www.anmat.gov.ar.

Arambarri, A. M., Freire, S. E., Colares, M. N., Bayón, N. D., Novoa, M. C., Monti, C. L. A. U. D. I. A., & Stenglein, S. A. (2006). Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Gallery forests of the Paranaense Province (Argentina). Part 1. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41(3-4), 233-268.

Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.

Babu, K. G., & Kaul, V. K. (2005). Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and fragrance journal*, 20(2), 222-231. https://doi.org/10.1002/ffj.1414.

Bailac, P. N., Gende, L., Gascón, A., Fritz, R., Ponzil, M. I., & Eguaras, M. (2006). Control of *Ascosphaera apis* and *Paenibacillus larvae* subsp. larvae by the use of essential oils for obtaining beehive products without toxic residues. *Molecular Medicinal Chemistry*, 11, 1-2. http://idecefyn.com.ar/mmcv11/01mmv11.pdf.

Ballhorn, D. J, Kautz, S. M., & Heil, A.D. (2009). Hegeman, Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. *PLoS One*, 4, 735-745.

Barboza, G. E., Cantero, J. J., Nuñez, C. O. & Ariza Espinar, L. (2006). Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). *Museo Botánico Córdoba*. Argentina.

Barón, R.D. & Villa, A.L. (2013). Evolución de los parámetros de calidad de naranja Valencia producida en el municipio de Chimichagua, Cesar–Colombia. *Temas Agrarios*, 18(1), 66-74.

Belay, Z. A., Caleb, O. J., & Opara, U. L. (2019). Influence of initial gas modification on physicochemical quality attributes and molecular changes in fresh and fresh-cut fruit during modified atmosphere packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100359. https://https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100359.

Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J.P., Cazaux, S., & Bouajila, J. (2010). Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *Journal. Food Science*, 75(6), C466-72.

Bennett, B. C. (2000). Ethnobotany of Bromeliaceae. En: Benzing DH. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Bertus, A. L. (1981). Fungicidal control of black spot and melanose on coastal Valencia oranges in New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 10, 53-55.

Bianconi, G. V., Suckow, U. M., Cruz-Neto, A. P., & Mikich, S. B. (2012). Use of fruit essential oils to assist forest regeneration by bats. *Restoration Ecology*, 20(2), 211-217.

Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3… 5.1 million species? *American journal of botany*, 98(3), 426-438. https://doi.org/10.3732/ajb.1000298.

Blainski, A., Piccolo, V. K., Mello, J. C. P., & de Oliveira, R. M. (2010). Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 541-544.

Blanco, M. A., Colareda, G. A., van Baren, C., Bandoni, A. L., Ringuelet, J., & Consolini, A. E. (2013). Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 803-809. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.007.

Blerot, B., Baudino, S., Prunier, C., Demarne, F., Toulemonde, B., & Caissard, J.C. (2016). Botany, agronomy and biotechnology of *Pelargonium* used for essential oil production. *Phytochemistry Reviews*, 15, 935-960. https://doi.org/10.1007/ s11101-015-9441-1.

Boncan, D. A. T., Tsang, S. S., Li, C., Lee, I. H., Lam, H. M., Chan, T. F., & Hui, J. H. (2020). Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7382. https://doi.org/10.3390/ijms21197382.

Bourdy, G., Oporto, P., Gimenez, A., & Deharo, E. (2004). A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI: Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *Journal Ethnopharmacology,* 93 (2-3), 269-277.

Bouzenna, H., & Krichen, L. (2013). *Pelargonium graveolens* L'Her. and *Artemisia arborescens* L. essential oils: chemical composition, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* and insecticidal activity against *Rhysopertha dominica*. *Natural Product Research*, 27(9), 841-846. https://doi.org/10.1080/14786419.2012.711325.

Brandão, M., Zanetti, N., Oliveira, P., Grael, C., Santos, A., & Monte-Mór, R. (2008). Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology,* 120,141-148.

Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian Journal of Botany*, (1), 1-6. https://www.researchgate.net/publication/324476579.

Brophy, J. J., Goldsack, R. J., Forster, P. I., Craven, L. A., & Lepschi, B. J. (1998). The leaf essential oils of the Australian members of the genus *Callistemon* (Myrtaceae). *Journal Essential Oil Research*, 10(6), 595-606.

Brown, J. P. (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. Mutation *Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 75(3), 243-277.

Brumnich, F., Marchetti, Z. Y., & Pereira, M. S. (2019). Changes in forest diversity over a chronosequence of fluvial islands. *Forest-Biogeosciences and Forestry*, 12(3), 1-21.

Brunetti, C., Fini, A., Sebastiani, F., Gori, A., & Tattini, M. (2018). Modulation of phytohormone signaling: A primary function of flavonoids in plant–environment interactions. *Frontiers in Plant science*, 9, 1042. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01042.

Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.007.

Bulbul, L., Uddin, J., Mojumder Sushanta, S., Tanni, S., Ferdowshi Nipa, A., Baul, S. (2013). Phytochemical investigation and evaluation of antiemetic and anthelmintic activities of *Polygonum lapathifolium* roots extract. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 4(5), 2632-2637.

Cabrera, M., Andrada, A., & Gallez, L. (2013). Floración de especies con potencial apícola en el Bosque nativo Formoseño, distrito Chaqueño oriental (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 48(3-4), 477-491.

Cai, Z. M., Peng, J. Q., Chen, Y., Tao, L., Zhang, Y. Y., Fu, L. Y., & Shen, X. C. (2021). 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian natural products research*, 23(10), 938-954. https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1839432.

Calderón, Á. I., Romero, L. I., Ortega-Barría, E., Solís, P. N., Zacchino, S., Gimenez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., & Guerra, C. (2010). Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology*, 48, 545-553.

CAME. (2022). ¿Cómo sacarle más jugo a la naranja?: El productor es el único actor de la cadena de valor que no presenta ganancias. Confederación Argentina de la Mediana Empresa.

https://www.redcame.org.ar/prensa/11697/como-sacarle-mas-jugo-a-lanaranja-el-productor-es-el-unico-actor-de-la-cadena-de-valor-que-no-presentaganancias.

Campana B. (2007). Índices de Madurez, Cosecha y Empaque de frutas. En: Campana, B. M. R., Ochoa, M. J., & Sozzi, G. O. (eds.). Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento, (pp. 705-768). Editorial Facultad de Agronomía. Argentina.

Campos-Navarro, R., & Scarpa, G. F. (2013). The cultural-bound disease "empacho" in Argentina. A comprehensive botanico-historical and ethnopharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology,* 148(2), 349-360. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.002.

Cantero, J. J., Palchetti, V., Núñez, C. O., & Barboza, G. E. (2016). Halophytic flora of Argentina: a checklist and an analysis of its diversity. En: Sabkha *Ecosystems* (pp. 137-204). Springer, Cham.

Carciofi, I.; Maspi, N., & Guevara Lynch, J. P. (2021). Cítricos dulces en Argentina Antecedentes productivos, catalizadores tecnológicos y experiencias internacionales de la industria citrícola. *Secretaría de Industria y Desarrollo Productivo,* 39. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/39_-_citricos_dulces_-_argentina_productiva.pdf.

Carpanezzi, A. A. (1998). Espécies para recuperação ambiental. Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais. *Colombo: Embrapa Florestas*, 43-53.

Carpinella, M. C., Ruiz, G., & Palacios, S. M. (2010). Screening of native plants of central Argentina for antifungal activity. *Allelopathy Journal*, 25(2), 23-431.

Carpintero, D., & Testoni, D. (2013). Insects found on *Araujia* species (Apocynaceae, Asclepiadoideae) in Argentina. Revista del Museo *Argentino de Ciencias Naturales Nueva Serie*, 15(2), 279-288.

Carrizo, E. D. V., Palacio, M. O., Müller, H. J., Vittar, M. E. & Céspedes, F. N. (2015). Especies de interés apícola en la flora del departamento Ojo de Agua, Santiago del Estero, Argentina. *Quebracho*. *Revista de Ciencias Forestales*, 23(2), 100-104.

CASAFE. (2017). Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Buenos Aires, Argentina.

Chabbal, M. D., Giménez, L. I., Mazza, S. M., Ramirez, M. D. J., & Rodriguez, V. A. (2019). Calidad de frutos y maduración en naranjo dulce 'Valencia Late' [*Citrus sinensis* (L)

Osbeck] cv Limeira, sobre diferentes portainjertos. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45(1), 67-73.

Chastagner, G. A., & Ogawa, J. M. (1979). DCNA - benomyl multiple tolerance in strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology,* (69), 699-702.

