

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Caracterización Química Preliminar de los Brotes Tiernos de Naranja, Limón y Toronja y Evaluación de sus Extractos en Bioensayos para *Diaphorina citri* K. Plaga de los Cítricos

TESIS PROFESIONAL

**Que para obtener el Título de:
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

Nidia Anette Romo López

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



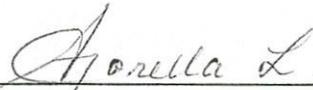
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

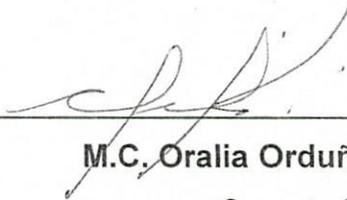
FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Nidia Anette Romo López**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



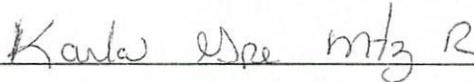
Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño

Director de tesis



M.C. Oralia Orduño Fragoza

Secretario



M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson

Vocal



Dr. Fernando Rocha Alonzo

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, mi alma mater, por el valioso conocimiento que me ofreció para realizarme como profesionista.

Al Departamento de Ciencias Químico Biológicas, por el apoyo en esta investigación y la disposición del equipo necesario.

A CIAD, por prestar sus instalaciones para poder realizar una parte de mi investigación en el laboratorio de Biopolímeros.

A PROMEP, a través del proyecto “Caracterización química, espectroscopia y biológica de volátiles de la familia Rutaceae (naranja, limón y toronja) y su impacto en el control de *Diaphorina citri*, plaga de los cítricos”. Protocolo Promep 95994. No. de Registro: QBOBE12351 (Academia de Química Orgánica y Bioquímica). Director de Proyecto: Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño.

A la Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño, gracias por todo el conocimiento que me transmitió, su disposición y paciencia.

A mis sinodales M.C. Oralia Orduño, M.C. Karla Martínez y Dr. Fernando Rocha, gracias por sus consejos, paciencia y el tiempo que dedicaron en este trabajo.

DEDICATORIA

A Jehová por cuidarme y ayudarme en sacar adelante mis metas y darme la fortaleza de seguir adelante.

A mi madre María Concepción López Guaydacán, este logro es gracias a todo el apoyo que me brindaste a lo largo de mi carrera y en mi vida. Gracias por enseñarme a luchar por los sueños y a no rendirse, que las cosas son difíciles porque si fueran fáciles cualquier persona las haría y no tendrían valor. Eres una excelente madre que incondicionalmente estuviste en todo momento soñando conmigo y enseñándome a volar. Te amo mamá lo logramos.

A Tannya Ortiz, porque con su inocente y dulce sonrisa, iluminas mis días motivándome a seguir adelante. Te quiero hermana.

A Gabriel Rodríguez, que es parte fundamental de mi vida, que he recibido todo de su parte y me ha motivado a seguir con mis sueños. Le agradezco haber entrado a mi vida y estar conmigo incondicionalmente en este tiempo tan importante.

A mis abuelos Hilario y Conchita, por estar a mi lado apoyándome en mis decisiones y sobre todo motivándome a seguir adelante en cada momento.

Al Ing. Eduardo López Guaydacán, por ayudarme en lo posible y enseñarme a luchar para salir adelante y no aferrarme a una vaquita. Gracias por tus consejos, apoyo, motivación y sobre todo por ser un padre para mí.

A mis tíos Marcos Salcido y Rosalva López, por estar a mi lado y siempre pendientes de mí, motivándome en mis momentos difíciles y celebrando mis días felices.

A mi prima Alba Rosa Salcido, que ha sido una hermana para mí y siempre estuvo conmigo en cada momento de mi vida, gracias por confiar en mí y motivarme como una gran amiga que eres.

A Isabel López, siempre apoyándome y volviéndome a la realidad, enseñándome a poner los pies en la tierra. Gracias por tus consejos que siempre me ayudaron a salir adelante.

A mi ahijada Azul Pastor, por todo el cariño y ternura que me brinda.

A Francis López, Verónica de Delgadillo y Dulce de Estrada, por sus palabras de incitación que me ayudaron en mi carrera y mi vida, son unas excelentes tías.

A Andrea Romo, por su valiosa amistad que me ha enseñado el significado de una verdadera amiga, estando conmigo en todo momento y apoyándome en mis locuras. Pero sobre todo la confianza depositada en mí.

A mis amigos, por que los amigos son ángeles que nos llevan en sus brazos cuando nuestras alas tienen problemas para recordar como volar.

De nuevo a mi directora de tesis y sinodales, gracias por ser tan buenos maestros.

A mis maestros de la carrera muchas gracias.

Con AMOR para todos... Nidia Anette Romo López

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
OBJETIVOS.....	x
General.....	x
Particulares	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	3
Importancia de la Citricultura para México	3
Factores que Afectan la Producción de los Cítricos	4
Enfermedades de los Cítricos	4
Huanglongbing. La Enfermedad de los Cítricos	4
<i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	8
Distribución de HLB en México	10
Señales en la Interacción Planta Insecto.....	12
Las Plantas y sus Componentes Químicos	13
Metabolitos secundarios frecuentes en las plantas.....	13
Compuestos semioquímicos.....	14
Análisis de los Metabolitos de Plantas	21
Extracción de los Constituyentes de las Plantas	22
Microextracción en Fase Sólida (MEFS)	23
Análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM).....	24
Métodos Analíticos para la Determinación de Fenoles.....	25
Determinación de los Componentes Fenólicos de las Plantas.....	26
Evaluación de Actividad de los Componentes Químicos de Plantas: Interacción Planta-Insecto.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Obtención del Material Vegetal	28
Métodos de Extracción	28

Obtención de Extractos por Maceración con Solventes	28
Preparación de las Muestras Frescas	30
Procedimiento de Microextracción en Fase Sólida.....	30
Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas	32
Fraccionamiento de Extractos por Polaridad Creciente.....	32
Caracterización Fitoquímica de las Fracciones	32
Cuantificación de Fenoles Totales.....	36
Método de Folin-Ciocalteu	36
Bioensayos de Confirmación de Actividad Biológica.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Resultados de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.....	40
Resultados de la Caracterización Fitoquímica	49
Caracterización Fitoquímica de Extractos de Brotes Tiernos de Limón	49
Caracterización Fitoquímica de Extractos de Brotes Tiernos de Naranja.....	50
Caracterización Fitoquímica de Extractos de Brotes Tiernos de Toronja.....	50
Resultados de la Cuantificación de Fenoles Totales.....	54
Resultados de Bioensayos de Confirmación de Actividad Biológica	56
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Abundancia relativa de compuestos volátiles de brotes tiernos de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) de 3-4 cm por MEFS/CG-EM.....	42
2. Abundancia relativa de compuestos volátiles de brotes tiernos de limón (<i>Citrus aurantifolia</i> S.) de 3-4 cm por MEFS/CG-EM.....	44
3. Abundancia relativa de compuestos volátiles de brotes tiernos de toronja (<i>Citrus x paradisi</i>) de 3-4 cm por MEFS/CG-EM.....	45
4. Pruebas fitoquímicas de los extractos de brotes tiernos de limón mexicano de 1-2 cm.....	51
5. Pruebas fitoquímicas de los extractos de brotes tiernos de limón mexicano de 3-4 cm.....	51
6. Pruebas fitoquímicas de los extractos de los brotes tiernos de naranja dulce de 1-2 cm.....	52
7. Pruebas fitoquímicas de los extractos de los brotes tiernos de naranja de 3-4 cm.....	52
8. Pruebas fitoquímicas de extractos de brotes tiernos de toronja de 1-2 cm.....	53
9. Pruebas fitoquímicas de extractos de brotes tiernos de toronja de 3-4 cm.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Síntomas de HLB.....	7
2. <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	9
3. Distribución de <i>Diaphorina citri</i> en México.....	11
4. Semioquímicos de plantas y su interacción con los insectos.....	15
5. Tipos de flavonoides.....	20
6. Diagrama de flujo de la extracción con solventes.....	29
7. Metodología para el empleo de la técnica MEFS.....	31
8. Fraccionamiento de extractos por polaridad creciente.....	33
9. Bioensayo de confirmación de actividad biológica.....	37
10. Cromatograma típico de los brotes tiernos de limón mexicano 3-4cm obtenidos por CG-EM.....	46
11. Cromatograma típico de los brotes tiernos de naranja 3-4cm obtenidos por CG-EM.....	47
12. Cromatograma típico de los brotes tiernos de toronja 3-4cm obtenidos por CG-EM.....	48
13. Cuantificación de fenoles totales de los extractos de brotes tiernos de limón mexicano, naranja y toronja, expresados en mg/mL EQAG.....	55

OBJETIVOS

General

Caracterizar de manera preliminar los compuestos químicos en los brotes tiernos de naranja, limón y toronja y evaluar la bioactividad de sus extractos en ensayos de atracción para la plaga de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama.

Particulares

1. Obtener los extractos crudos de los brotes tiernos de naranja, limón y toronja utilizando métodos de extracción con solventes, así como el perfil de volátiles de muestras frescas de éstos cítricos.
2. Detectar los distintos tipos de compuestos fenólicos en los brotes tiernos de éstos cítricos utilizando reacciones de color con reactivos específicos.
3. Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de los brotes tiernos de los cítricos mencionados utilizando espectrofotometría UV.
4. Evaluar los extractos crudos de los brotes de los cítricos en bioensayos de atracción para *D. citri*.

RESUMEN

La citricultura nacional se ha visto amenazada por la presencia de una enfermedad bacteriana conocida como Huanglongbing (HBL), considerada mundialmente una de las enfermedades más graves de los cítricos que hasta la fecha no tiene cura y que ocasiona grandes pérdidas económicas no solo en México y Estados Unidos, sino en el mundo entero. La bacteria que infecta a los cítricos es *Candidatus Liberibacter asiaticus*; el vector de esta bacteria es el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama, que está ampliamente distribuido en las zonas citrícolas del mundo. Este trabajo fue desarrollado con el objetivo de efectuar una caracterización preliminar de los compuestos químicos de los brotes tiernos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) y toronja (*Citrus x paradisi* McFadyen) y evaluar la bioactividad de los extractos de estos cítricos en ensayos de atracción para el psílido *Diaphorina citri* Kuwayama. Para la caracterización de los componentes químicos de los brotes tiernos de limón, naranja y toronja de 3 a 4 cm se llevó a cabo la extracción de los compuestos volátiles por medio de microextracción en fase sólida (MEFS), y posteriormente se analizaron utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Los volátiles que se identificaron, pertenecen a las familias de compuestos terpeno: mono y sesquiterpenos, terpeno alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, entre otros. Además, la caracterización fitoquímica de los brotes de limón, naranja y toronja, mostró la diversidad de los componentes presentes en los extractos de los tres cítricos. En los extractos de los brotes tiernos de limón, el análisis fitoquímico mostró gran diversidad de metabolitos secundarios en comparación con los resultados de la marcha fitoquímica de los brotes de naranja y toronja, encontrándose flavonoides, leucoantocianos, antocianinas, taninos, triterpenos y esteroides, entre los más característicos. Sin embargo, cuando se cuantificaron los compuestos fenólicos de los tres cítricos, se encontró que los fenoles totales del extracto de naranja se encontraban en mayor concentración que los de los brotes de toronja y limón respectivamente. Los ensayos de atracción para *D. citri* con los extractos de los brotes tiernos de naranja, limón y toronja en el olfatómetro, así como con plantas frescas evaluadas en el túnel de viento, dieron como resultado una mayor preferencia del

psílido hacia los brotes tiernos de naranja. Así, los psílicos *Diaphorina citri*, en el túnel de viento mostraron más atracción a las hojas frescas de naranja, en comparación con los brotes de limón y toronja, cuando se utilizaron trampas fluorescentes engomadas de color verde y extractos de los tres cítricos, que fueron evaluados en forma individual. Se concluye que el insecto *D. citri* se guía en la selección de su hospedero por al menos dos estímulos: el olfativo y el visual.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la citricultura mexicana se encuentra amenazada por la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB), la cual se detectó por primera vez en México en el año 2009. Los síntomas de HLB fueron observados en árboles de limón mexicano, en crecimiento en áreas urbana del estado de Yucatán. HLB es la enfermedad más devastadora para los cítricos a nivel mundial. Hasta la fecha no se conoce cura para los árboles infectados con HLB y al poco tiempo se vuelven decadentes e improductivos y finalmente mueren (Trujillo, 2010; Bové, 2006).

Huanglongbing o enverdecimiento de los cítricos es una enfermedad causada por una bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. gram negativa, vascular, limitada al floema, que no es posible cultivarla en forma aislada en medios artificiales. Uno de los vectores más importantes de esta bacteria es *Diaphorina citri*, el psílido asiático de los cítricos.

La bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. es persistente, se reproduce dentro del insecto pero no se transmite a otras generaciones, el insecto al alimentarse de la planta transmite la enfermedad de HLB. Esta bacteria circula por el floema de las plantas impidiendo la circulación de los nutrientes por el taponamiento de los vasos floemáticos, provocando síntomas típicos de deficiencias nutrimentales en la planta (Da Graca, 1991). En general, la bacteria es de difícil control, afecta la vida útil de las plantas tanto jóvenes como adultas de todos los cítricos, incluyendo a sus híbridos (Setamou *et al.*, 2008).

Los síntomas del HLB en los árboles cítricos se presentan como manchas amarillentas con aspecto de moteado en las hojas, así como el retraso del crecimiento de plantas en desarrollo, la producción de fruta deforme, pequeña y con pobre coloración, la cual puede caer prematuramente (Da Graca, 2008).

En México, se ha anticipado que el HLB podría causar una reducción entre el 20 y 48 % en el rendimiento del limón mexicano en los primeros tres años, dependiendo del nivel de intensidad de daño, lo cual repercutiría en un problema social muy importante para la citricultura mexicana (Salcedo *et al.*, 2010). En Sonora, los cítricos después de la vid son los frutales de mayor importancia, constituyendo una buena

opción en el programa de reconversión de cultivos anuales a frutales (Sagaram *et al.*, 2009; Salcedo *et al.*, 2010).