Chávez-Magdaleno, M. E., Luque-Alcaraz, A. G., Gutiérrez-Martínez, P., Cortez-Rocha, M. O., Burgos Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J., & Plascencia-Jatomea, M. (2018). Effect of chitosan-pepper tree (*Schinus molle*) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Inginiería Quimica*, 17(1), 29-45.

Chiari, M. E., Joray, M. B., Ruiz, G., Palacios, S. M., & Carpinella, M. C. (2010). Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: Isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chemistry,* 120(1), 10-14

Chiari, M. E., Tosoni, L., Joray, M. B., Napal, G. N. D., Palacios, S. M., Ruiz, G. M.; Vera, M.D., & Carpinella, M. C. (2015). The inhibitory activity of plants from central Argentina on p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Isolation and mechanism of inhibition of a flavanone from *Flourensia oolepis*. *Planta medica*, 81(15), 1382-1391.

Christianson, D. W. (2017). Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, 117(17), 11570-11648. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287.

CIAFA (2024). Cámara de la Industria Argentina de Fertilizantes y Agroquímicos Manual fitosanitario. https://www.ciafa.org.ar/

Cielo-Filho, R., Franco, G. A. D. C., Periotto, F., Aguiar, O. T. D., Baitello, J. B., Câmara, C. D., Sousa, C. R., & Jesus, J. M. D. (2017). Tree and shrub flora in the surroundings of the Parque Nacional do Iguaçu, Paraná State, Brazil: contribution to ecological restoration. *Hoehnea*, 44(4), 473-489.

Clemes, S. M., Zeni, A. L. B. & Kretzschmar, M. (2008). Chemical evaluation of leaves from medicinal native plants used in Itajai Mountain Range National Park and Surroundings. *Revista Brasilera Farmaceútica,* 89, 10-12.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). 2º ed. Reference Method for Broth Dilution Fungicidal Susceptibility Testing for Filamentous Fungi. M38 A2. Wayne, USA.

Corio-Costet, M. F., Dufour, M. C., Cigna, J., Abadie, P., & Chen, W. J. (2011). Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, (129), 315-329.

D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., & Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, 17(3), 611-625. https://doi.org/10.1007/s11101-018-9568-y.

Das, A., Zaman, K., & Singh, A. V. (2009). Phytochemical and chemical composition evaluation of Volatile Oil of *Callistemon linearis* DC Leaf. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 3(1), 56-60. https://link.gale.com/apps/doc/A235407190/AONE?u=anon~504de016&sid=googleScholar&xid=d1d0c3a6.

de Almeida Alves, T. M., Ribeiro, F. L., Kloos, H., & Zani, C. L. (2001). Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(6), 831-833.

De Hoyos-Martinez, P. L., Merle, J., Labidi, J., & Charrier–El Bouhtoury, F. (2019). Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 206, 1138-1155. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.243.

de Mendonça Rocha, P. M., Rodilla, J. M., Díez, D., Elder, H., & Guala, M. S. (2012). Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules*. 17(10), 12023-12036.

De Oliveira Arruda, R. D. C., Victório, C. P., Boaretto, A. G., Carollo, C. A., da Silva Farias, C., Marchetti, C. R., & Silva, D. B. (2019). Essential oil composition, antifungal activity and leaf anatomy of *Lippia alba* (Verbenaceae) from Brazilian Chaco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 13(4), 79-88. https://doi.org/10.5897/JMPR2018.6700.

de Oliveira, R. S., Souza, F. V. D., Dos Santos, I. L., Souza, S. D. O., Aona, L. Y. S., & de Souza, E. H. (2021). Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Tillandsia* species (Bromeliaceae) with ornamental potential. *Biotechnology*, 11(4), 186.

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J, Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.

Del Vitto, L. A., Petenatti, E. M., & Petenatti, M. E. (1998). Recursos herbolarios de San Luis (Argentina). Segunda parte: plantas exóticas cultivadas, adventicias y/o naturalizadas. *Multequina*, 7, 29-48. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42800704.

Delaporte, R. H., Guzen, K. P., Laverde Jr, A., dos Santos, A. R., & Sarragiotto M. H. (2006). Phenylpropanoid glycerols from *Tillandsia streptocarpa* Baker (Bromeliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(7), 599-602.

Delaporte, R. H., Sarragiotto, M. H., Takemura, O. S., Sánchez, G. M., Filho, B. P. & Nakamura, C. V. (2004). Evaluation of the anti-edematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker-Bromeliaceae. *Journal of Ethnopharmacology,* 95, 229 - 233.

Delgado, R., Pérez, G., & Díaz, L. (1997). Comportamiento de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* en postcosecha de Citrus en Uruguay. *IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología; Montevideo*, 12-17.

Demirpolat, A. (2022). Chemical Composition of Essential Oils of Seven *Polygonum* Species from Turkey: A Chemotaxonomic Approach. *Molecules*, 27(24)9053, 1-12.

Derita, M. G., Gattuso, S. J., & Zacchino, S. A. (2008). Occurrence of polygodial in species of *Polygonum* genus belonging to *Persicaria* section. *Biochemical Systematics and Ecology.* 36(1), 55-58.

Derita, M. G., Leiva, M. L., & Zacchino, S. A. (2009). Influence of plant part, season of collection and content of the main active constituent, on the antifungal properties of *Polygonum acuminatum* Kunth. *Journal Ethnopharmacology,* 124(3), 377-383.

Derita, M., & Zacchino, S. (2011). Validation of the ethnopharmacological use of *Polygonum persicaria* for its antifungal properties. *Natural Product Communications* 6(7):1934578X1100600.

Derita, M., & Zacchino, S. (2011a) Chemotaxonomic importance of sesquiterpenes and flavonoids in Argentinian species of *Polygonum* genus. *Journal of Essential Oil Research*, 23:11-14.

Derita, M., Montenegro, I., Garibotto, F., Enriz, R., Fritis, M. C. & Zacchino, S. (2013). Structural requirements for the antifungal activities of natural drimane sesquiterpenes and analogues, supported by conformational and electronic studies. *Molecules*, 18, 2029-2051.

Di Liberto, M. G., Seimandi, G. M., Fernández, L. N., Ruiz, V. E., Svetaz, L. A., & Derita, M. G. (2021). Botanical control of citrus green mold and peach brown rot on fruits assays using a *Persicaria acuminata* phytochemically characterized extract. *Plants*, 10(3), 425.

Di Liberto, M. G., Stegmayer, M. I., Svetaz, L. A., & Derita, M. G. (2019). Evaluation of Argentinean medicinal plants and isolation of their bioactive compounds as an alternative for the control of postharvest fruits phytopathogenic fungi. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 686-688.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. http://www.infostat.com.ar.

Di Stasi, L. C., Hiruma, C. A., Guimarães, E. M., & Santos, C. D. (1994). Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia (Milano)*, 65(6), 529-540. http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=3379615.

Diep, T.; Pook, C., & Yoo, M. (2020). Phenolic and anthocyanin compounds and antioxidant activity of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Antioxidants*, 9 (169), 1-20.

Dimitri, M. J., & Parodi, L. R. (1977). Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería (No. 630). Buenos Aires, Acme.

Ding, P., & Lee, Y. L. (2019). Use of essential oils for prolonging postharvest life of fresh fruits and vegetables. *International Food Research Journal*, 26(2), 363-366.

Disdier, A., & Marette, S. (2010). La combinación de enfoques de gravedad y bienestar para evaluar medidas no arancelarias. *Diario Americano de Economía Agrícola*, 92 (3), 713-726. https://doi.org/10.1093/ajae/aaq026

Do Prado, A. C., Garces, H. G., Bagagli, E., Rall, V. L. M, Furlanetto, A, Fernandes Junior, A., & Furtado, F. B. (2019). *Schinus molle* essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 516-522.

do Rosário Martins, M., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M. T., & Cruz-Morais, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of ethnopharmacology*, 151(1), 485-492.

Dominguéz, J. A. (1928). Contribuciones a la materia médica argentina. Contribuciones a la materia médica argentina. Facultad de Ciencias. Médicas, Buenos Aires, 44, 1-433.

Dong, X., Fu, J., Yin, X., Li, X., Wang, B., Cao, S., Zhang, J., Zhang, H., Zhao, Y., & Ni, J. (2014). Pharmacological and other Bioactivities of the Genus *Polygonum*-A Review. Tropical *Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (10), 1749-1759.

dos Santos, A. C. A., Rossato, M., Serafini, L. A., Bueno, M., Crippa, L. B., Valdirene, C., Sartori, V. C., Dellacassa, E., & Moyna, P. (2010). Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. *Revista. Brasilera de Farmacognosia*, 20(2), 154-159. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200003.

Eckert, J. W., & Eaks, I. L. (1989). Postharvest Disorders and Diseases of Citrus Fruits. En: Reuther, W.; Calavan, E. C.; Carman, G. E. (eds) The Citrus Industry, Vol. V (pp. 179-260), University of California.

Eckert, J. W., & Ogawa, J. M. (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Reviews Phytopathology*, 23(1), 421-454. https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.002225.

El Khetabi, A., Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Nadia, L., Banani, H., Askarne, L., Tahiri, A., El Ghadraoui, L., Belmalha, S., & Barka, E. A. (2022). Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 120, 402-417. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.009.

Elumalai, A., Eswaraiah, M. C., & Rahman, H. (2012). *Pisonia grandis* R. Br-A medicinal plant: A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(1), 76-80.

Estrella-Parra, E., Flores-Cruz, M., Blancas-Flores, G., Koch, S. D., & Alarcón-Aguilar, F. J. (2019). The *Tillandsia* genus: history, uses, chemistry, and biological activity. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(3), 239-264.

FAOSTAT. (2018). Estadísticas de la FAO Cultivos. Disponible en: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL.

Farag, R. S., Shalaby, A. S., El-Baroty, G. A., Ibrahim, N. A., Ali, M. A., & Hassan, E. M. (2004). Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research*, 18(1), 30-35. https://doi.org/10.1002/ptr.1348.

Federcitrus (2022). La Actividad Citrícola. Disponible en: https://www.federcitrus.org/wp-content/uploads/2022/07/La-Actividad-Citricola2022.pdf.

FEDERCITRUS. Federación Argentina del Citrus. (2020) URL: https://www.federcitrus.org/

Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2013). Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. *Stewart Postharvest Review*, 9(3), 1-16.

Feng, L., Wu, F., Li, J., Jiang, Y., & Duan, X. (2011). Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. *Postharvest Biology and Technology*, 61, 160-164. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.03.002.

Ferreira, E. V. R., Prata, A. P. D. N., & Mello, A. A. D. (2013). Floristic List from a Caatinga Remnant in Poço Verde, Sergipe, Brazil. *Check List*, 9(6), 1354-1360.

Ferreira, W. C., Botrel, J. R. A., Dias, C., Cabacinha, R. C. S., & de Souza Armando, D. M. (2010). Restauração florestal em uma área de pastagem degradada no sul de Minas Gerais. enciclopédia biosfera. *Centro Científico Conhecer* 6, (9),1-12 https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/4781.

Flora Argentina (2020). URL: https://buscador.floraargentina.edu.ar/

Flores, R. A., Tejacal, I. A., Beltrán, M. N., Cervantes, R. A., Alonso, A. L., Ayala, A. B., & Moreno, F. B. (2010). Calidad de los frutos de naranja 'Valencia' en Morelos, México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11(2), 148-153.

Fogel, R., Céspedes, C., López, L., Valdez, S., Soria, N., & Schmeda, G. (2016). Propiedades medicinales de plantas, conocimiento tradicional y patentes. https://repositorio.conacyt.gov.py/handle/20.500.14066/2638.

Fonmboh, D. J., Abah, E. R., Fokunang, T. E., Herve, B., Teke, G. N., Rose, N. M., & Ntungwen, F. C. (2020). An overview of methods of extraction, isolation and characterization of natural medicinal plant products in improved traditional medicine research. *AJRIMPS*, 9(2), 31-57. https://doi.org/10.9734/ajrimps/2020/v9i230152.

Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., & Prieto, M. A. (2021). By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: A review of tannins'

biological activities and their potential for valorization. *Foods*, 10(1), 137. https://doi.org/10.3390/foods10010137.

Gad, H. A., Ayoub, I. M., & Wink, M. (2019). Phytochemical profiling and seasonal variation of essential oils of three *Callistemon* species cultivated in Egypt. *PloS one*, 14(7), e0219571. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219571.

Gally, T., & Rona, N. (2006). Sistemas de calidad para aplicar a ensayos de sanidad de semillas. Seed News, (2), 20-22.

Gally, T., Victoria Giachino, M., & Craig, E. (2016). Puntos críticos para la acreditación de ensayos en laboratorios de sanidad forestal. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 20(3), 33-41. https://www.redalyc.org/journal/837/83754344003/83754344003.pdf.

Ghannadi, A., Bagherinejad, M. R., Abedi, D., Jalali, M., Absalan, B., & Sadeghi, N. (2012). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(4), 171-176. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507305/.

Goleniowski, M. E., Bongiovanni, G. A., Palacio, L., Nuñez, C. O., & Cantero, J. J. (2006). Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 324-341.

Gomes, V., Agostini, G., Agostini, F., Atti dos Santos, A. C., & Rossato, M. (2013). Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 222-227.

González, M., Loroña, D., Condolo, L., & Almeida, M. (2021). Evaluation of *Cinnamon* Essential Oil as a Preservative Agent in the Postharvest Stage of Strawberries (*Fragaria* sp.). ESPOCH Congresses: *The Ecuadorian Journal of STEAM*, 374-396. https://doi.org/10.18502/espoch.v1i1.9572.

Guadagnin, D. L., & Barradas, P. V. F. (2022). Survivorship and yield of a harvested population of *Forsteronia glabrescens*. *PLoS ONE* 17(6), e0268632.17.

Guadagnin, D. L., & Gravato, I. C. (2013). Ethnobotany, availability, and use of lianas by the Kaingang people in suburban forests in southern Brazil. *Economic Botany*, 67, 350-362.

Gupta, V., Azmi, L., Gupta, S. S., Verma, P., Paswan, S., Shukla, I., Rastogi, C., Khan, M., Kumar, V., & Rao, V. (2015). *Pisonia aculeate* a herbal drug: godsend for liver dysfunction. World. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutycal Sciences,* 4(7), 285-295.

Gutiérrez-Grijalva, E. P., López-Martínez, L. X., Contreras-Angulo, L. A., Elizalde-Romero, C. A., & Heredia, J. B. (2020). Plant alkaloids: structures and bioactive properties. En: *Plant-derived bioactives* (pp. 85-117). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2361-8_5.

Han, J. W., Shim, S. H., Jang, K. S., Choi, Y. H., Dang, Q. L., Kim, H., & Choi, G. J. (2018). *In vivo* assessment of plant extracts for control of plant diseases: A sesquiterpene ketolactone isolated from *Curcuma zedoaria* suppresses wheat leaf rust. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53(2), 135-140. https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1397448.

Haque, A., Siddiqi, M. M. A., Rahman, A. F. M. M., Chowdhury, A. M. S., & Hasan, C. M. (2013). Antimicrobial and cytotoxic activities of the crude extracts of *Callistemon linearis*. *International Journal of Biosciences*, 3(3), 129-33. https://www.researchgate.net/publication/324029471.

Hartill, W., Tompkins, G., & Kleinshaw, P. (1983). Development in New Zealand of resistance to dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea* to acylalanines in *Phytophthora infestans* and to guazatine in *Penicillium italicum*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 26, 261-270.

Harvey, J. M. (1978). Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. *Annual Reviews Phytopathology*, 16(1), 321-341. https://https://doi.org/10.1146/annurev.py.16.090178.001541.

He, Y., Wang, Q., Ye, Y., Liu, Z., & Sun, H. (2020). The ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology of genus *Albizia*: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 257, 112677.

Hejazi, M., Grant, J. H., & Peterson, E. (2022). Trade impact of maximum residue limits in fresh fruits and vegetables. *Food Policy*, 106, 102203. https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2021.102203.

Hernández, N. E., Tereschuk, M. L., & Abdala, L. R. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafı del Valle (Tucuman, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 317-322. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00295-6.

Hernández-Montiel, L. G., Holguín-Peña, J., López-Aburto, M. G. & Troyo-Diéguez, E. (2011). Postharvest control of *Geotrichum citri-aurantii* on Mexican lemon (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) with marine and epiphytic yeasts. *Universidad y Ciencia - Trópico Húmedo* 27(2), 191-198.

Hieronymus, J. (1930). Plantas diafóricas. Flora Argentina. Ed. Atlántica, Bueno Aires. pp. 422.

Hillocks, R. J. (2012). Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection*, 31(1), 85-93. https://doi.org/10.1016/j. cropro.2011.08.008.

Hincapie, M., Wang, N. Y., Peres, N. A., & Dewdney, M. M. (2014). Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin. *Plant Disease*, 98, 780-789.