Una característica de *Diaphorina citri* es que se alimenta de la sabia de los cítricos y se reproduce sólo en los brotes tiernos, recién emergidos, que es donde la hembra deposita sus huevecillos. Aunque hay muchos estudios que indican la composición química presente en las plantas de cítricos en diferentes estados fenológicos, no se han realizado estudios para conocer la composición química de los volátiles emitidos por los brotes tiernos y frescos de los cítricos que es el lugar de reproducción de *Diaphorina citri*; además son pocos los estudios que se han llevado a cabo en brotes pequeños de otras plantas, que para algunos insectos son sitios preferidos de reproducción y alimentación. Por ello, en este trabajo el objetivo consistió en la caracterización preliminar de los compuestos químicos de los brotes tiernos de naranja, limón y toronja y evaluar la bioactividad de sus extractos en ensayos de atracción para esta plaga de los cítricos.

Conociendo esta interacción y la composición química de brotes frescos y de los extractos, se podrán planear nuevas estrategias de monitoreo usando semioquímicos y feromonas para el control de la plaga, contribuyendo con ello al recientemente establecido plan regional y plan nacional, para la eliminación del psílido vector.

ANTECEDENTES

Importancia de la Citricultura para México

La citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional, por ser fuente de divisas y empleo en los procesos de producción, cosecha, empaque, comercialización e industrialización. México es considerado el cuarto productor de cítricos en el mundo, cuenta con 512 mil hectáreas establecidas con este cultivo, distribuidas en 23 estados del territorio nacional, mediante las cuales se obtienen 5.2 millones de toneladas anuales, con un valor de 5,242 millones de pesos en beneficio de 67 mil productores; esta actividad genera 70 mil empleos directos y unos 250 mil indirectos (SAGARPA, 2009).

Los principales estados productores de cítricos son: Veracruz, Tamaulipas, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Colima, Oaxaca, Yucatán, Tabasco y Sonora. México ocupa el tercer lugar en la producción de naranja, contribuyendo con el 7.2% del total de la producción mundial. Brasil ocupa el primer lugar contribuyendo con el 31.5%, seguido por los Estados Unidos de América, 13.8%, India 6.1%, China 5.0% y España 4.8% (FAOSTAT, 2007).

En Sonora, los cítricos después de la vid son los frutales de mayor importancia, alcanzando la superficie comercial de 8,224 ha con un rendimiento promedio de 24ton/ha, distribuidas en los municipios de Caborca, Altar, Carbó, San Miguel de Horcasitas, Hermosillo, Guaymas, Empalme, Cajeme, Bácum, Benito Juárez, San Ignacio Río Muerto, Navojoa y Etchojoa. De la superficie total el 95% corresponde a naranja para consumo en fresco, generando un volumen de producción de 198,120 ton, con valor aproximado de 267 millones de pesos; de las cuales en los últimos cuatro años se han exportado en promedio 12,500 toneladas anuales principalmente al mercado de los EUA (SAGARPA, 2008).

Sonora se destaca en la producción de naranja (*Citrus sinensis*) variedad: Valencia y Navel, toronja (*Citrus x paradisi*) y mandarina (*Citrus reticulata*).

Factores que Afectan la Producción de los Cítricos

La problemática fitosanitaria de la citricultura es muy amplia, son muchos los factores que afectan la producción de cítricos: hongos causantes de enfermedades a los árboles y a los frutos, malezas que compiten en las plantaciones por nutrientes y agua; también insectos que afectan directa e indirectamente la calidad y los rendimientos. Muchas veces la importancia del ataque de insectos no radica únicamente en el daño directo que producen, sino en problemas conexos como es el caso de los insectos transmisores de enfermedades de tipo viral, infecciones bacterianas y toxinas (SAGARPA, 2009).

Enfermedades de los cítricos

En el pasado ha habido amenazas en la citricultura mexicana por algunas enfermedades, entre ellas está la "gomosis de los cítricos", ocasionada por el hongo *Phytophthora citrophthora*; "La tristeza de los cítricos" virus que es transmitido por el áfido o pulgón *Toxoptera citricidus*; El "cancro" enfermedad ocasionada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis*; y la "enfermedad rosada" en la que el agente causal es un hongo denominado *Corticium salmonicolor*.

En los últimos años la citricultura mundial ha enfrentado el ataque de una nueva enfermedad "Huanglongbing" conocida como enverdecimiento o greening, causante de la muerte de 23 millones de árboles de naranja y mandarina en Asia, 10 millones en África, 3 millones en Brasil y 450 mil en Estados Unidos. Es la enfermedad más devastadora para los cítricos. (SAGARPA, 2010).

Huanglongbing. La Enfermedad de los Cítricos

A partir del año 2009 la citricultura nacional se ha visto amenazada por la presencia de una enfermedad bacteriana conocida como Huanglongbing (HLB), considerada mundialmente una de las enfermedades más graves de los cítricos (Bové, 2006).

Esta enfermedad es una de las más destructivas de los cítricos en el mundo, por la severidad de los síntomas, la rapidez con la que se dispersa y porque afecta a todas las especies comerciales de cítricos. Es una enfermedad que aún no tiene cura (Texeira *et al.*, 2005). El daño que la enfermedad ocasiona es la muerte gradual del árbol, afectando la calidad de la fruta y posteriormente produciendo la muerte del árbol (Rogers *et al.*, 2009).

La enfermedad de HLB, es causada por una bacteria: "*Candidatus Liberibacter spp.*", gram negativa, vascular, limitada al floema, que no es posible cultivarla en forma aislada en medios artificiales. La bacteria es de difícil control, afecta la vida útil de las plantas tanto jóvenes como adultas de todos los cítricos, incluyendo a sus híbridos. Es transmitida por vectores, el más importantes es el psílido *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) (Setamou *et al.*, 2008).

Candidatus Liberibacter spp. Se reproduce dentro del insecto pero no se transmite a otras generaciones, de tal forma que la bacteria infecta al vector sin afectar los procesos fisiológicos del insecto. Éste, al alimentarse de la planta transmite la enfermedad. La bacteria circula por el floema de la planta impidiendo la circulación de los nutrientes por el taponamiento de los vasos floemáticos, provocando síntomas típicos de deficiencias nutrimentales en la planta (Da Graca, 1991).

Aunque la bacteria se restringe al floema de las rutáceas, tiene la capacidad de multiplicarse en la hemolinfa y las glándulas salivales de los psílicos vectores. Dentro del insecto la bacteria cruza la pared intestinal hasta llegar a las glándulas salivales, vía hemolinfa, tomándose para esto de 1 a 3 semanas según la virulencia de la cepa (Orozco, 1995).

Hay tres especies de bacterias que han sido identificadas como asociadas con HLB, cada una causando los mismo síntomas pero con propiedades diferentes; *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) se encuentra en Asia donde la enfermedad existe, en algunas islas del océano Indico y recientemente fue introducida en las Américas. Se transmite por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* y es muy tolerable al calor. En África, *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) es asociado con el HBL y transmitido por el psílido africano de los cítricos, *Trioza erythraeae*. Cuando HLB se descubrió por primera vez en Brasil en 2004, como una especie no conocida

previamente, se le dio el nombre de *Candidatus Liberibacter americanus* (Da Graca and Korsten, 2004).

Síntomas de HLB

Dependiendo de la edad del árbol, el tiempo y estadio de la infección, los primeros síntomas de HLB por lo general comienzan con la aparición de un brote amarillo. Sin embargo, si la infección se produce en una etapa posterior al crecimiento, los síntomas y el agente causal permanecen confinados en el sector inicialmente afectado. Si un sector del árbol está afectado, entonces solo esa parte mostrará síntomas típicos de HLB, mientras que el resto del árbol exhibe un crecimiento normal y produce fruta sana de buena calidad (Da Graca and Korsten, 2005).

Aunque la presencia e identificación final de la bacteria asociada a la enfermedad requieren ser confirmadas a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), exploraciones visuales debido a los síntomas de Huanglongbing son aún una parte esencial de las estrategias de detección, delimitación, y manejo de la enfermedad (Gómez, 2009).

Follaje. El síntoma de mayor valor diagnóstico de la enfermedad de HLB es el moteado marchito, amarillo o clorótico que ocurre en las hojas (Chen *et al.*, 2009). Los primeros síntomas son hojas pequeñas y amarillentas en una rama o sección de la copa del árbol. Los síntomas más característicos del enverdecimiento de los cítricos son el moteado asimétrico y el amarillamiento que se observa en las hojas (Figura 1) (USDA, 2010).

Fruta. Las frutas de los árboles afectados por el enverdecimiento de los cítricos son pequeñas, decoloradas y/o asimétricas, tienen un sabor amargo, medicinal y agrio. Las semillas generalmente se atrofian y la formación de la fruta es deficiente. Los síntomas varían según el momento de la infección, la etapa de la enfermedad, la especie del árbol y la madurez del mismo (Figura 1) (USDA, 2010).

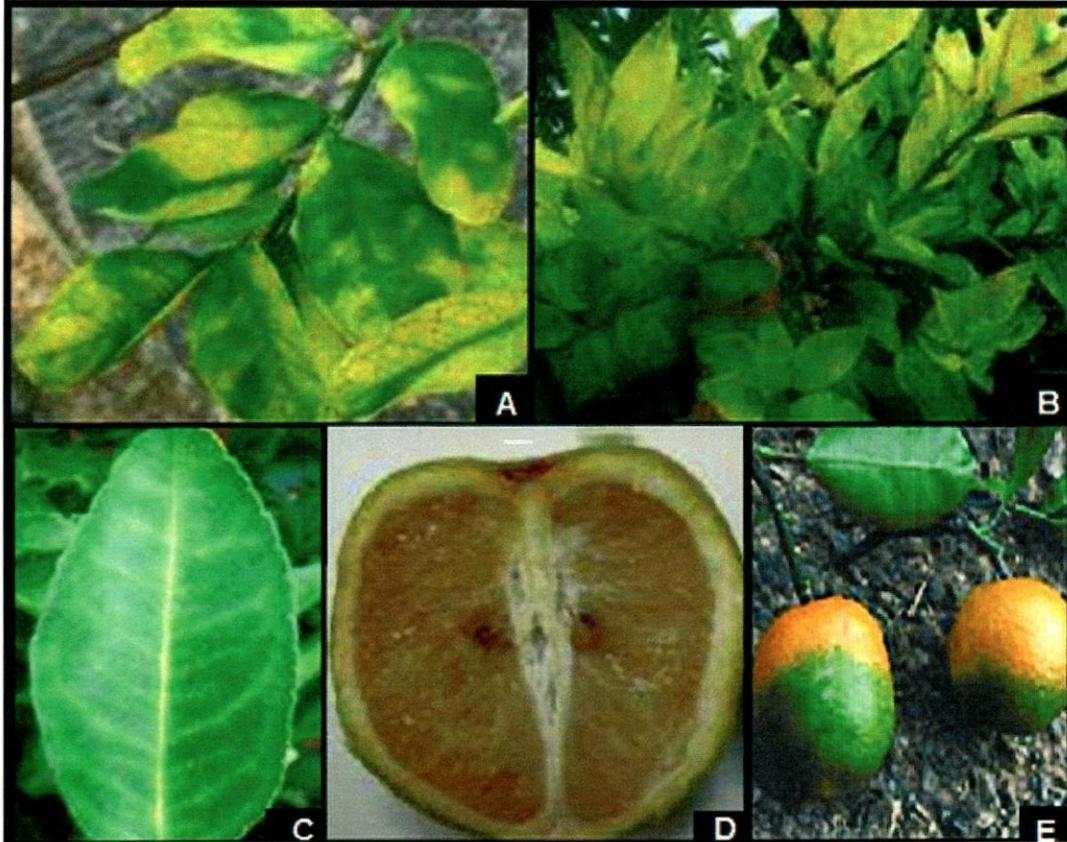


Figura 1. Síntomas de HLB. A: Hojas con el síntoma de moteado asimétrico difuso; B: Brotes cloróticos; C: Hoja con nervaduras amarillas; D: Fruto de naranjo con semillas abortadas y de color marrón pedúnculo hundido; E: Reducción del diámetro así como la ausencia de un color uniforme en el fruto. Fuente: SAGARPA, 2009.

La mayoría de las frutas de un árbol enfermo caen más temprano y las frutas que logran quedarse en el árbol son pequeñas, pobremente coloridas, con puntitos rojos por ejemplo en algunas mandarinas, siendo diferente en algunas variedades. Se suprime el crecimiento de nuevas raíces y las raicillas empiezan a decaer (Ding *et al.*, 2005).

***Diaphorina citri* Kuwayama**

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* es una especie introducida recientemente en México de gran importancia por ser vector de la enfermedad de HLB. El psílido fue encontrado en México durante el año de 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo. Desde entonces se ha distribuido ampliamente en la mayoría de las áreas citrícolas del país (López *et al.*, 2005).

El ciclo de vida. *Diaphorina citri* en total dura 15-47 días, dependiendo de la temperatura. Los huevos son depositados en los brotes tiernos (inicio de la brotación) y eclosionan en 2-4 días. Hay cinco estadios ninfales, que se completan en 11-15 días. Los adultos pueden vivir durante varios meses y las hembras ponen hasta 800 huevos en toda la vida (Halbert and Manjunath, 2004).

Características morfológicas y fisiológicas. *Diaphorina citri* mide de 3 a 4 mm de longitud, es de color marrón claro, con moteado recubierto de polvo ceroso, cabeza café con ojos rojos, antenas con 11 segmentos, ápice negro con dos manchas café claro en la parte media, las alas son anchas en tercio apical y transparentes con manchas marrón claro en el borde, el cual es un caracter importante para la identificación. Los huevos son alargados de 0.3 mm de longitud, color amarillo claro o anaranjado (Figura 2) (Hall, 2009).

Ubicación de *Diaphorina citri* en las hojas. *Diaphorina citri* infecta hojas y brotes nuevos de las plantas hospederas, donde todas se restringen a la familia de las *Rutaceae*, incluyendo *Citrus spp.* Los huevos son colocados exclusivamente en los brotes nuevos de la planta hospedera, y tanto ninfas como adultos prefieren alimentarse

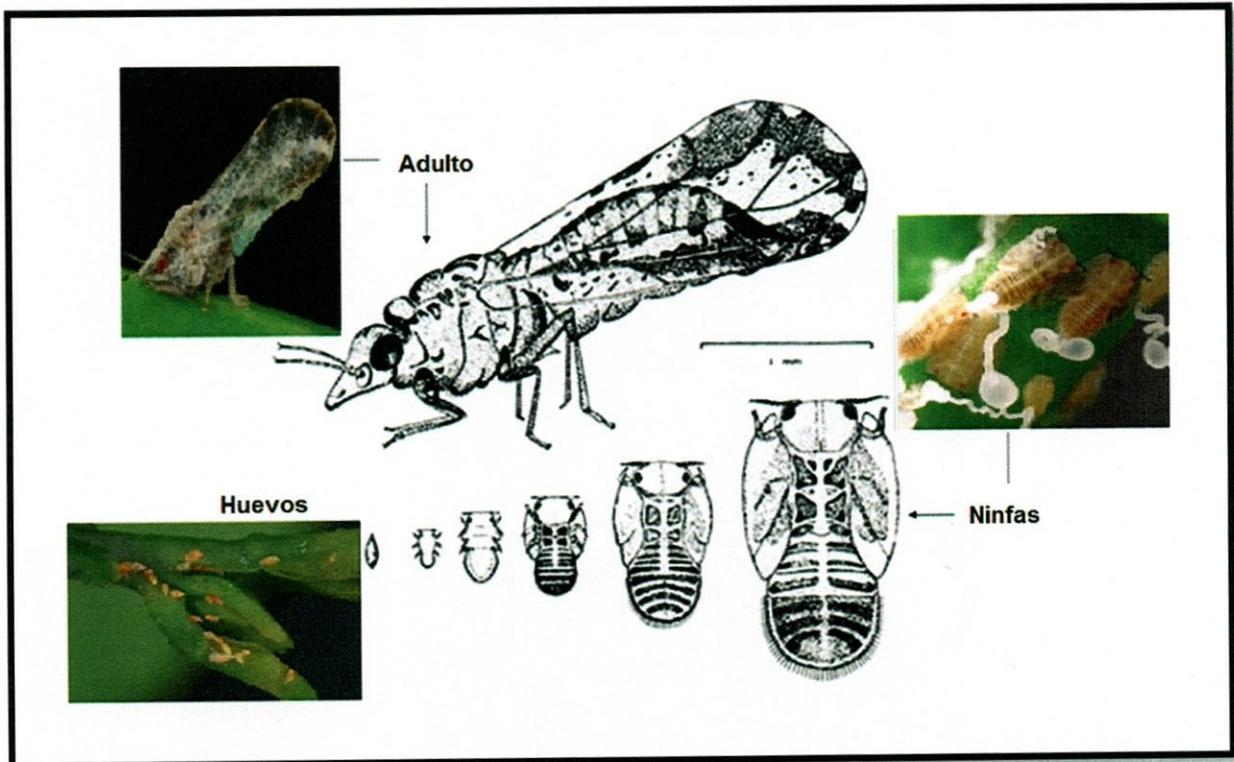


Figura 2. *Diaphorina citri* Kuwayama. En sus fases de huevo, ninfas con sus 5 estadios y el insecto adulto. Fuente: SAGARPA, 2009

de ellas (Setamou *et al.*, 2008). Los psílicos *Diaphorina citri* tanto en estado de ninfas como de adultos, provocan un daño directo al succionar grandes cantidades de savia en los brotes y hojas tiernas lo cual debilita a la planta y causa un ligero encrespamiento de brotes, las hojas dañadas no llegan a desarrollarse completamente y son angostas, la planta crece en forma anormal y en ataques severos la yema apical se seca.

Asimismo las ninfas y adultos después de succionar la savia, eliminan sustancias azucaradas (mielecilla) que caen sobre las hojas inferiores. (Davies and Albrigo, 1999). Las ninfas al alimentarse de las plantas infectadas por un período de 15 a 30 minutos, requieren a la vez de un período de 21 días para incubar y transmitir la bacteria. Sin embargo, los adultos son capaces de transmitir la enfermedad, con sólo alimentarse durante 15 minutos de plantas enfermas y la eficiencia aumenta al 100% cuando éstos se alimentan por 1 hora (Hall, 2009).

Distribución de HLB en México

El riesgo para la industria de los cítricos de México se incrementa debido a que en el año 2002, se detectó la presencia del psílido *Diaphorina citri*, actualmente dicho vector está presente en todas las regiones citrícolas del país, excepto en el estado de Baja California norte y Sonora (SAGARPA, 2008).

La enfermedad HLB está presente en 11 de los 23 estados productores de cítricos de nuestro país, como son la península de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Chiapas, Colima, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Jalisco, Sinaloa y Baja California sur (Figura 3).

En Sonora, se tiene la presencia del vector desde el año 2006, pero HLB no se ha detectado, sin embargo, ya ha sido reportado en estados vecinos. Ante esta amenaza se decidió establecer un plan piloto para el manejo del vector. (Martínez *et al.*, 2011).

Por lo tanto, *Diaphorina citri* puede ser el insecto plaga más serio y económicamente importante de los cítricos en las zonas citrícolas donde la enfermedad de HLB está presente (Jawwad *et al.*, 2009).



Figura 3. Distribución de *Diaphorina citri* en México. Fuente: SAGARPA, 2010.

Esta situación ha dirigido los esfuerzos para detener esta enfermedad hacia el desarrollo de planes estratégicos que reduzcan las poblaciones y/o eliminen el insecto vector, al mismo tiempo que se están llevando a cabo intensas investigaciones químicas, bioquímicas y moleculares tanto de las plantas de cítricos como del insecto vector, cuyos resultados permitan sumarse al esfuerzo de control de esta plaga.

En el invierno del 2010 y primavera del 2011, se diseñó y estableció un plan piloto en el sur del estado de Sonora. El plan se fundamenta en la información generada a nivel nacional e internacional para el manejo de esta problemática. El principal objetivo es reducir el riesgo de dispersión del HLB, en caso de que se detecte, manteniendo controladas las densidades de población del vector y de esta forma proteger la citricultura del estado de Sonora (Martínez *et al.*, 2011).

Señales en la Interacción Planta Insecto

Por medio de una serie de adaptaciones, las plantas han evolucionado hasta ser los organismos dominantes en nuestro planeta, de las que dependemos la mayoría de las especies. En su hábitat natural, las plantas reciben diferentes estímulos bióticos y abióticos simultáneamente, a los que responden. Las plantas terrestres son la fuente de alimento para una cantidad estimada en más de un millón de especies de insectos de diferentes grupos taxonómicos, que usan varias estrategias de alimentación para obtener los nutrientes en cada parte de la planta. Aproximadamente dos tercios de todas las especies de insectos herbívoros se alimentan de hojas.

Los herbívoros que perforan y succionan, utilizan estructuras tubulares para succionar el líquido contenido en células laceradas, mientras que los insectos minadores se desarrollan y alimentan en el tejido suave entre las capas de células de la epidermis; los áfidos, moscas blancas, y otros hemípteros insertan estiletos especializados entre las células para establecer un sitio de alimentación en el floema. En cada una de estas interacciones tanto el insecto como la planta, reciben y envían señales químicas que determinan el éxito de la interacción (Camarena, 2009).

Las Plantas y sus Componentes Químicos

Las plantas han desempeñado un papel fundamental en la vida del hombre, quien las han utilizado para suplir necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda y vestido, incluso en actos rituales. El uso de las plantas es una práctica que existe desde los inicios de la especie humana. Los productos naturales, principalmente los de origen vegetal han sido la principal fuente de agentes terapéuticos de la humanidad durante siglos, constituyendo su uso una costumbre profundamente arraigadas en las culturas de los pueblos (Henaó *et al.*, 2009).

Las plantas mediante el proceso de la fotosíntesis producen las sustancias necesarias para todos los ciclos vitales de la naturaleza. Mediante mecanismos bioquímicos conocidos se constituyen en verdaderas fábricas químicas de carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y oligoelementos como el hierro y el magnesio, que mantienen la atmósfera rica en oxígeno y deficiente en dióxido de carbono, permitiéndonos respirar; todos ellos denominados metabolitos primarios.

Existen otras sustancias que no se encuentran tan distribuidas y que se hallan restringidas solo a ciertas especies, géneros o familias como son los alcaloides, las saponinas esteroides, los aceites esenciales, los terpenoides, compuestos fenólicos, etc., a los cuales se les denomina metabolitos secundarios. Los estudios de plantas en el área de los productos naturales, aspiran a establecer relaciones entre la composición química de sus metabolitos secundarios y sus propiedades farmacológicas (Henaó *et al.*, 2009; Martínez, 2005).

Metabolitos Secundarios Frecuentes en las Plantas

Los metabolitos secundarios producen cambios morfológicos y conductuales en los organismos involucrados, ya sean plantas, animales o microorganismos. Es probable que todas las plantas muestren acumulación constitutiva o inducción de metabolitos secundarios tóxicos como parte de sus defensas contra la herbivoría. Investigaciones con numerosas plantas han revelado una gran variedad de pequeñas moléculas de

diversa naturaleza química con efecto tóxico o antinutritivo sobre insectos herbívoros (Camarena, 2009; Marín and Céspedes, 2007).

Compuestos Semioquímicos. Los semioquímicos son sustancias derivadas del metabolismo secundario de la planta, intervienen en la comunicación química entre organismos. El término semioquímico proviene del griego “semion” que significa marca o señal, asumiendo que el compuesto químico es emitido con un propósito definido hacia el receptor, con lo que se generaría una verdadera comunicación (Figura 4).

Las sustancias semioquímicas que interviene en interacciones dentro de una misma especie reciben el nombre de feromonas. Las sustancias semioquímicas cuya emisión es significativa para un organismo de una especie diferente a la emisora se denominan aleloquímicos. Las sustancias aleloquímicos se agrupan en tres categorías: alomonas, kairomonas y sinomonas (Mareggiani, 2001).

Alomonas. Son sustancias producidas o adquiridas por un organismo que en un contexto natural y en contacto con individuos de otra especie, producen en el receptor una respuesta favorable a este último.

Kairomonas. Son compuestos que en contacto con individuos de otra especie, producen en el receptor una respuesta favorable a este último.

Sinomonas. Estas sustancias, producen en el receptor una respuesta adaptativa favorable, tanto para el emisor como para el receptor (Mareggiani, 2001).

Las sustancias aleloquímicas emitidas por la planta que tienen mayor importancia en la selección del alimento por parte de una plaga son las kairomonas y las alomonas. La emisión de kairomonas por la planta favorece al insecto porque lo orienta hacia ella, o induce su alimentación u oviposición, entre otros beneficios. Cuando el aleloquímico emitido es una alomona, resulta favorecida la planta pues disminuye la posibilidad de que un herbívoro generalista o polífago pueda utilizar esa planta como fuente de alimento, ya que lo repele, disuade la alimentación o la

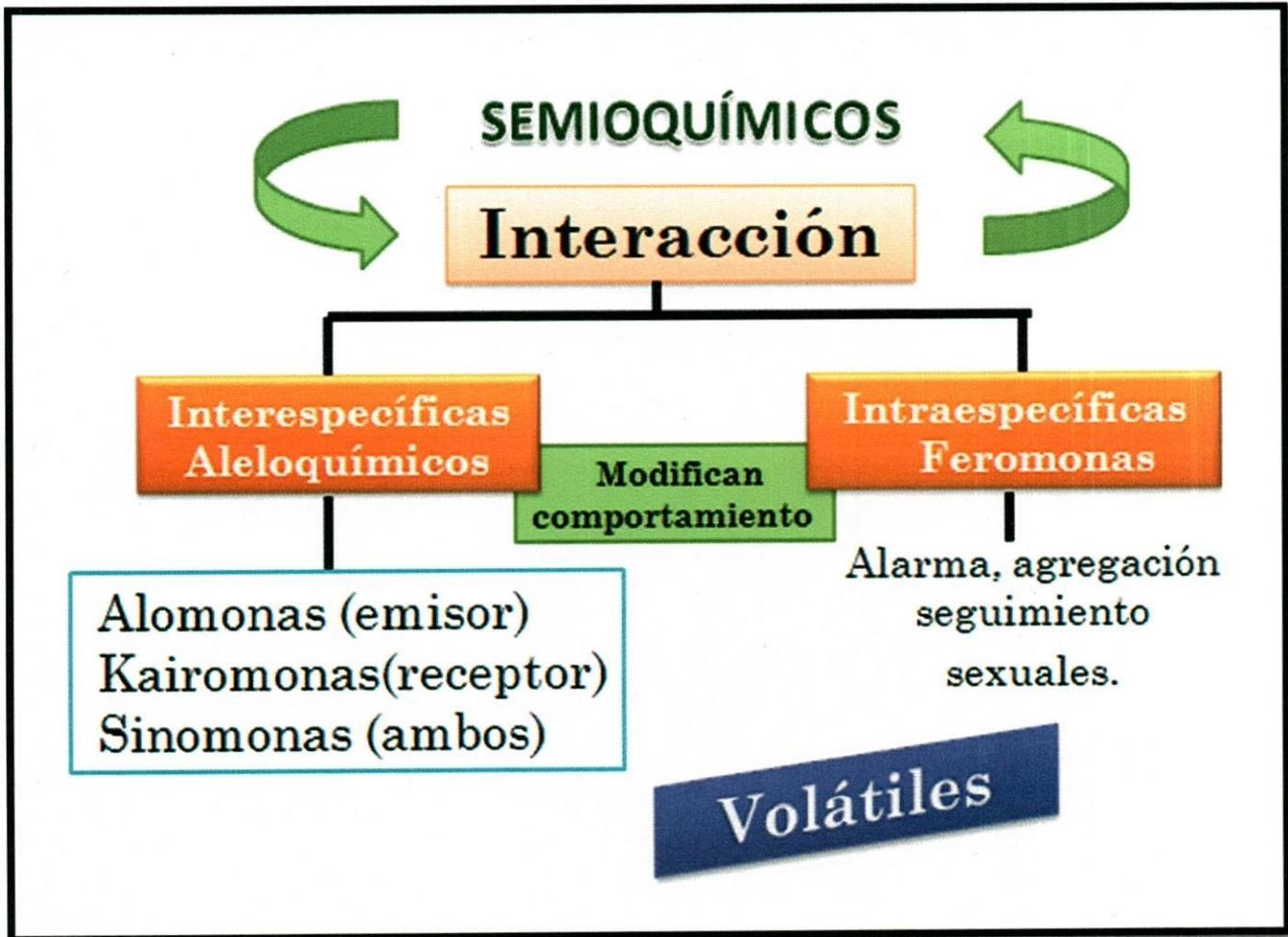


Figura 4. Semioquímicos de plantas y su interacción con los insectos. Fuente: Dicke and Sabelis, 1988.

oviposición, e interrumpe su desarrollo, entre otros efectos, por el cual las alomonas actúan como defensas químicas naturales contra los herbívoros (Blum, 1981; Mareggiani 1996; Mareggiani, 2001).