Ho, C. L., Liao, P. C., Wang, E. I. C., & Su, Y. C. (2011). Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigemma* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 6(9), 1934578X1100600935.

Hurrell, J. A., Ulibarri, E. A., Arenas, P. M., & Pochettino, M. L. (2011). Plantas de herboristería: plantas medicinales que se comercializan en herboristerías de la Ciudad de Buenos Aires. Ed. L.O.L.A. Buenos Aires, pp. 242.

Hurrell, J. A., Ulibarri, E. A., Delucchi, G., & Pochettino, M. L. (2008). Plantas aromáticas condimenticias. Biota Rioplatense XIII. Editorial LOLA, Buenos Aires, Argentina.

Hussain, M. M. (2018). A short review on phytoconstituents from genus *Albizzia* and *Erythrina*. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 21(2), 160-172.

IBODA (Instituto de Botánica Darwinion) (2020) Flora del Conosur: http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina.

INDEC. (2018). Censo Nacional Agropecuario 2018. Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). https://www.indec.gob.ar/indec/web/Nivel4-Tema-3-8-87.

INDEC. (2022). Disponible en: https://www.indec.gob.ar/indec/web/Institucional-Indec-BasesDeDatos.

IRUPE (2021) Banco de Imágenes de la Flora Nativa: Disponible en: https://www.fca.unl.edu.ar/prodocova/IRUPE/index.html.

Ismail, M., & Zhang, J. (2004). Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Management*, 15, 29-35.

Iwashina, T. (2013). Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales (Review). *Bulletin of the National Science Museum,* 39(1), 25-51.

Jankowski, L., Bazzano, D., Sáenz, A., Tourn, M., Roitman, G. (2000). Plantas trepadoras. Nativas y Exóticas. Buenos Aires, Editorial LOLA.

Jing, H., Liu, J., Liu, H., & Xin, H. (2014). Histochemical investigation and kinds of alkaloids in leaves of different developmental stages in *Thymus quinquecostatus*. *The Scientific World Journal*, 839548. https://doi.org/10.1155/2014/839548.

Kanetis, L., Forster, H., Jones, C., Borkovich, K., & Adaskaveg, J. (2008). Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fudioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology,* 98, 205-214.

Keller, W. J., Bourn, W. M., & Bonfiglio, J. F. (1981). A folk medicine for diabetes mellitus. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 19(2-3), 49-51.

Kembro, J. M., Marin, R. H., Zygadlo, J. A., & Gleiser, R. M. (2009). Effects of the essential oils of *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) on the temporal pattern of locomotion of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasitology Research*, 104(5), 1119-1127. https://doi.org/10.1007/s00436-008-1296-6.

Khalid, M., Bilal, M., & Huang, D. F. (2019). Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens—A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(1), 211-230. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62555-4.

Khan, A. A., Iqbal, Z., Atiq, M., Karlsson, M., Dubey, M., & Jensen, D. (2019). Submitted (03-APR-2019) Plant Pathology, College of Agriculture, University of Sargodha, 1, Sargodha, Punjab 40100, Pakistan.

Khumalo, K. N., Tinyane, P., Soundy, P., Romanazzi, G., Glowacz, M., & Sivakumar, D. (2017). Effect of thyme oil vapour exposure on the brown rot infection, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, phenolic content and antioxidant activity in red and yellow skin peach cultivars. *Scientia horticulturae*, 214, 195-199.

Kim, Y., Lee, C., Kim, H., & Lee, H. (2004). Anthraquinones Isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) Seed Show an Antifungal Property against Phytopathogenic Fungi. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6096-6100.

Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I., & Pavela, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*, 47(2), 161-165. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.044.

Knapp, S., Barboza, G. E., Bohs, L., & Särkinen, T. (2019). A revision of the Morelloid Clade of *Solanum* L. (Solanaceae) in North and Central America and the Caribbean. *PhytoKeys*, 123, 1-144. https://doi.org/10.3897%2Fphytokeys.123.31738.

Kotzé, J. M. (2000). Black spot. En: Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & Graham, J. H. (eds). Compendium of citrus diseases. *American Phytopathological Society*. (pp. 23-25). St. Paul, Minnesota.

Kumar, D., Sukapaka, M., Babu, G.K., & Padwad, Y. (2015). Chemical composition and in vitro cytotoxicity of essential oils from leaves and flowers of *Callistemon citrinus* from western Himalayas. *PloS One*, 10(8): e0133823.

Kurokawa, H., Koshimizu, R., & Okumura, Y. (2004). Skincare preparation for external use/skin external preparation containing extract of plant belonging to genus *Tillandsia* as cell activator, antioxidant and melanogenesis inhibitor. *Patent* JP 2004026744 A.

Lado, J., & Pérez, E. (2009). Hacia un manejo integrado y sustentable de *Penicillium* en poscosecha de cítricos INIA. *Actividades de Difusión*, 597, 38-41.

Lado, J., Luque, E., Blanco, O., & Pérez, E. (2011). Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes al imazalil. *Agrociencia Uruguay*, 15, 55-63.

Lahitte, H. B., Hurrell, J. A., Belgrano, M. J., Jankowski, L. S., Haloua, M. P., & Mehltreter, K. (1998). Plantas medicinales rioplatenses. Editorial LOLA. Buenos Aires, Argentina.

Lahitte, H. B., Hurrell, J., Belgrano, M.J., Jankowski, L.S., Haloua, P., & Mehltreter, K. (2004). Plantas medicinales rioplatenses. Ed. L.O.L.A. Biota rioplatense, 2, 1-60.

Lahitte, H. B., Hurrell, J., Mehltreter, K., Belgrano, M.J., Jankowski, L.S., Haloua, P., & Canda, G. (2004). Plantas de la Costa. Biota Riplatense I. Ed. L.O.L.A. Buenos Aires. pp 54.

Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T. W., Hoffland, E., Rosling, A., Wernars, K., & Smit, E. (2003). Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 327-333. https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.327-333.2003.

Larrosa, C. (2004). Morfoanatomia foliar e caulinar de espécies medicinais de Apocynaceae: *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson.

Lassak, E. V., & Smyth, M. M. (1994). Steam volatile leaf oil of *Callistemon linearis* (Schrader et Wendl.) Sweet. *Journal of Essential Oil Research*, 6(4), 403-406. https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9698408.

Li, G., & Cui, L. (2013). A Chinese medicinal preparation for treating post-dural puncture headache. *Patent* CN 103006995 A.

Lima-Verde, L. W., Loiola, M. I., & Freitas, B. M. (2014). Angiosperm flora used by meliponine guilds (Apidae, Meliponina) occurring at rainforest edges in the state of Ceará, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(3), 1395-1410.

Lira, M. H. P. D., Andrade Júnior, F. P. D., Moraes, G. F. Q., Macena, G. D. S., Pereira, F. D. O., & Lima, I. O. (2020). Antimicrobial activity of geraniol: An integrative review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 187-197. https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1745697.

Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B., & Zheng, X. (2010). Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 30-35. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02851.x.

Lowe, H. I. C., Watson, C. T., Badal, S., Toyang, N. J., & Bryant, J. (2014). Unearthing the medicinal properties of *Tillandsia recurvata* (Ball moss): A mini review. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(9), 1138-1149.

Lucini, E. I., Grosso, N. R., Lamarque, A. L., Maestri, D. M., Zydalgo, J.A., & Guzmán, C. A. 1994. Seed lipid components of *Solanum argentinum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (129), 2743-2745.

Luz, D. A., Pinheiro, A. M., Silva, M. L., Monteiro, M. C., Prediger, R. D., Maia, C. S. F., & Fontes-Junior, E. A. (2016). Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. *Journal Ethnopharmacoly*, 185, 182-201.

Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., Xiao, C., Lu, C., & Liu, Y. (2015). Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chemistry Central Journal*, 9, 68. https://doi.org/10.1186/s13065-015-0145-9

Ma, G., Zhang, L., Sugiura, M., & Kato, M. (2020). Citrus and health. In *The genus citrus* (pp. 495-511). *Woodhead Publishing*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00024-3.

Mac Loughlin, T. M., Peluso, M. L., Etchegoyen, M. A., Alonso, L. L., de Castro, M. C., Percudani, M. C., & Marino, D. J. (2018). Pesticide residues in fruits and vegetables of the argentine domestic market: Occurrence and quality. *Food Control*, 93, 129-138. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.041.

Madureira, J., Barros, L., Cabo Verde, S., Margaça, F. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2020). Ionizing radiation technologies to increase the extraction of bioactive compounds from agro-industrial residues: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(40), 11054-11067. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04984.

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Pérez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002.

Mahdavi Omran, S., Moodi, M.A., Norozian Amiri, S. M. B., Mosavi, S. J., & Ghazi Mir Saeed S. A. M. (2011). The effects of limonene and orange peel extracts on some spoilage fungi. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 1, 82-86.

Maheswari, N. U., & Komalavalli, R. (2013). Diversity of soil fungi from Thiruvarur district. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2 (10), 135-141.

Marei, G. I. K., Rasoul, M. A. A., & Abdelgaleil, S. A. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 56-61.

Martínez- Crovatto, R. (1981). Las plantas utilizadas en medicina popular en el noreste de Corrientes. Fundación Lillo. *Miscelánea*, 69:1-39.

Martínez, G. J. (2010). Los remedios naturales en la prevención y cuidado de la salud oral de los tobas del Chaco Central (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(2), 109-122.

Martínez, W. J., & Ferruci, M. S. (2005). Estudio florístico del Parque Nacional Mburucuyá con énfasis en: Verbenaceae. *XVI Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas y VIII Reunión de Extensión.* Corrientes. Argentina: FCA, UNNE.

Marzocca, A. (1997). Vademécum de Malezas Medicinales de la Argentina. Indígenas y Exóticas. Ed. Orientación Gráfica. Buenos Aires, Argentina. pp. 363.

Matny, O. N. (2015). Efficacy Evaluation of Iraqi propolis against gray mold of stored orange caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathology Journal*, 14 (3), 153-157.

Medon, P. J., Broughton, S. A., & Keller, W. K. (1985). Antidiabetic activity of *Tillandsia usneoides* (Spanish moss) extracts in native diabetic and alloxan diabetic rats. *Federation Proceedings*, 44, 4, 882.

Mercado Central de Buenos Aires (MCBA). (2018). Boletín de Frutas y Hortalizas del Convenio INTA- CMCBA Nº 80 - Cítricos. Disponible en: http://www.mercadocentral.gob.ar/publicaciones/bolet%C3%ADn-de-frutas-y-hortalizas-del-convenio-inta-cmcba-n%C2%BA-80-c%C3%ADtricos

Micheloud, N., & Pilatti, R. (2014). Cítricos. En: Garigllio, N.F.; Bouzo, C., Travadelo, M.R. (eds.). (pp. 25-49). Cultivos frutales y ornamentales para zonas templado-cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina.

Mohammed, A. E., Abdul-Hameed, Z. H., Alotaibi, M. O., Bawakid, N. O., Sobahi, T. R., Abdel-Lateff, A. & Alarif, W. M. (2021). Chemical diversity and bioactivities of monoterpene indole alkaloids (MIAs) from six Apocynaceae genera. *Molecules*, 26(488), 1-67.

Montagnini, F., Eibl, B. I., & Barth, S. R. (2011). Organic yerba mate: an environmentally, socially and financially suitable agroforestry system. *Bois et Forêts des Tropiques*, 308(2), 59-74.

Monteiro, J. M., Ramos, M. A., Amorim, E. L., & Albuquerque, U. P. (2011). Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment,* 178, 179- 202.

Montenegro, I., Madrid, A., Cuellar, M., Seeger, M., Alfaro, J., Besoain, X., & Valenzuela, M. (2018). Biopesticide activity from drimanic compounds to control tomato pathogens. *Molecules*, 23(8), 2053. https://doi.org/10.3390/molecules23082053.

Morcelle, S. R., Barberis, S., Priolo, N., Caffini, N. O., & Clapés, P. (2006). Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(3-4), 117-124.

Morcelle, S. R., Caffini, N. O., & Priolo, N. (2004). Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. *Fitoterapia*, 75(5), 480-493.

Moura, V. S., Moretto, R. K., Machado, B. I., & Kupper, K. C. (2019). Alternativas de controle de doenças de pós-colheita em citros. *Citrus Research & Technology*, 40, 1-11.

Muelas-Serrano, S., Nogal, J. J., Martınez-Dıaz, R. A., Escario, J. A., Martınez-Fernández, A. R. & Gómez-Barrio, A. (2000). In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71,101-107.

Muirhead, T. F. (1974). Resistance to benzimidazole fungicides in blue mold of citrus in Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 14, 698-701.

MYCOBANK. (2022). Disponilbe URL: https://www.mycobank.org/

Nandhavathy, G., Dharini, V., Anand Babu, P., Nambiar, R. B., Periyar Selvam, S., Sadiku, E. R., & Mahesh Kumar, M. (2020). Determination of antifungal activities of essential oils incorporated-pomegranate peel fibers reinforced-polyvinyl alcohol biocomposite film against mango postharvest pathogens. *Materials Today Proceedings*, 38, 923-927. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.384.

Narasimhulu, G., Reddy, K. K., & Mohamed J. (2014). The genus *Polygonum* (Polygonaceae): An ethnopharmacological and phytochemical perspectives – review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 21-45.

Neafsey, D., Barker, B., Sharpton, T., Stajich, J., Park, D., Whiston, E., & Hung, C. (2010). Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. *Genome Research,* 20(7), 938-946.

Ngo, M. T., Han, J. W., Yoon, S., Bae, S., Kim, S. Y., Kim, H., & Choi, G. J. (2019). Discovery of new triterpenoid saponins isolated from *Maesa japonica* with antifungal activity against rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(27), 7706-7715. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02236.

Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5710. https://doi.org/10.3390/ijms22115710.

Nores, M. J., López, H. A., Rudall, P. J., Anton, A. M., & Galetto, L. (2013). Four o'clock pollination biology: nectaries, nectar and flower visitors in Nyctaginaceae from southern South America. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(3), 551-567.

Novara, L., Barboza, G. E., Bernardello, G., Cocucci, A. A., & Matesevach, M. (2010). Solanaceae. *Aportes Botánicos de Salta-Serie Flora*, 10(3), 1-254.

Ogawa, J., Zehr, E., Bird, G., Ritchie, D., Uriu, K., & Uyemoto, J.K. (1995). Compendium of Stone Fruit Diseases: American Phytopathological Society (pp. 1-168). Saint Paul, Minnesota, USA.

Ohara, M., & Hori, M. (2001). Cosmetic composition containing plant steam distillation water/cosmetic composition containing plant steam distillate. *Patent* JP 2001226219 A.

Oliveira, D. R., Leitao, G. G., Santos, S. S., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, C. S., & Leitao, S. G. (2006). Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 103-108. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.018.

Ozarowski, A., & Jaroniewski, W. (1987). Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Warszawa: Wydawnictwo Instytutu Wydawniczego Związków Zawodowych. Warszawa. IWZZ. pp. 319-323.

Paco, G. M. A., Gutierrez, D. Y., Ruiz, G. P., & Gimenez, A. T. (2004). Estudio biodirigido de *Solanum argentinum* sobre *Plasmodium falciparum*. *BIOFARBO*, 12(12), 3-8.

Palacio, M. (2007). El uso de los recursos vegetales con propiedades tintóreas en la industria artesanal familiar en dos departamentos de la provincia de Santiago del Estero, República Argentina *Tesis de Magister*. *Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina*.

Palacios, J. (2005). Citricultura. Imp. Alfa Beta Buenos Aires, Argentina. pp.518.

Palchetti, M. V., Cantero, J. J & Barboza, G. E. (2020). South American Solanaceae. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 92(2), 1-36.

Palou, L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (green mold, blue mold). En: Postharvest Decay, *Control Strategies*; Bautista Baños, S., (eds). (pp. 45–102). Academic Press: Valencia, Spain. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8.

Palou, L. (2018). Postharvest treatments with GRAS salts to control fresh fruit decay. *Horticulturae*, 4(4), 46. https://doi.org/10.3390/horticulturae4040046.

Palou, L., Ali, A., Fallik, E., & Romanazzi, G. (2016). GRAS, plant and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 41-52. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.017.

Passone, M. A., & Etcheverry, M. (2014). Antifungal impact of volatile fractions of *Peumus boldus* and *Lippia turbinata* on *Aspergillus* section Flavi and residual levels of these oils in irradiated peanut. *International Journal of Food Microbiology*, 168, 17-23. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.009.

Paye, I. A., Pensiero, J. F., Grenón, D. A., & Exner, E. (2021). Irupé: Sitio web de imágenes de la flora nativa de Argentina asociado al herbario SF. *Revista FAVE Ciencias Agrarias*, 20, 19-31.