Los compuestos semioquímicos volátiles o compuestos volátiles son emitidos por las plantas y generalmente son mezclas complejas de muchos compuestos orgánicos que representan pequeñas cantidades respecto al peso total de la planta. Conocidos también como aceites esenciales, aceites volátiles o esencias, por lo general son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al ser expuestos al aire o a temperatura ambiente. Los volátiles de plantas son producidos principalmente en flores, pero también se encuentran en los frutos, tallos, hojas y raíz (Marín and Céspedes, 2007).

En las dos últimas décadas ha surgido interés por los metabolitos secundarios volátiles o compuestos volátiles, debido a sus propiedades como atrayentes de polinizadores y como señales para ubicar fuentes de comida, anidación, cría, recompensa, feromonas, etc. (Marín and Céspedes, 2007).

El rol de los fitoquímicos en la interacción insecto-planta es variado y puede involucrar respuestas favorables o desfavorables para la planta, todas estas interacciones de alta especificidad que se han desarrollado a través del proceso de coevolución (Bernays, 2000).

Terpenos. Son hidrocarburos muy abundantes en los vegetales y su clasificación se determina por el número de isoprenos (unidades de 5 carbonos) que contienen. Pueden clasificarse como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) (Lock, 1994).

Monoterpenos. Constituyen un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas, que son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales obtenidos de hojas, raíces, corteza y flores de diversas plantas; pueden presentarse como compuestos acíclicos, monocíclicos y cíclicos.

Sesquiterpenlactonas. Son sustancias amargas que se encuentran en todas las partes de las plantas, en concentraciones que varían entre 0.01% y 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las hojas.

Diterpenos. Los diterpenos tóxicos como la grayanotoxinas que se producen en las hojas de rhodadendron (del griego: rhodos, rosa; dendron, árbol) es un género de angiospermas perteneciente a la familia Ericaceae y son los responsables de la naturaleza venenosa de ellas.

Tetraterpenos. En este grupo son abundantes las xantofilas y carotenos, pigmentos vegetales amarillos y anaranjado respectivamente. Dan color a los frutos, raíces, flores, etc. En la fotosíntesis desempeñan un papel clave absorbiendo energía luminosa de longitudes de onda distintas a las que capta la clorofila. El caroteno es precursor de vitamina A (Lock, 1994).

Compuestos Fenólicos. Desde el punto de vista químico los compuestos fenólicos son compuestos que poseen una estructura común: están caracterizados por un núcleo bencénico (anillo aromático) que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. Se clasifican en no flavonoides y flavonoides. Estos últimos tienen un esqueleto en C₆C₃C₆. El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza (Robbins, 2003).

Los polifenoles incluyen también a los derivados (ésteres, metil ésteres, glucósidos, etc.) que resultan de las sustituciones de la estructura base.

La reactividad de este tipo de moléculas se debe tanto a la presencia de la función fenol que presenta un carácter ácido, como al núcleo bencénico que puede sufrir sustituciones electrofílicas.

Los están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de la planta su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), características nutritivas y propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Robbins, 2003).

Los componentes fenólicos representan un grupo inmenso de moléculas con una gran variedad de funciones en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta. Los componentes fenólicos incluyen pigmentos y sabores que pueden atraer o repeler, así como compuestos que pueden proteger a la planta en contra de insectos, hongos, bacterias y virus. La mayoría de los compuestos fenólicos se representan como ésteres o glucósidos. Los taninos y lignanos son polímeros fenólicos. Los taninos son utilizados comercialmente como tintes y astringentes, y los lignanos juegan un papel importante en la rigidez celular y tejidos, son esenciales para el desarrollo vascular (Vermerris and Nicholson, 2006).

Flavonoides. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C (Martínez *et al.*, 2002).

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales junto con ciertas vitaminas y minerales. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida; confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Martínez *et al.*, 2002).

Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las cuales están muchas de las que les confieren colores amarillos, naranja, rojo, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos, especialmente (Martínez, 2005).

Los flavonoides tienen una estructura química muy definida, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, se les conoce como compuestos $C_6C_3C_6$.

Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C3. De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc. (Figura 5) (Martínez, 2005).

Algunos ejemplos en función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- Flavanos, como la catequina, con un grupo $-OH$ en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo $-OH$ en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C3.
- Antocianidinas, que tienen unido el grupo $-OH$ en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Estudios de los flavonoides en las plantas han mostrado que estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligadas a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico, mas una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glicósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se les denomina agliconas flavonoides (Martínez, 2005).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y

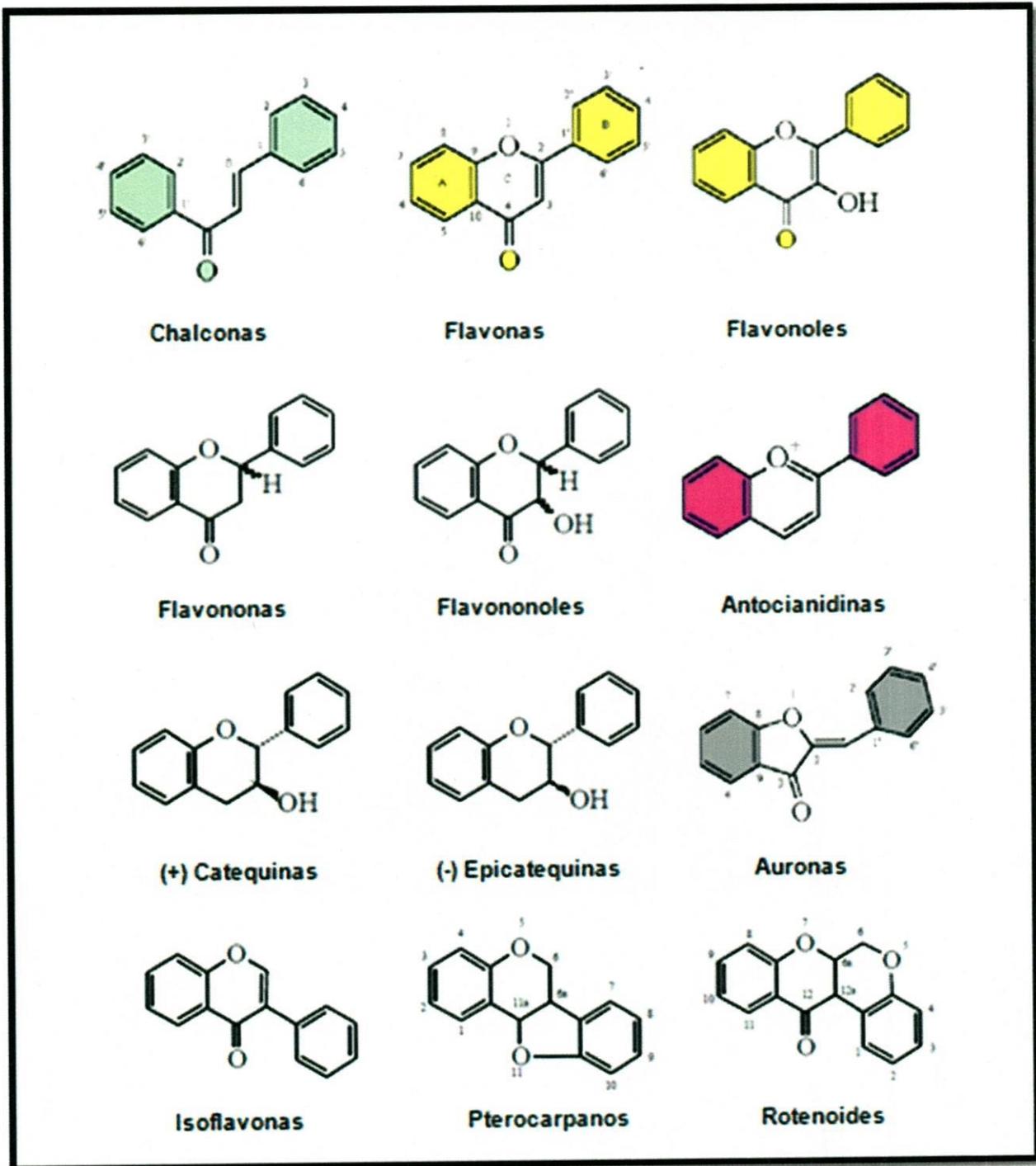


Figura 5. Tipos de Flavonoides. De acuerdo a la estructura básica que permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. Fuente: Martínez, 2005.

algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre (agliconas flavonoides), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros.

Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes.

Las antocianinas por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul.

Muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal, sin embargo en plantas de la familia Rutaceae se han encontrado diversos tipos de flavonoides (Martínez, 2005).

Análisis de los Metabolitos de Plantas

Los productos naturales provenientes de plantas son fuente de principios activos reconocidos por el hombre, de importancia en medicina, industria farmacéutica; industria de los perfumes y cosmética; en alimentos, en agricultura, entre otros; debido a sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios, que en la naturaleza funcionan como defensa química contra herbívoros y que actualmente se están empleando para el control de plagas de insectos (Farnsworth *et al.*, 2002; Marín and Céspedes, 2007)

La liberación de compuestos volátiles de las hojas es uno de los mecanismos de defensa química utilizados por las plantas para reducir el ataque por insectos herbívoros (De Moraes *et al.*, 1998). La composición química de los volátiles de las hojas varía entre especies de plantas. Estas mezclas de volátiles son específicas de cada especie de planta, aunque tal vez inicialmente fueron producidas para reducir las tasas de herbivoría, son con frecuencia utilizadas por los insectos herbívoros como claves para identificar y localizar sus plantas hospederas (Halitschke *et al.*, 2008).

La complejidad estructural de estos metabolitos puede determinar su actividad biológica por ello, los compuestos obtenidos mediante la extracción fitoquímica, cobran relevancia como nuevos recursos, así como el análisis de volátiles o de otros componentes químicos de las plantas, para lo cual se han desarrollado técnicas que actualmente se utilizan de manera rutinaria como la cromatografía de gases acoplada a masas, el análisis cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Líquidos-Masas, Infrarojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), entre otras (Rubinson and Rubinson, 2001).

A continuación se describen brevemente varias metodologías utilizadas en el análisis de plantas, algunas de las cuales utilizamos en este trabajo.

Extracción de los Constituyentes de las Plantas

Entre los procesos extractivos de los diferentes fitoquímicos, aceites esenciales, componentes activos etc. destacan las nuevas tecnologías de extracción entre las que se encuentra la extracción en fluidos supercríticos (EFS). Sin embargo, en los laboratorios de investigación, aún se utilizan otros procesos extractivos más convencionales, como los de arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación (Bruneton, 2001).

La extracción por solución precisa una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor, pero genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse prácticamente todos los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc. Por otra parte, precisa de equipos de vacío para poder obtener los extractos; además, es necesario utilizar disolventes orgánicos de distinta polaridad. También conlleva necesariamente establecer etapas adicionales de purificación según el destino o uso del producto. En laboratorios convencionales la metodología implica una extracción con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que

tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, no soluble en agua, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato (Palomino, 2001). Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70°C, se evapora fácilmente, pero es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, alcohol, que es soluble en agua, entre otros (Palomino, 2001).

Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

Desarrollada en los años 90's por Arthur and Pawliszyn, es una técnica de preparación de muestras que extrae y concentra los analitos directamente en una fibra o fase estacionaria que incluye un tipo o más de polímeros extractantes (Arthur and Pawliszyn, 1990; Mestres *et al.*, 2000). El método es rápido, simple, fácil de aplicar, de bajo coste y, a la vez, respetuoso con el medio ambiente, ya que no usa ningún tipo de disolvente orgánico en la preparación de la muestra, no utiliza equipo complicado y es razonablemente sensible a la recuperación de compuestos volátiles (Pawliszyn, 1997; Beaulieu and Lea, 2006; Marín and Céspedes, 2007; Reineccius, 2007). La técnica de MEFS se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida de 10 mm, de muy pequeñas dimensiones, recubierta por un sorbente de 80-100 μm (del orden de 0.5 μL ; casi siempre polimérico). El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla a una jeringa. De esta forma se facilita la manipulación y se protege la fibra cuando ésta no se utiliza (Zhang, *et al.*, 1994).

La MEFS se puede realizar como extracción de espacio de cabeza o *headspace* (HS/SPME por sus siglas en inglés). En este caso, la fibra se expone a la fase gaseosa que queda por encima de la muestra y los analitos pasarán a la fase gaseosa en función de su presión de vapor.

En términos generales, se puede decir que el volumen del espacio de cabeza tiene que ser lo más pequeño posible, ya que el rendimiento de la extracción disminuye cuando aumenta el volumen del espacio de cabeza por efecto de la dilución (Yang and Peppard, 1994; Pillonel *et al.*, 2002).

Se emplea combinada con cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (CG-EM) y es aplicada a un amplio rango de compuestos volátiles y semivolátiles en muestras biológicas (Ulrich and Martens, 1997), ambientales (Clark and Bunch, 1997) y de alimentos (Kataoka *et al.*, 2000; Wilkes *et al.*, 2000).

Análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la cualidad de lograr la separación de mezclas muy complejas. Una vez que se encuentran los componentes de manera individual, el único dato del cual se dispone es el tiempo de retención de cada compuesto que corresponde a los picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar (Gutiérrez and Droguet, 2002).

La espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, CG (Cromatografía de gases) y EM (Espectrometría de masas) da lugar a una técnica combinada: cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) que resulta ser la técnica de elección ya que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez and Droguet, 2002).

Por lo tanto, el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) ha permitido conocer la composición química y la abundancia relativa de los principales componentes de las plantas (Acosta *et al.*, 2003). Para lo cual, en el caso de los compuestos volátiles previamente se realiza su extracción, a través de métodos como la microextracción en fase sólida (MEFS) ya mencionado y que actualmente es muy utilizada (González *et al.*, 2009; González *et al.*, 2010).

El análisis de los cromatogramas proporciona una amplia información cualitativa si se escoge el sistema de detección adecuado para determinar y evaluar los analitos separados y a su vez si se cuenta con una base de datos que pueda realizar su comparación con una biblioteca de espectros, para de una forma muy precisa, establecer la identidad de los componentes de una muestra, de hecho esto se logra con cromatógrafos que contienen sistema de detección como el Infrarrojo (IR), el de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o el espectrómetro de Masas (MS) (Rubinson and Rubinson, 2001).

Métodos Analíticos para la Determinación de Fenoles

Entre los métodos analíticos más relevantes para la determinación de los fenoles se destacan la espectrofotometría ultravioleta visible (UV-V), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (GC) y técnicas combinadas como líquidos-masas (HPLC/MS).

En general, mediante la espectrofotometría se determina la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra, pero sin hacer distinción entre los diferentes tipos de fenoles. Las reacciones más corrientes son las de copulación que generan colorantes azoicos intensamente coloreados y que son fácilmente analizables en el espectro visible. El desarrollo del color, la sensibilidad, la reactividad y la longitud de onda del máximo de absorción, dependen de factores tales como el pH, temperatura, disolvente, reactivo diazotado empleado, naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo aromático.

Por otro lado, los métodos cromatográficos permiten la determinación individual de cada fenol y en general son más sensibles y selectivos que la espectrofotometría ultravioleta-visible. Dentro de los métodos cromatográficos se utilizan con más frecuencia la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía de gases (GC).

Determinación de los Componentes Fenólicos de las Plantas

En alimentos y plantas los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar compuestos fenólicos son el ensayo de la vainillina y el de Folin Ciocalteu. El método de Folin Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdicos fosfotúngsticos. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico fosfotúngstico en óxidos cromógenos de color azul intenso de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Evaluación de actividad de los componentes químicos de plantas: interacción planta-insecto

Bioensayo de Confirmación de Actividad Biológica

Un ensayo en el cual el detector de actividad es un organismo o parte de su sistema sensorial, es considerado como un bioensayo. Los bioensayos son herramientas básicas para evaluar la actividad biológica de los estímulos químicos y visuales involucrados en la búsqueda de alimento, planta hospedera o pareja sexual por parte de un organismo (Finch, 1986).

Los principales tipos de bioensayos se basan en respuestas fisiológicas o conductuales de organismos completos o respuestas electrofisiológicas de órganos o estructuras aisladas. Existen diferentes tipos de bioensayos para evaluar las respuestas de un organismo a un estímulo químico determinado. Entre ellos destacan los bioensayos en túnel de viento, olfatómetro y los ensayos de electroantenogramas (Hare, 1998). Sin embargo, el diseño de bioensayos específicos a una especie determinada requiere de mucho mayor conocimiento y observación de los hábitos de comportamiento del insecto.

Bioensayos en Túnel de Viento

Los bioensayos para sustancias químicas volátiles pueden ser agrupados en dos clases generales: los que utilizan aire en movimiento y los que no lo utilizan (Baker and Carde, 1984). En el caso de los que utilizan aire en movimiento requieren de equipo especial para producir consistentemente un flujo de aire controlado con fuerza y dirección uniformes entre ensayo y ensayo. En este caso, los volátiles químicos son transportados en contra del viento en forma de una nube o pluma de olor y las respuestas en el comportamiento del organismo son registradas de acuerdo a la entrada o salida de dicha pluma de compuestos (Hare, 1998).

El túnel de viento es considerado una herramienta invaluable para la identificación de atrayentes de varias especies de insectos. Las respuestas obtenidas a partir del vuelo de un insecto son altamente integradas, por lo que los bioensayos en túnel de viento son probablemente los más discriminatorios en el área de la investigación de feromonas (Hare, 1998; Baker and Carde, 1984; Heath *et al.*, 2001).

Básicamente un túnel de viento consiste de tres partes: a) una zona de entrada en la cual el aire es acelerado y el flujo es regulado, b) una sección de trabajo, usualmente menor a un metro de diámetro y c) una zona de salida donde el aire es desacelerado. Para su construcción se utiliza generalmente madera, aluminio, plástico, vidrio o plexiglas MR; la elección del material depende de las características del químico a probar (muchas sustancias son absorbidas por el plástico) y de las características del insecto en estudio (Hare, 1998; Finch, 1986).

La mayoría de este tipo de bioensayos se ha empleado para el estudio de lepidópteros. Existen diversos trabajos que giran en torno a pruebas en túnel de viento, ya sea para volátiles de plantas, atrayentes alimenticios o feromonas sexuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del Material Vegetal

Las muestras de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle), y toronja (*Citrus x paradisi* McFayden), fueron recolectadas en la Costa de Hermosillo (28°, 14'N, 111° 45'O) y las de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) se obtuvieron de huertas de naranja ubicadas en Guaymas, Sonora y en La Costa de Hermosillo (Ver Anexo 1). Se cortaron sólo aquellas varetas o tallos que portaban los brotes tiernos de las plantas consideradas y en el período de brotación correspondiente a cada una, las cuales fueron colocadas en bolsas de papel, éstas bolsas fueron introducidas en otra bolsa de polietileno para enseguida colocarse en una hielera para su transportación al laboratorio de Investigación Química del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la UNISON, en donde fueron procesadas de inmediato.

Métodos de Extracción

Se partió de 250 g de brotes tiernos de los cítricos respectivamente. Las muestras de cada especie fueron divididas en dos lotes: uno de ellos (lote 1), se deshidrató a temperatura ambiente para después someterse a maceración con solventes y el otro (lote 2), se utilizó en fresco.

Obtención de Extractos por Maceración con Solventes

El material vegetal del lote 1, se maceró con un solvente (metanol, etanol o diclorometano) durante 7 días, a temperatura ambiente, protegido de la luz y se agitó ocasionalmente. Transcurrido el tiempo de maceración se realizó una filtración primaria sobre gasa para eliminar las partículas de mayor tamaño, después se llevó a cabo una segunda filtración utilizando papel Whatman No. 5. El filtrado obtenido se evaporó a presión reducida a una temperatura de 40°C para eliminar el solvente utilizando un evaporador rotatorio (IKA RV® 10 digital) (Figura 6).

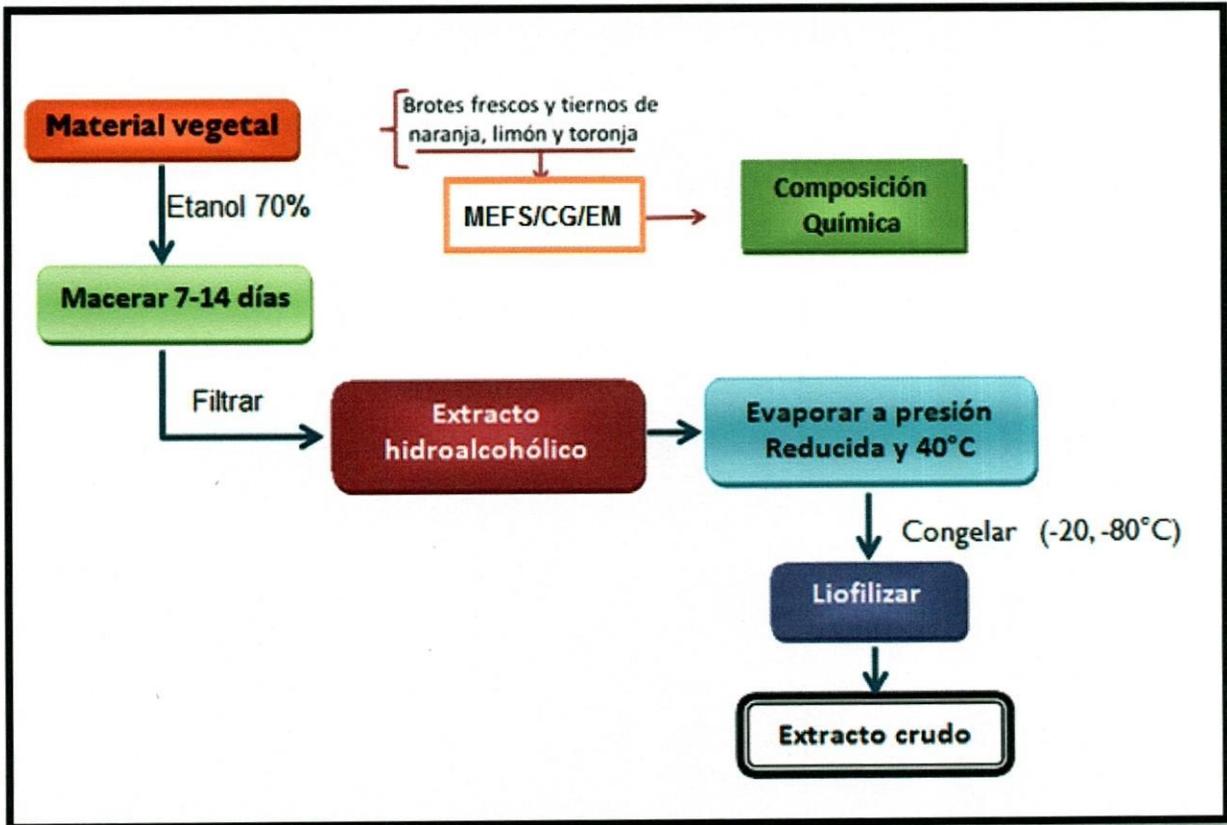


Figura 6. Diagrama de flujo de la extracción con solventes de los brotes tiernos de naranja, limón y toronja, para obtener los extractos. Fuente: Harborne *and* Williams 2000; Corella *et al.*, 2011.

Los extractos crudos obtenidos fueron liofilizados y conservados en refrigeración para su posterior utilización en el análisis de componentes y en los bioensayos (Grigonis *et al.*, 2005).

Preparación de las Muestras Frescas

Se pesaron 2 g de cada una de las muestras frescas del material vegetal del lote 2, por duplicado y se colocaron dentro de viales de vidrio previamente pesados con tapa y septum, los viales fueron sellados con papel aluminio y se conservaron en congelación para el análisis posterior de los componentes volátiles y semivolátiles obtenidos por el método de microextracción en fase sólida (MEFS).

Procedimiento de Microextracción en Fase Sólida

El material fresco (lote 2) de los brotes tiernos de limón, naranja y toronja fue colocado en viales individuales de vidrio; los volátiles se capturaron por Microextracción en Fase Sólida (MEFS) del espacio de cabeza de los viales. Se utilizó una jeringa con una fibra de polidimetilsiloxano-carboxen (85 μm ; Supelco, Inc., Bellefonte, Pennsylvania) que se colocó a través del septum de los viales que contenían el material fresco.

Los viales se calentaron previamente a la extracción, por 20 minutos a 50°C. Una vez colocada la jeringa en el vial, la fibra fue expuesta al espacio de cabeza de los viales por otros 20 minutos a la misma temperatura.

Transcurrido el tiempo de absorción de los volátiles por la fibra, se prosiguió a realizar la desorción en el puerto de inyección del Cromatógrafo de gases-espectrometría de masas (Figura 7).

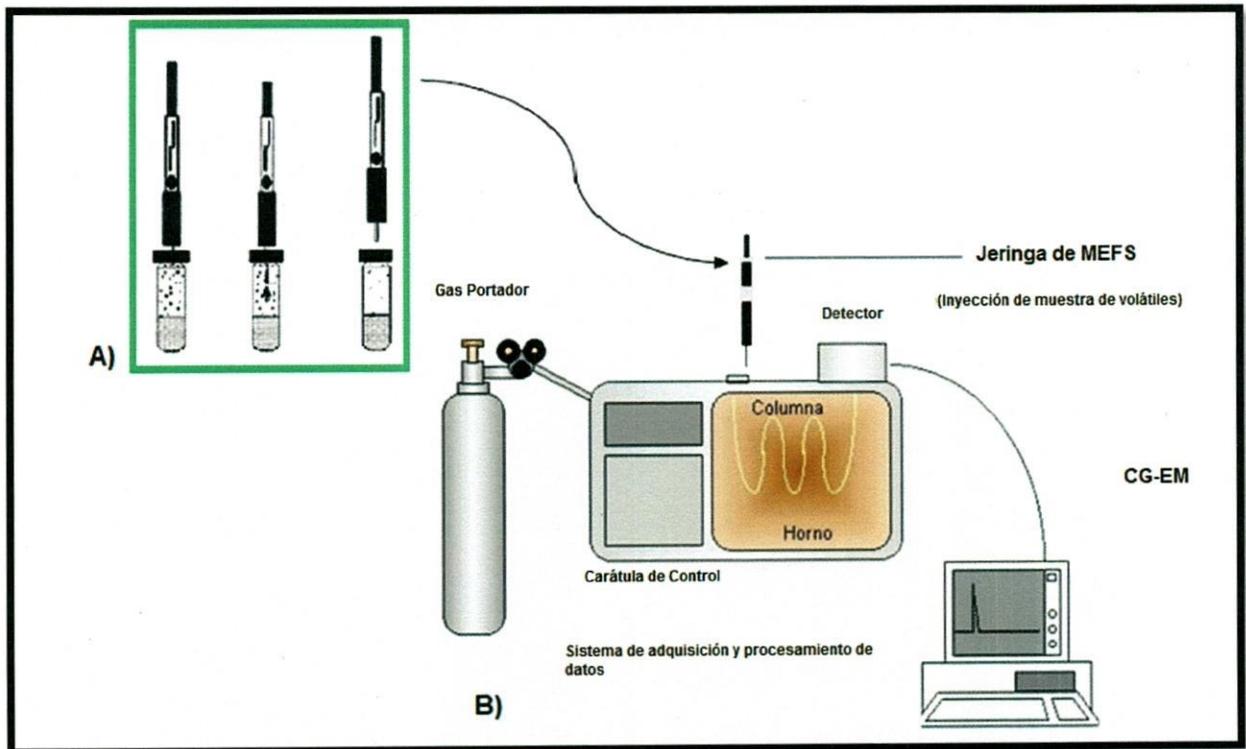


Figura 7. Metodología para el empleo de la técnica MEFS. A) Dispositivo para la extracción de los volátiles emitidos por los diferentes extractos (naranja, limón y toronja). B) identificación de los compuestos volátiles por CG-EM. Fuente: Deng, *et al.*, 2004.

Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

La desorción se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Varian® 431-GC) a 250°C por 30 segundos, el tiempo de corrida fue de 45 minutos en una columna de divinilbenceno (DB5) de 30m x 0.25mm x 0.25 µm y utilizando como gas acarreador helio. El detector utilizado fue un espectrómetro de masas de impacto de electrones (IT Mass spectrometer, Varian® 210-MS) con una potencia de 70 eV.