Pensiero, J., & de la Peña, M. (2000). Flora y Avifauna de la provincia de Santa Fe. El Litoral. Santa Fe. pp. 384.

Pepin, H. S., & Macpherson, E. A. (1982). Strains of *Botrytis cinerea* resistant to benomyl and captan in the field. *Plant Disease*, 66, 404-405.

Pereira, A. P., Figueiredo Angolini, C. F., Paulino, B. N., Chatagnier Lauretti, L. B., Orlando, E. A., Siqueira Silva, J. G., Neri-Numa, I. A., Pimentel Souza, J. D., Lima Pallone, J. A., Nogueira Eberlin, M., & Pastore, G. M. (2019). A comprehensive characterization of *Solanum lycocarpum* St. Hill and *Solanum oocarpum* Sendtn: Chemical composition and antioxidant properties. *Food Research International*, 124, 61-69.

Pereira, F. D. O., Mendes, J. M., Lima, I. O., Mota, K. S. D. L., Oliveira, W. A. D., & Lima, E. D. O. (2015). Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, 53(2), 228-234. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.913299.

Peres, N. A., Harakava, R., Carroll, G. C., Adaskaveg, J. E., & Timmer, L. W. (2007). Comparison of Molecular Procedures for Detection and Identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae. Plant Disease*, 91(5), 525-531. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0525.

Petenatti, E. M., Petenatti, M. E., & Del Vitto, L. A. (1998). Medicamentos herbarios en el centro-oeste argentino."Ambay": Control de calidad de la droga oficial y sus adulterantes. *Acta Farmacéutica. Bonaerense*, 17(3), 197-212.

Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M. M., Rodríguez, H., Abreu, Y., Duarte, Y., Martínez, B., Peteira, B., Correa, T. M., & Martínez, D. (2011). Composición química y actividad plaguicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake. *Revista de Protección Vegetal,* 26 (3), 177-186.

Priyadarshi, R., Routroy, S., & Garg, G. K. (2020). Postharvest supply chain losses: A state-of-the-art literature review and bibliometric analysis. *Journal of Advances in Management Research*, 18(3), 443-467. https://doi.org/10.1108/JAMR-03-2020-0040.

Quiroga, A., & Esnarriaga, D. N. (2014). Diversidad de forrajeras nativas consumidas por el ganado caprino en el área pedemontana del chaco árido, Catamarca. *Biología en Agronomía*, 4, (1) 121-147.

Quiroga, E. N., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1), 89-96. https://doi.org/10.1016/S0378-8741 (00)00350-0.

Ramos, M. A., & Machado, L. P. (2020). Potencial antifúngicode Tipi (*Petiveria alliacea* L.) en fungos de *Aspergillus flavus*. *Revista Científica FAESA,* 16(1), 32-41.

Rana, V. S., Juyal, J. P., & Blazquez, M. A. (2002). Chemical constituents of essential oil of *Pelargonium graveolens* leaves. *International Journal of Aromatherapy*, 12(4), 216-218. https://doi.org/10.1016/S0962-4562(03)00003-1.

Rao, G. P., Singh, M., Singh, P., Singh, S. P., Catalan, C., Kapoor, I. P. S., & Singh, G. (2000). Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf essential oil of *Lippia alba* (Mill). *Indian Journal of Chemical Technology*, 7, 332-335. http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/22985.

Rasband, W.S. (2020). Disponible en: https://imagej.nih.gov/ij.

Rasul, M. G. (2018). Conventional extraction methods use in medicinal plants, their advantages and disadvantages. *International Journal Basic Science Applied Computacional*, 2, 10-14. https://www.ijbsac.org/wp-content/uploads/papers/v2i6/F0082122618.pdf.

Raveau, R., Fontaine, J., & Lounes-Hadj Sahraoui, A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. *Foods*, 9(3), 365 https://doi.org/10.3390/foods9030365.

Ríos, M., Bartesaghi, L., Piñeiro, V., Garay, A., Mai, P., Delfino, L., Masciadri, S., Alonso-Paz, E., Bassagoda, M. G., & Soutullo, A. (2010). Caracterización y distribución espacial del bosque y matorral psamófilo. Programa EcoPlata y Proyecto SNAP. *Serie de Informes,* (23), 1-76.

Rippon, L. E., & Morris, S. C. (1981). Guazatine control of sour rot in lemons, oranges and tangors under various storage conditions. *Scientia Horticulturae,* 14, 245-251.

Rodriguez, A., Derita, M., Borkosky, S., Socolsky, C., Bardón, A., & Hernández, M. (2018). Bioactive farina of *Notholaena sulphurea* (Pteridaceae): Morphology and histochemistry of glandular trichomes. *Flora*, 240, 144-151.

Rodríguez, I. L., Guadarrama Olivera, M. A., Ortiz Guadarrama, M., Labastida Astudillo, M., & Jiménez Pérez, N. D. C. (2021). *Funastrum clausum* (Jacq.) Schltr.: El Bejuco De Leche. *Kuxulkab*, 27, 59-61.

Roger, E., Palacio, M., Coria, O., & Díaz, R. (2016). Notas sobre la flora urbana cultivada en la ciudad de Santiago del Estero, Argentina. *Multequina*, (25), 29-41.

Rosado-Aguilar, J. A., Aguilar-Caballero, A., Rodriguez-Vivas, R. I., Borges-Argaez, R., Garcia-Vazquez, Z., & Mendez-Gonzalez, M. (2010). Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), 299-303.

Rosso, C. N., & Scarpa, G. F. (2019). Etnobotánica médica moqoit y su comparación con grupos criollos del Chaco argentino. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 54(4), 1-10.

Ruffinengo, S., Eguaras, M., Floris, I., Faverin, C., Bailac, P., & Ponzi, M. (2005). LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 651-655. https://doi.org/10.1603/00220493-98.3.651.

Saad, D. S., Kinsey, G. C., Kim, S., & Gaylarde, C. C. (2004). Extraction of genomic DNA from filamentous fungi in biofilms on water-based paint coatings. *International biodeterioration y biodegradation*, 54(2-3), 99-103. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.05.003.

SAGPyA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. (1983). Resolución-1451983. http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-145-1983-sagpya-secretariade-agricultura-ganaderia-pesca-y-alimentos.

Saifuzzaman, M., Shamim, M. S. J., Mahaldar, K., Ali, E. S., & Islam, M. A. (2013). Antinociceptive activity of the ethanolic extract of *Persicaria acuminata* Sach. *Journal of Pharmacy Research*, 6, 753-755.

Sajeena, A., John, J., Sudha, B., Meera, A., V. & Karthika, S. R. (2019). Significance of botanicals for the management of plant diseases. En: Ansari, R. A., & Mahmood, I. (eds.), *Plant Health under Biotic Stress* (pp. 231-243). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-98113-6043-5_12

Sanchez, S., & Demain, A. (2011). Secondary Metabolites. *Comprehensive Biotechnology*, 1,131-143. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00012-4.

Sartori, F. G., Leandro, L. F., Montanari, L. B., de Souza, M. G. M., Pires, R. H., Sato, D. N., Leite, C. Q. F.; Prince, K. A., & Martins, C. H. G. (2013). Isolation and identification of environmental mycobacteria in the waters of a hemodialysis center. *Current Microbiology*, 67, 107-111.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1). https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483.

Sayago, J. E., Ordoñez, R. M., Kovacevich, L. N., Torres, S., & Isla, M. I. (2012). Antifungal activity of extracts of extremophile plants from the Argentine Puna to control citrus postharvest pathogens and green mold. *Postharvest Biology and Technology*. 67, 19-24.

Scarpa, G. (2012). Las plantas en la vida de los criollos del oeste formoseño. Medicina, Ganadería, Alimentación. 1ed Buenos Aires. Asociación Civil Rumbo Sur. pp.256.

Scarpa, G. F. (2004). Medicinal plants used by criollos of Northwestern Argentine Chaco. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 115-135.

Scarpa, G. F. (2007). Etnobotánica de los Criollos del oeste de Formosa: Conocimiento tradicional, valoración y manejo de las plantas forrajeras. *Kurtziana*, 33(1), 153-174.

Schaller, A., & Ryan, C. A. (1996). Systemin-a polypeptide signal in plants. *Bioessays*, 18, 27-33.

Schmeda-Hirschmann, G., & Rojas de Arias, A. A. (1992). Screening method for natural products on triatomine bugs. *Phytotherapy Research,* 62, 68-73.

Schnabel, G., & Brannen, P. M. (2022). Biology, epidemiology, and management of diseases of peach driving the spray program in the southeastern United States. *Scientia Horticulturae*, 295, 110818. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110818.