Los espectros generados se analizaron obteniendo el patrón de fragmentación de los iones de cada pico de los cromatogramas y los compuestos fueron identificados en la biblioteca del NIST (National Institute of Standards and Technology) (Arthur and Pawliszyn, 1990).

Fraccionamiento de Extractos por Polaridad Creciente

Los extractos crudos de los brotes tiernos de naranja, limón y toronja fueron sometidos a extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente con la finalidad de lograr un mayor agotamiento del material vegetal seco. Se obtuvieron 4 fracciones (fracción etérea, acetato de etilo, metanólica y acuosa) las cuales fueron evaporadas para eliminar el solvente en rotavapor a presión reducida (Figura 8).

Caracterización Fitoquímica de las Fracciones

Los extractos obtenidos de las fracciones se utilizaron para llevar a cabo el análisis fitoquímico preliminar detectando mediante reacciones de color los diferentes compuestos presentes en los extractos como fenoles, flavonoides, terpenos, saponinas, antocianinas.

Las técnicas utilizadas fueron estandarizadas para su uso en análisis fitoquímicos rutinarios (De Albuquerque, 2000) y se describen enseguida.

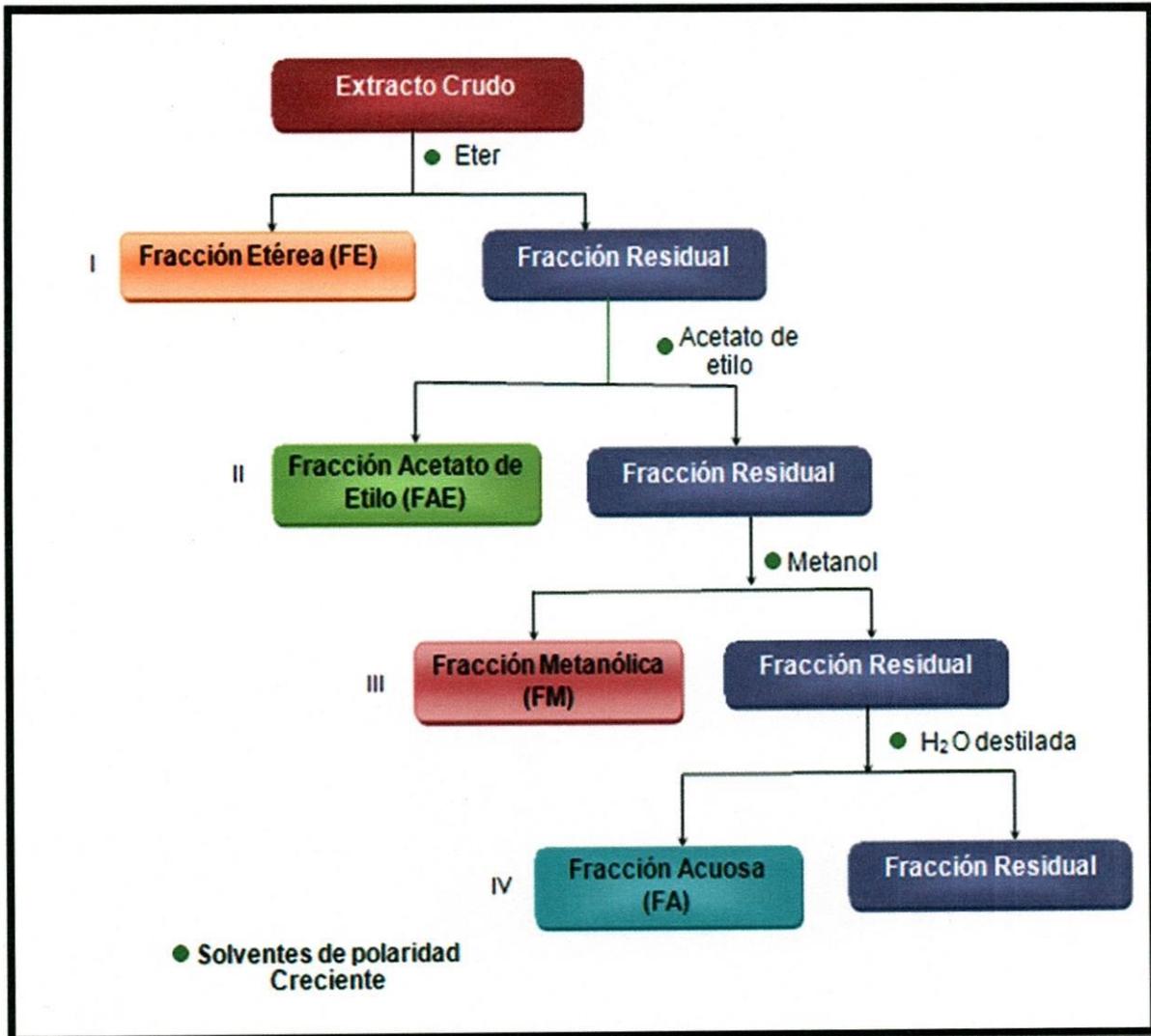


Figura 8. Fraccionamiento de extractos por polaridad creciente. Fuente: Harborne and Williams 2000; Corella *et al.*, 2011.

1. Detección de Flavonoides

Prueba de Shinoda. Se agregaron 2ml de las fracciones metanólicas y/o acuosas de los brotes de naranja, limón y toronja en tubos de ensayo por separado de cada extracto, a los cuales se les adicionó un trozo de cinta de magnesio, y posteriormente se les agregó 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado (HCl).

La formación de un color anaranjado indica la presencia de flavonas, los flavonoles dan un color rojo carmín y las flavanonas rojo magenta. En casos muy particulares pueden aparecer coloraciones verdes o azules (Domínguez, 1988).

2. Detección de Antocianinas

Se tomó 1 mL de la fracción acuosa de cada uno de los extractos a evaluar y se le adicionó a cada uno 2mL de HCl al 37% QP, los tubos se calentaron en un baño maría durante 30 min con el objeto de producir la hidrólisis de los heterósidos. Una vez transcurrida la reacción se enfriaron los tubos y se les añadió alcohol isoamílico, agitando vigorosamente. La aparición de color rojo en la fase alcohólica confirma la existencia de antocianos (Domínguez, 1988).

3. Detección de Leucoantocianos

Para la detección de leucoantocianos, se calentaron 2 ml de cada una de las fracciones metanólicas de los extractos de los brotes tiernos de naranja, limón y toronja en presencia de HCl concentrado. La reacción se considera positiva si aparece un color rojo o naranja (Domínguez, 1988).

4. Detección de Taninos

Se utilizó 1 mL de la fracción metanólica y/o acuosa de cada uno los extractos, a los cuales se le añadieron 3 gotas de la solución acuosa de FeCl_3 al 1%. Una coloración azul verde sería indicativa de reacción positiva. Para identificar taninos pirogálicos (hidrolizables) y catéquicos (condensados) se utilizó la reacción de Stiasny. Para ello, a los extractos se les añadió unas gotas de HCl concentrado y 1 mL de formaldehído, hierviéndose durante varios minutos. La aparición de un precipitado indica la presencia de taninos catéquicos. Se procedió a filtración y se le añadió unas gotas de FeCl_3 al 1%. La aparición de un color azul indica la presencia de taninos pirogálicos (Domínguez, 1988).

5. Detección de Terpenos y Esteroides

Estos grupos fitoquímicos se ensayaron mediante la reacción de Liebermann-Burchard. Se tomaron por separado 1 mL de la fracción acuosa o metanólica de los extractos a evaluar, se les adicionó 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de H_2SO_4 concentrado dejándolo resbalar suavemente por las paredes del tubo.

La presencia de un anillo rojizo en la interfase es indicativa de la existencia de triterpenos.

La coloración verdosa en la fase superior es característica de los esteroides (Domínguez, 1988).

6. Detección de Saponinas

Para la detección de saponinas fue realizada en una redisolución de cada uno de los residuos secos de los extractos de naranja, limón y toronja, en agua a ebullición y se dejaron enfriar. Posteriormente se agitaron vigorosamente durante 1 minuto.

La reacción se considera positiva cuando se forma espuma persistente por varios minutos (Domínguez, 1988).

Cuantificación de Fenoles Totales

Método de Folin-Ciocalteu

La determinación de los fenoles totales presentes en los extractos de los brotes tiernos de limón, naranja y toronja fueron realizados para cada uno de estos cítricos en base a la siguiente metodología:

Se tomaron 120 μL de cada uno de los extractos (2mg/mL) y se diluyeron en 900 μL de agua destilada. Se les añadieron 240 μL del reactivo del Folin-Ciocalteu y 360 μL de carbonato de sodio al 20%. Finalmente se añadieron 1380 μL de agua destilada para llevarlos a un volumen de 3 ml. Los tubos se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las lecturas se tomaron en un espectrofotómetro UV (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 760 nm. La cuantificación se realizó por duplicado. La cantidad de los fenoles totales se obtuvo mediante la curva de ácido gálico y se expresó en mg/mL EQAG (Gutiérrez *et al.*, 2008) (Ver Anexo 3).

Bioensayos de Confirmación de Actividad Biológica

Material biológico: Insectos

Para la evaluación de la actividad biológica de los extractos se recolectaron insectos adultos de *D. citri* de las plantas de cítricos del vivero de CREROB (Centro Regional de Estudios y Reproducción de Organismos Benéficos, Hermosillo, Sonora.) el mismo día de la realización de los ensayos. Los insectos fueron capturados por medio de un dispositivo succionador o aspirador (Ver Anexo 2). Se trasladaron los psílicos al laboratorio y se mantuvieron privados de alimento a una temperatura de 24-26°C.

Bioensayo en Túnel de Viento

Para la evaluación de atracción de *D. citri* hacia las plantas frescas (limón, naranja y toronja) se diseñó un túnel de viento (Figura 9A), el cual consta de una cámara de

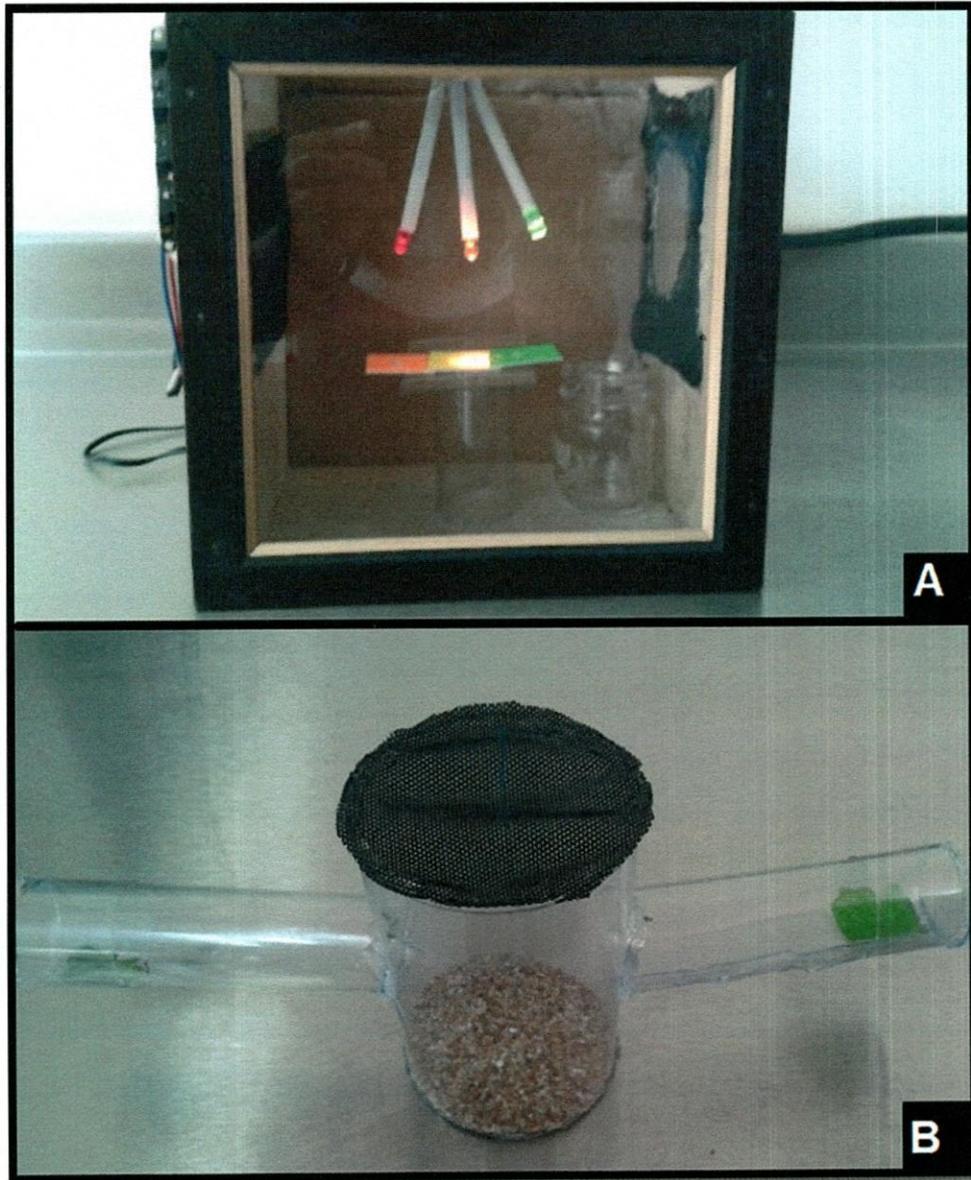


Figura 9. Bioensayo de confirmación de actividad biológica. A: Túnel de viento utilizado para los bioensayos de material fresco. B: Olfatómetro para bioensayo de atracción a los extractos por el psílido *D. citri*. (Diseño de olfatómetro y túnel de viento: Nidia Anette Romo López, 2012)

madera de las dimensiones siguientes: 20 x 20 x 10 cm, un ventilador con filtro de carbón, una fuente de iluminación que consta de 3 leds (1.5 V) de colores (rojo, verde y amarillo) y un porta muestra. En base a la revisión bibliográfica se diseñó el túnel de viento para cumplir las demandas del insecto *D. citri* (Wenninger *et al.*, 2009).

Las hojas de la planta fresca a estudiar correspondientes a los cítricos de limón, naranja o toronja, se colocaron individualmente en el porta muestra por un periodo de 30 minutos. En el ensayo se usaron 12 insectos adultos de *D. citri* que fueron expuestos a los volátiles a contracorriente del flujo de aire para cada uno de los cítricos. Como control se utilizaron hojas frescas de ruda. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Bioensayo en Olfatómetro

Para la evaluación en el olfatómetro en forma previa se realizó una prueba de atracción a los colores de trampas fluorescentes engomadas, los colores fueron: verde, amarillo y anaranjado. Las trampas fueron colocadas en árboles de naranja infestados con *Diaphorina citri*, ubicados en el CREROB (Centro Regional de Estudios y Reproducción de Organismos Benéficos, Hermosillo, Sonora) por 12 horas. Se utilizaron trampas de color amarillo comerciales como control y trampas fluorescentes de color blanco. El ensayo se repitió durante una semana.

En el laboratorio, los extractos crudos fueron evaluados en un olfatómetro diseñado conforme las características del insecto (Figura 9B), el cual consistió en una cámara cilíndrica de PVC transparente de 6 cm de diámetro por 10 cm de alto, dos tubos del mismo material con una longitud de 10 cm y 2.5 cm de diámetro adheridos a la cámara cilíndrica en forma opuesta uno del otro, una malla fina de (0.1 mm) para un flujo de aire en la superficie de la cámara cilíndrica a la cual se le agregó arena.

Los psílidos adultos de *D. citri* (12) se colocaron en el fondo de la cámara cilíndrica del olfatómetro. Se tomaron 10 μ L de cada uno de los extractos a evaluar (limón, naranja o toronja) para impregnar pequeños discos de celulosa; estos discos se colocaron sobre círculos de color verde engomados, para conocer la respuesta del psílido a los estímulos visual y olfativo. Como control de los extractos se utilizaron círculos de color verde con discos de celulosa humedecidos con agua destilada. Cada

extracto se evaluó individualmente colocando los discos preparados en los tubos del olfatómetro. En uno de los tubos se colocó el extracto a evaluar y en el tubo opuesto, se colocó el control. Se evaluó también la preferencia del insecto a los extractos entre sí, es decir cada cítrico en comparación con el otro. Se dio un tiempo de 15 minutos a los psílidos en el olfatómetro para permitir su elección. Los resultados se registraron según la preferencia del insecto de acuerdo a los dos estímulos, visual y olfativo.

Antes de cada ensayo, se lavó el olfatómetro con detergente y agua destilada, se enjuagó con alcohol al 95% y la arena fue cambiada para así evitar la contaminación del olfatómetro con el aroma de los extractos probados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

Los volátiles capturados por MEFS y analizados por CG/EM se muestran en las tablas 1, 2 y 3. Estos volátiles corresponden al material fresco de los brotes tiernos de naranja, limón y toronja de 3-4cm. Como se observa en cada una de las tablas, la composición química es variable, así como la abundancia relativa en porcentaje de los volátiles.

Los resultados de los análisis de los cromatogramas mostró que entre los compuestos identificados los siguientes están presentes en los brotes de los tres cítricos incluidos en el estudio, estos son: beta- cis-terpineol, isocariofileno, alfa-gurjuneno, delta- elemeno, gamma gurjuneno y alfa-terpineol. La mayoría de ellos son hidrocarburos terpénicos de la clase mono ($C_{10} H_{16}$) y sesquiterpeno ($C_{15} H_{24}$). Entre ellos se encuentran dos terpeno alcoholes.

En las figuras 10, 11 y 12. Se presentan los cromatogramas típicos de los tres cítricos, conservándose un patrón muy similar de señales o picos entre los cromatogramas de naranja y toronja, con excepción del cromatograma típico de limón que presenta un menor número de compuesto en el área comprendida del minuto 18 al 27. Esto indica que hay un mayor número de compuestos emitidos por los brotes de naranja y toronja que los emitidos por los brotes de limón.

En la tabla 1 y 3 correspondiente al listado de volátiles de los brotes tiernos de naranja y toronja se encontraron en común los siguientes compuestos: beta- guaieno, longifoleno, 5, 9, 9 - trimetil-spiro (3,5) non-5-en-1-ona, beta-elemeno, cimeno, alfa-cubeno, alfa- pineno epóxido y alfa- guaieno.

Por otra parte la tabla 2 y 1 que corresponde a los volátiles de los brotes tiernos de limón y naranja se encontraron en común los compuestos siguientes: cis-citral, aromadendreno, gamma- elemeno y acetato de citronelal.

La tabla 3 y 2 corresponden a los volátiles de los brotes tiernos de toronja y limón, en donde sólo se encontró en común el compuesto beta- pineno.

Los compuestos volátiles de mayor abundancia relativa en los brotes tiernos de naranja son: dihidro-3-metoxifenil butil-Amina, el hidrocarburo con función diol 4, 8,13-ciclotetradecatrieno-1,3-diol-1, 5,9-trimetil-1,2 [1-metiletetil] y el hidrocarburo cíclico insaturado 1,3-Ciclohexadieno-1, 3, 5,5-tetrametil. En los brotes de limón se encuentran (E)-Citral, limoneno y gama-Gurjuneno, los tres son hidrocarburos de la clase terpeno. En los brotes tiernos de toronja entre sus compuestos con mayor abundancia relativa se encuentran: 1,3-Ciclopentadieno,1,2,3,4,5-pentametil, el gamma terpineno y el 2-acetato (1S,2R,4R) biciclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,3,3-trimetil. Aunque estos compuestos tienen una alta abundancia relativa, la suma de los compuestos terpénicos de abundancia relativa menor caracterizan a los tres cítricos.

Puede observarse que los brotes de naranja y toronja presentan un espectro más diverso de componentes químicos, que los brotes de limón, indicando un metabolismo más activo de la planta, probablemente *D. citri* seleccione a la planta hospedero en base al reconocimiento de esta diversidad de compuestos, asegurando su refugio, apareamiento, oviposición y alimentación. Sin embargo, en estudios de campo Setamou *et al.*, en el 2008 observaron que la planta de limón presentaba la mayor población de *Diaphorina citri*, esto probablemente es debido a que este cítrico tiene varios períodos de brotación anuales, no así los cítricos naranja y toronja.

Tabla 1. Abundancia relativa de compuestos volátiles de brotes tiernos de naranja (*Citrus sinensis*) de 3-4 cm por MEFS/CG-EM

Nombre	%
Dihidro-3-metoxifenil butil-Amina	41.93
4,8,13-Ciclotetradecatrieno-1,3-diol-1,5,9-trimetil-1,2 [1-metiletenil]	20.61
1,3-Ciclohexadieno-1,3,5,5-tetrametil	7.57
6-Octanal-3,7-dimetil-(R)	6.51
Fenchil acetato	2.91
beta-Guaieno	2.36
2,4,6-Trimetilbencil-alcohol	2.09
Metil-noniléster del ácido fosfonalfluorhídrico	2.01
4,8,12,16-octadecatetraen-1-ol-4,9,13,7-tetrametil	1.98
cis-Citral	1.74
biciclo (3.1.1)-hept-2-en-4-ol-2,6,6-trimetil Acetato	1.11
(-)-Isopulegol	0.99
Ciclohexildodecil-Éster del ácido oxálico	0.99
ciclohexanol-3-metilciclohexil Acetato	0.79
beta -cis-Terpineol	0.66
1,3-Ciclopentadieno-5,5-dimetil-1-propil	0.57
Longifoleno	0.38
5,9,9-trimetil-spiro[3,5]-non-5-en-1-ona	0.37
biciclo (3.1.1)-hept-3-ene,2-formilmetil-4,6,6-trimetil	0.34
Isocariofileno	0.34
alfa-gurjuneno	0.33
beta-elemenno	0.32
o-Cimeno	0.26
2-(3,3-dimetilciclohexilideno)-(z)-Etanol	0.25
metil-Geranato	0.24
3-Careno	0.21
alfa-Cubeno	0.18

Tabla 1. Abundancia relativa de compuestos volátiles de brotes tiernos de naranja (*Citrus sinensis*) de 3-4 cm por MEFS/CG-EM (continuación)

Nombre	%
3,4-dimetil-Bencil-alcohol	0.17
alfa-Pineno epóxido	0.17
alfa-Guaieno	0.16
(+)-Aromadendreno	0.14
beta-Cadineno	0.13
Alloaromadendreno	0.11
di-epi-alfa-Cedreno	0.1
2-(3,3- dimetil biciclo(2.2.1)hept-2-Yliden)-etanol	0.09
alfa-Pineno-epóxido	0.09
Citronelal acetato	0.09
alfa-Longipineno	0.07
Berbenona	0.07
Carvacrol	0.07
gama-Elemeno	0.07
5-isopropenil-2-metilciclopent-1-ene-Carboxaldehído	0.06
Cedreno	0.05
delta-Elemeno	0.05
alfa-Amorfeno	0.03

Tabla 2. Abundancia relativa de compuestos volátiles de brotes tiernos de limón (*Citrus aurantifolia* S.) de 3-4 cm por MEFS/CG-EM

Nombre	%
(E)-Citral	20.32
Limoneno	25.41
gama-Gurjuneno	9.5
beta-cis-Ocimeno	8.38
Aromadendreno	7.57
gama-Elemeno	5.81
Geraniol	4.037
cis-alfa-Bisaboleno	3.7
acetato de Linalilo	3.42
delta-Elemeno	1.66
beta-Pineno	1.38
(-)-Espatuleno	1.08
cis-Verbenol	1.04
Germacreno D	1.04
(E,Z)-Alloocimeno	0.98
Nerol	0.94
Isocariofileno	0.88
(R)-(+)-Citronelal	0.51
alfa-Himachaleno	0.49
Psoraleno	0.48
alfa-Terpineol	0.41
óxido de Limoneno	0.25
isobutil-octadecil Éster del ác. phtálico	0.2
isopropil Palmitato	0.17
1,4-dimetilpenta-Decanoato	0.14
3-etil-5-2(2-etilbutil)-Octadecano	0.11

Tabla 3. Abundancia relativa de compuestos volátiles de brotes tiernos de toronja (*Citrus x paradisi*) de 3-4 cm por MEFS/CG-EM

Nombre	%
1,3-Ciclopentadieno,1,2,3,4,5-pentametil-	20.66
1,3-Ciclopentadieno,1,2,3,4,5-pentametil-	24.13
gamma terpineno	24.07
biciclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,3,3-trimetil-, 2-Acetato, (1S,2R,4R)	22.68
5,9,9- Trimetil-spiro(3,5)non-en-1-ona	20.7
gamma-Gurjuneno	14.93
Mirtanil acetato	13.68
pseudo-Limoneno	9.87
beta-Pineno	8.63
Longifoleno	8.58
(E)-2-Hexen-1-al	7.95
Biciclo[3.1.0]hexano,1-metil-6-(1-metiletilideno)-, (1R,5S)	7.82
Copireno	5.97
Isocariofileno	5.62
5,9,9-Trimetil-spiro (3,5) non-5-en-1-ona	5.59
Ciclohexane,1-metileno-3-(1-metiletil)-, (3R)-	4.52
Cloveno	3.38
1,3-Ciclopentadieno,1,2,3,4,5-pentametil-	2.74
(1R)-(+)-trans-Isolimoneno	2.59
beta-Elemeno	2.55
alfa-Curcumeno	2.42
alfa-Selineno	2.32
3-metileno 1,5,5-trimetil-1- Ciclohexeno	1.76
Calameno	1.75
p-Menth-1-en-4-ol	1.61
alfa-Terpineol	1.54
cis-(-)-2,4a,5,6,9a-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil(1H)benzociclohepteno	1.51
alfa-Cubeno	1.5
beta-Guaieno	1.43
gamma-Selineno	1.37
Ciclobuteno, bis(1-metiletilideno)-	1.32
beta-Cadineno	1.26
delta-Elemeno	0.83
Isopinocarveol	0.74
Benceno, 1,2,3,4-tetrametil-	0.7
alfa-Guaieno	0.61
Cimeno	0.53
1R-alfa-Pineno	0.18

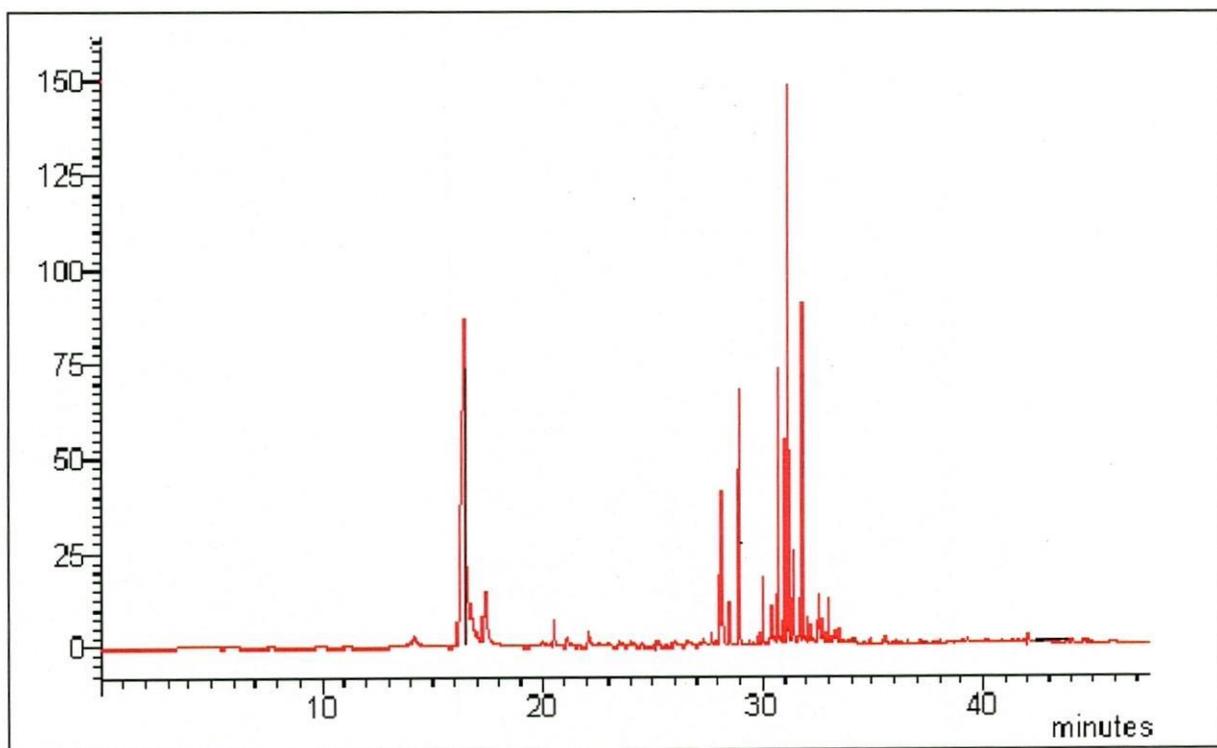


Figura 10. Cromatograma típico de los brotes tiernos de limón mexicano de 3-4 cm obtenido por CG-EM.