Schoch, C.L. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6241-6246.

Seigler, D. S. (2003). Phytochemistry of *Acacia-sensu lato*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(8), 845-873. https://doi.org/10.1016/S0305-1978 (03)00082-6.

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2006). Programa de certificación de fruta fresca cítrica para exportación a la UE y mercados con similares restricciones cuarentenarias. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/senasa/programa-de-certificacion-de-fruta-fresca-citrica-para-exportacion-la-ue-y-mercados-con-similares.

Shankar, S., Prasad, S., Owaiz, M., Yadav, S., Manhas, S., & Yaqoob, M. (2021). Essential oils, components and their applications: A review. *Plant Archives*, 21(1), 2027-2033.

Sharifi-Rad, J., Salehi, B., Varoni, E. M., Sharopov, F., Yousaf, Z., Ayatollahi, A. S., & Irii, M. (2017). Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: *From farm to pharmacy. Phytotherapy Research*, 31 (10), 1475-1494.

Shen, B., Yang, I., Yasamin, S., Liang, N. A., Su, W., Chen, S., Wang, X., & Wang, W. (2018).Analysis of the phytochemistry and bioactivity of the genus *Polygonum* of Polygonaceae. *Digital Chinese Medicine*, 1, 19-36.

Shetu, H. J. (2015). Phytochemical and Biological Evaluation of *Albizia richadiana* (Benth. Fabaceae Family). BRAC University, Dhaka, Bangladesh.

Shoji, T., Maeda, H., & Hanano, A. (2003). External preparation containing extract of *Tillandsia* plant and having effects of keeping moisture and improving rough skin. *Patent* JP 2003342118 A.

Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., & Dubey, N. K. (2009). Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 165-170. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.002.

Shuping, D. S. S., & Eloff, J. N. (2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(4), 120-127. https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14.

Silva do Nascimento, S., Okabe, D., Pinto, A., de Oliveira, F., da Paixão, T., Souza Siqueira, M. L., Baetas, A. C. & de Andrade, M. (2018). Antimicrobial and anticancer potential of *Petiveria alliacea* L. (Herb to "Tame the Master"): A review. *Pharmacognosy Reviews*, 12, 85-93.

Silva Júnior, G. J. D. (2019). Manual de pinta preta: medidas essenciais de controle. *Fundecitrus,* 1-28. https://www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta-preta#ind.

Silva Junior, G. J., da Silva Scapin, M., Pinto Silva, F., Pinto Silva, A. R., Behlau, F., & Ramos, H. (2016). Spray volume and fungicide rates for citrus black spot control based on tree canopy volume. *Crop Protection*, 85, 38-45. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.03.014.

Silva, A. D. S. (2019). Regeneração natural em área de reflorestamento misto no município de Laranjeiras, Sergipe. *Repósitorio Institucional da Universidade Federal de Sergipe*, 1-47. https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/12894.

Silva, C. J., Barbosa, L. C., Demuner, A. J., Montanari, R. M., Pinheiro, A. L., Dias, I., & Andrade, N. J. (2010). Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. *Quimica Nova*, 33(1), 104-108.

Silva, J., do Nascimento, S., Okabe, D., Pinto, A., de Oliveira, F., da Paixão, T., Souza Siqueira, M. L.; Baetas, A.C., & de Andrade, M. (2018). Antimicrobial and anticancer potential of *Petiveria alliacea* L. (Herb to" Tame the Master"): A review. *Pharmacognosy Reviews*, 12(23).

Silva, N. C. C., & Fernandes Júnior, A. J. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 16, 402-413. https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006.

Singh, H., Batish, D., & Kohlil, R. (2003). Allelopathic Interactions and Allelochemicals: New Possibilities for Sustainable Weed Management. *Critical Review in Plant Sciences*, 22 (3-4), 239-311.

Smilanick, J. L., & Dennis-Arrue, R. (1992). Control of Green Mold of Lemons with *Pseudomonas* species. *Plant disease*, 76, 481-485.

Smilanick, J. L., Brown, G. E., & Eckert, J. W. (2006). The biology and control of postharvest diseases. En: Wardowski, W.F., Miller, W.M., Hall, D.J., Grierson, W. (eds.), (pp. 339-396). Fresh Citrus Fruits. Second ed. Florida Science Source, Inc., Longboat Key, FL.

Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M., & Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 226-238. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.020.

Smolarz, H. D., Mendyk, E., Bogucka-Kocka, A., & Kockic, J. (2006). Pinostrobin–an anti-leukemic flavonoid from *Polygonum lapathifolium* L. ssp. *nodosum* (Pers.) Dans. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(1-2), 64-68.

Solis, V. A.; Cabrera, V. A.; Dottori, N., & Cosa, M. T. (2011). Desarrollo de fruto y semilla en *Solanum argentinum* (Solanaceae). *Arnaldoa*, 18(1), 47-55.

Spósito, M. B., Amorim, L., Ribeiro Jr., P. J., Bassanezi, R. B., & Krainski, E. T. (2007). Spatial Pattern of Trees Affected by Black Spot in Citrus Groves in Brazil. *Plant Disease,* 91(1), 36-40. https://doi.org/10.1094/PD-91-0036.

Spreen, T. H., Gao, Z., Fernandes Jr, W., & Zansler, M. L. (2020). Global economics and marketing of citrus products. In *The genus citrus* (pp. 471-493). *Woodhead Publishing*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00023-1.

Srivastava, A., Tandon, P., Ayala, A. P., & Jain, S. (2011). Solid-state characterization of an antioxidant alkaloid boldine using vibrational spectroscopy and quantum chemical calculations. *Vibrational Spectroscopy*, 56(1), 82-88.

Stajich, J. E., M. L., Berbee, M., Blackwell, D. S., Hibbett, T. Y., Spatafora, J. W., & Taylor, J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology,* 19, 840-845.

Stammler, G., Schutte, G. C., Speakman, J., Miessner, S., & Crous, P. W. (2013). *Phyllosticta* species on citrus: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. *Crop Protection*, 48, 6-12.

Stegmayer, M. I., Alvarez, N. H., Di Liberto, M. G., Daurelio, L. D., & Derita, M. G. (2019). Knowledge of the Ethnomedicinal Plants Used by Tobas and Mocovíes Tribes in the Central-North of Argentina. In Ethnobotany (pp. 187-213). CRC Press.

Stegmayer, M. I., Álvarez, N. H., Favaro, M. A., Fernandez, L. N., Carrizo, M. E., Reutemann, A. G., & Derita, M. G. (2020). Argentinian wild plants as controllers of fruits phytopathogenic fungi: Trends and perspectives. In Wild Plants: The Treasure of Natural Healers; Rai, M., Bhattarai, S., Feitosa, C. (eds). (pp. 121-137). CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Stegmayer, M. I., Fernández, L., Álvarez, N., Olivella, L., Gutiérrez, H., Favaro, M. A., & Derita, M. (2021). Aceites esenciales provenientes de plantas nativas para el control de hongos fitopatógenos que afectan a frutales. *Revista FAVE Ciencias Agrarias*, 20, 317-329.

Stegmayer, M. I., Álvarez, N. H., Sager, N. G., Buyatti, M. A., & Derita, M. G. (2022b). Evaluation of *Pelargonium graveolens* essential oil to prevent gray mold in rose flowers. *Journal of Plant Protection Research*, 62(2), 145-152. https://doi.org/10.24425/jppr.2022.141353.

Stegmayer, M. I., Fernández, L. N., Álvarez, N. H., Seimandi, G. M., Reutemann, A. G., & Derita, M. G. (2022a). In vitro antifungal screening of Argentine native or naturalized plants against the phytopathogen *Monilinia fructicola*. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 25, 1158-1166.

Suleiman, M., Rugumamu, C. P., & Ibrahim, N. D. (2018). Repellency potential of some botanicals against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) in stored sorghum. *Polish Journal of Entomology*, 87(1), 85-99.

Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S. A., & Gupta, M. (2010).Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal Ethnopharmacology*, 127, 137-158 https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.034

Tadeo, N. (2008): Calidad y seguridad alimentaria en productos frutihortícolas frescos de exportación: Implicaciones en los procesos laborales de la agroindustria de cítricos dulces de Entre Ríos. *Mundo Agrario*, 23, 1-30.

Talón, M., Wu, G. A., Gmitter Jr, F. G., & Rokhsar, D. S. (2020). The origin of *Citrus*. En: The Genus *Citrus.* Talon, M., Caruso, M., & Gmitter jr, F. G. (eds.). (pp. 9-31). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00002-4.

Terblanché, F. C., & Kornelius, G. (1996). Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-a literature review. *Journal of Essential Oil Research*, 8(5), 471-485. https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700673.

Thiers, B. M. (2024) [permanentemente actualizado]. IndexHerbariorum: a global directory of public herbaria andassociated staff. New York Botanical Garden's VirtualHerbarium. URL: http://sweetgum.nybg.org/ih

Torres Leal, G. J. & Ramallo, N. (1996). Behaviour of *Geotrichum candidum* in different citrus areas of Tucuman Province, Argentina. En: Proceeding of the International Society of Citriculture, VIII Cong., (pp. 1178). Sun City, Sudáfrica.

Trillo, C., & Audisio, C. (2018). Las plantas medicinales de los huertos de pobladores de diferente tradición cultural en Bosques Chaqueños de Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 17(2), 104-119.

Trillo, C., Colantonio, S., & Galetto, L. (2014). Perceptions and use of native forests in the arid Chaco of Córdoba, Argentina. *Ethnobotany Research and Applications*, 12, 497-510.

Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32(3), 235-245. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.005.

Trytek, M. & Fiedurek, J. (2002). Biotransformation of d-limonene to carvone by means of glucose oxidase and peroxidase. *Acta Microbiologica Polonica*, 51(1), 57-62. https://www.researchgate.net/publication/11203916.

Tugwell, B. (1980). Making the most of fungicide treatments for mould control. *Packingshed Newsletter* no. 2, South Australian Department of Agriculture.

Tuset J.A. (1987). Podredumbres de los frutos cítricos. Generalitat Valenciana. (pp. 206) Valencia, España.

Udoh, I. P., Eleazar, C. I., Ogeneh, B. O., & Ohanu, M. E. (2015). Studies on fungi responsible for the spoilage/deterioration of some edible fruits and vegetables. *Advances in microbiology*, 5(04), 285-290. http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.54027.

UNSTATS (Department of Economic and Social Affairs Statistics). https://unstats.un.org/UNSDWebsite/

USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. (2019). Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy).

Vallesi, A., Pucciarelli, S., Buonanno, F., Fontana, A., & Mangiagalli, M. (2020). Bioactive molecules from protists: Perspectives in biotechnology. *European Journal of Protistology*, 75, 125720. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2020.125720.

Vasconcelos, A. L., Vasconcelos, A. L., Ximenez, E. A., Randau, K. P. (2013). *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae): aspectos farmacognósticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas*. *Básica e aplicada,* 34, 151-159.

Vaz, N. P. (2013). Alcaloides esteroidais de frutos de *Solanum caavurana* Vell: isolamento, proposta dos seus mecanismos de fragmentação por ESI-MS/MS e avaliação de seu uso popular para o tratamento da hanseníase. Teses doutoral. Doutorado em Ciências, Química Orgânica. Universidade Federal do Paraná, Brasil.

Vaz, N. P., Costa, E. V., Santos, É. L., Mikich, S. B., Marques, F. A., Braga, R. M., & Maia, B. H. (2012). Caavuranamide, a novel steroidal alkaloid from the ripe fruits of *Solanum caavurana* Vell. (Solanaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(2), 361-366.

Viglianco, A., Novo, R., Cragnnolini, C., Nassetta, M., & Cavallo, A. (2008). Antifeedant and repellent effects of extracts of three plants from Córdoba (Argentina) against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *BioAssay*, 3, 1-6.

Von Lücken, P. M. N. (2015). Estimación de la pérdida de precipitación pluvial por interceptación en el dosel de un bosque ribereño en la urbanización Surubi'i, Departamento Central, Paraguay, Universidad Nacional de Asunción.

Vryzas, Z., Ramwell, C., & Sans, C. (2020). Pesticide prioritization approaches and limitations in environmental monitoring studies: from Europe to Latin America and the Caribbean. *Environment International*, 143, 105917. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105917.

Vu, D., Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrmann, T., Stielow, B., Eberhardt, U., & Verkley, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in mycology*, 92(1), 135-154.

Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Junior, M. R. M. (2019). Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. En: Bioactive compound (pp. 33-50). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5.

Wakeel, A., Jan, S. A., Ullah, I., Shinwari, Z. K., & Xu, M. (2019). Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of Isatis tinctoria. *PeerJ*, 7, e7857. https://doi.org/10.7717/peerj.7857.

Wang, F., & Deng, J. (2020). Identification of a new *Bacillus sonorensis* strain KLBC GS-3 as a biocontrol agent for postharvest green mould in grapefruit. . *Biological Control*, 151, 104393

Wang, X. (2013). A Chinese medicinal preparation for promoting rehabilitation after hiatal hernia surgery. *Patent* CN 103006833 A.

Wang, Y., Wang, S., Fabroni, S., Feng, S., Rapisarda, P., & Rouseff, R. (2020). Chemistry of citrus flavor. In *The genus citrus* (pp. 447-470). *Woodhead Publishing*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00022-X.

Weber, R. W. (2020). Zehn Jahre Fungizidresistenztests bei *Botrytis* im norddeutschen Erdbeeranbau. *Erwerbs-Obstbau*, 62, 155-161. https://doi.org/10.1007/s10341-020-00484-z.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Whiteside, J. O. (1980). Detection of benomyl-tolerant strains of *Elsinoe fawcettii* in Florida citrus groves and nurseries. *Plant Disease*, 64,871-872.

Wild, B. L. (1983). Double resistance by citrus green mold *Penicillium digitatum* to the fungicides guazatine and benomyl. *Annals of Applied Biology*, 103, 237-242.

Wild, B. L., & Rippon, L. E. (1975). Response of *Penicillium digitatum* strains to benomyl, thiabendazole and sodium o-phenylphenate. *Phytopathology*, 65, 1176-1177.

Xu, Y. M., Bashyal, B. P., Liu, M. X., Espinosa-Artiles, P., U'Ren, J. M., Arnold, A. E., & Gunatilaka, A. A. (2015). Cytotoxic cytochalasins and other metabolites from *Xylariaceae* sp. FL0390, a fungal endophyte of Spanish moss. *Natural Product Communications*, 10, 1655-1658.

Yeung, M., Kerr, W. A., Coomber, B., Lantz, M., & McConnell, A. (2017). Declining International Cooperation on Pesticide Regulation. Palgrave Studies in Agricultural Economics and Food Policy. Springer. DOI 10.1007/978-3-319-60552-4.

Yokozeki, A. (2010). Extended moisturization cosmetic compositions. *Patent* WO 2010132202 A2.

Zabala, J. M., Exner, E., Cerino, C., Buyatti, M., Cuffia, C., Marinoni, L., Kern, V., & Pensiero, J. F. (2021). Recursos fitogenéticos forestales, forrajeros, de interés apícola y paisajístico nativos de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Revista FAVE Ciencias. Agrarias*, 20, 99-131.

Zacarias, L., Cronje, P. J., & Palou, L. (2020). Postharvest technology of citrus fruits. En The genus citrus (pp. 421-446). *Woodhead Publishing*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00021-8.

Zacchino, S., Derita, M. G., & Svetaz, M. J. (2012). Discovery of antifungal plants in Argentinean San Luis Province: ethnomedical information or random selection?. *Revista Eletrônica de Farmácia,* 9(1), 22-22. https://doi.org/10.5216/ref.v9i1.17775.

Zacchino, S., Santecchia. C., López. S., Gattuso, S., & Muñoz J de D. (1998). In vitro antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomedicine,* 5(5),389-395.

Zavala-Ocampo, L. M., Aguirre-Hernández, E., Pérez-Hernández, N., Rivera, G., Marchat, L. A., & Ramírez-Moreno, E. (2017). Antiamoebic activity of *Petiveria alliacea* leaves and their main component, isoarborinol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1401-1408.

Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124, 198-202. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034.

Zeng, X., Xi, Y., & Jiang, W. (2019). Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(13), 2125-2135. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1439880.

Zhang, H. P., Samadi, A. K., Rao, K. V., Cohen, M. S., & Timmermann, B. N. (2011). Cytotoxic oleanane-type saponins from *Albizia inundata*. *Journal of Natural Products*, 74, 477-482.

Zhou, F., & Pichersky, E. (2020). More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 55, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.01.005.

Zhou, F., Hu, H. Y., Song, Y. L., Gao, Y. Q., Liu, Q. L., Song, P. W., & Li, C. W. (2020). Biological characteristics and molecular mechanism of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from Henan Province of China. *Plant Disease*, 104(4), 1041-1047.