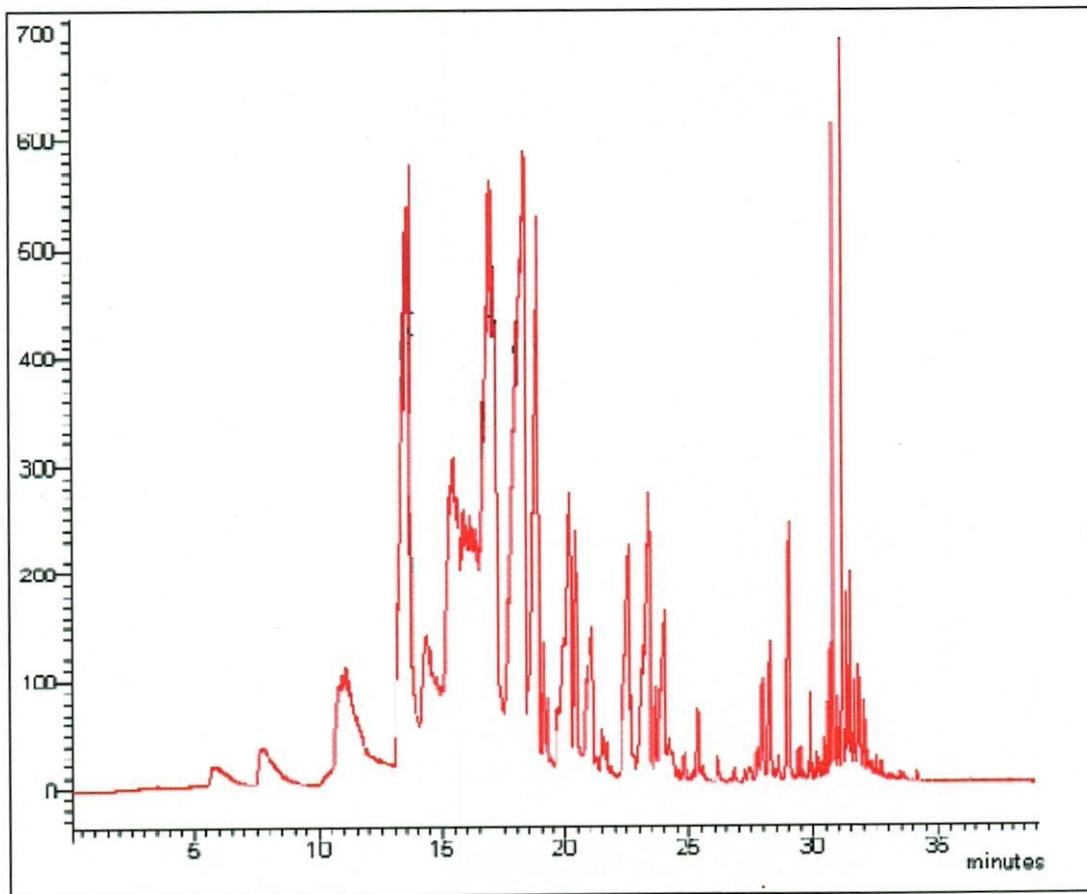


Figura 11. Cromatograma típico de los brotes tiernos de naranja 3-4 cm obtenido por CG-EM.

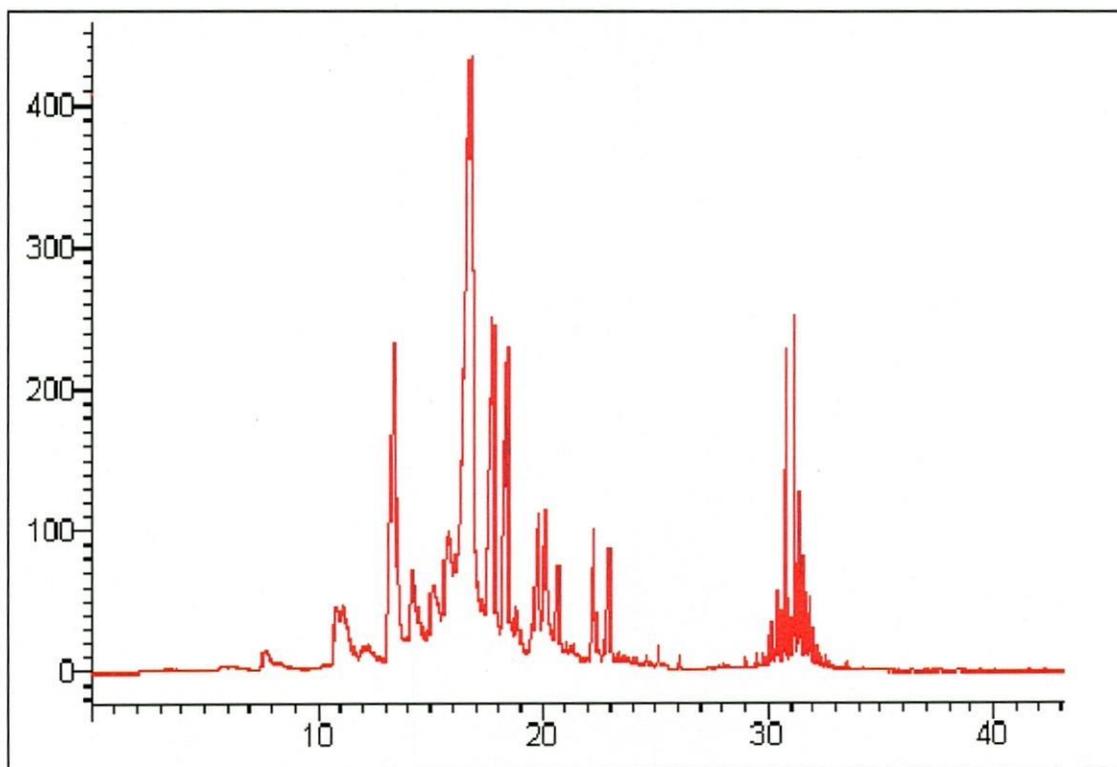


Figura 12. Cromatograma típico de los brotes tiernos de toronja 3-4 cm obtenido por CG-EM.

Resultados de la Caracterización Fitoquímica

Los resultados de la caracterización fitoquímica mostraron la diversidad de compuestos presentes en cada uno de los extractos de los brotes tiernos de limón mexicano, naranja dulce y toronja de los dos tamaños analizados. Los resultados también muestran la similitud y/o diferencia entre ambos tamaños de brotes, tanto en los extractos acuosos como metanólicos. De los extractos hidroalcohólicos crudos de los brotes de los tres cítricos que se fraccionaron por polaridad creciente se emplearon las fracciones metanólica y acuosa para llevar a cabo la marcha fitoquímica, debido a la naturaleza polar de los componentes.

Caracterización Fitoquímica de Extractos de Brotes Tiernos de Limón

El análisis fitoquímico de los extractos de limón de 1-2 cm mostró la presencia de los componentes siguientes en el extracto acuoso: leucoantocianos, taninos pirogálicos, triterpenos y esteroides; y en el extracto metanólico se identificaron taninos, triterpenos y esteroides.

En el extracto acuoso de limón de 3-4 cm se identificaron en la marcha fitoquímica los siguientes constituyentes: flavanonas, leucoantocianos, antocianinas, taninos pirogálicos, triterpenos y esteroides; y en el extracto metanólico se encuentran flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides.

En extracto acuoso de ambos tamaños de brotes de limón se encuentran en común: leucoantocianos, taninos pirogálicos, triterpenos y esteroides, pero además el extracto de los brotes de 3-4 cm presentó flavanonas y antocianinas.

En el extracto metanólico de ambos tamaños de brotes de limón se encuentran en común, taninos, triterpenos y esteroides, además el extracto metanólico de 3-4 cm de los brotes de limón presenta flavonoides.

Los resultados mostrados indican que conforme la planta crece, la diversidad de compuestos sintetizados aumenta y tanto en la extracción acuosa como en la metanólica ya se tienen presentes constituyentes del tipo flavonoide, además de antocianinas (Tablas 4 y 5).

Caracterización Fitoquímica de Extractos de Brotes Tiernos de Naranja

El análisis fitoquímico de los extractos de naranja de 1-2 cm mostró la presencia de los componentes siguientes en el extracto acuoso: presencia moderada de flavonoides, leucoantocianos, antocianinas y taninos pirogálicos; y en el extracto metanólico se identificaron flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides.

En el extracto acuoso de naranja de 3-4 cm se identificaron en la marcha fitoquímica los siguientes constituyentes: flavonas, leucoantocianos, antocianinas y taninos pirogálicos; y en el extracto metanólico se encuentran flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides.

La diferencia entre los extractos acuosos de los brotes de naranja de 1-2 cm y 3-4 cm es la presencia de flavonoides y flavonas respectivamente. En ambos tamaños se encuentran en común: leucoantocianos, antocianinas y taninos pirogálicos.

Los extractos metanólicos de los brotes de naranja de ambos tamaños, presentaron los mismos constituyentes fitoquímicos (Tablas 6 y 7).

Caracterización Fitoquímica de Extractos de Brotes Tiernos de Toronja

En el análisis fitoquímico de los extractos de toronja de 1-2 cm y 3-4 cm mostraron la presencia de los mismos componentes en el extracto acuoso: flavanonas, leucoantocianos, antocianinas, saponinas y moderados taninos; igualmente en el extracto metanólico de ambos tamaños se identificaron flavonoides y moderados taninos (Tablas 8 y 9).

KIS 73752

Tabla 4. Pruebas Fitoquímicas de los extractos de brotes tiernos de limón mexicano de 1-2 cm.

Extractos de brotes de limón mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i> S.) de 1 – 2 cm		
Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Flavonoides	(-)	(-)
Leucoantocianos	(+)	(-)
Antocianinas	(-)	(-)
Saponinas	(-)	(-)
Taninos	(+) pirogálicos	(+)
Triterpenos	(+)	(+)
Esteroles	(+)	(+)

Tabla 5. Pruebas Fitoquímicas de los extractos de brotes tiernos de limón mexicano de 3-4 cm.

Extracto de brotes tiernos de limón mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i> S.) de 3 – 4 cm.		
Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Flavonoides	(+) Flavanonas	(+)
Leucoantocianos	(+)	(-)
Antocianinas	(+)	(-)
Saponinas	(-)	(-)
Taninos	(+) pirogálicos	(+)
Triterpenos	(+)	(+)
Esteroles	(+)	(+)

Tabla 6. Pruebas Fitoquímicas de los extractos de los brotes tiernos de naranja dulce de 1-2 cm.

Extracto de brotes tiernos de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) de 1 – 2 cm		
Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Flavonoides	(- /+)	(+)
Leucoantocianos	(+)	(-)
Antocianinas	(+)	(-)
Saponinas	(-)	(-)
Taninos	(+) pirogálicos	(+)
Triterpenos	(-)	(+)
Esteroles	(-)	(+)

Tabla 7. Pruebas Fitoquímicas de los extractos de los brotes tiernos de naranja de 3-4 cm.

Extracto de brotes tiernos de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) de 3 – 4 cm		
Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Flavonoides	(+) Flavonas	(+)
Leucoantocianos	(+)	(-)
Antocianinas	(+)	(-)
Saponinas	(-)	(-)
Taninos	(+) pirogálicos	(+)
Triterpenos	(-)	(+)
Esteroles	(-)	(+)

Tabla 8. Pruebas Fitoquímicas de extractos de brotes tiernos de toronja de 1-2 cm.

Extracto de brotes tiernos de toronja de 1 – 2 cm		
Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Flavonoides	(+) Flavanonas	(+)
Leucoantocianos	(+)	(-)
Antocianinas	(+)	(-)
Saponinas	(+)	(-)
Taninos	(- /+)	(- /+)
Triterpenos	(-)	(-)
Esteroles	(-)	(-)

Tabla 9. Pruebas Fitoquímicas de extractos de brotes tiernos de toronja de 3-4 cm.

Extracto de brotes tiernos de toronja de 3 – 4 cm		
Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Flavonoides	(+) Flavanonas	(+)
Leucoantocianos	(+)	(-)
Antocianinas	(+)	(-)
Saponinas	(+)	(-)
Taninos	(- /+)	(- /+)
Triterpenos	(-)	(-)
Esteroles	(-)	(-)

Resultados de la Cuantificación de Fenoles Totales

Los resultados del contenido de fenoles totales de los extractos analizados se muestran en la figura 13 y fueron los siguientes: El extracto de los brotes de naranja de 1-2 cm mostró el mayor contenido de fenoles totales, correspondiendo este valor a 3.24 mg/mL, equivalentes de ácido gálico (EQAG); mientras que en el extracto de los brotes de naranja de 3-4 cm, el contenido total de fenoles fue de 2.0 mg/mL EQAG.

La cantidad de fenoles totales en el extracto de los brotes de toronja de 1-2 cm presentó un valor de 2.99 mg/mL EQAG; y en el extracto de los brotes de toronja de 3-4 cm el valor obtenido fue 2.47 mg/mL EQAG.

Los valores obtenidos en la cuantificación de fenoles para el extracto de limón mexicano de 1-2 cm fue de 1.28 mg/mL EQAG y el extracto de limón mexicano de 3-4 cm, tuvo un valor de 1.65 mg/mL EQAG. El contenido de fenoles totales en los extractos de brotes de limón mexicano fue menor en ambos tamaños de brotes en comparación con los extractos de naranja y toronja.

Los extractos de toronja presentaron un contenido de fenoles totales alto pero no presentaron presencia de los metabolitos secundarios triterpenos y esteroides, en comparación de los otros extractos estudiados.

Los extractos de limón mexicano de 3-4 cm presentaron mayor diversidad en metabolitos secundarios, como: flavonoides, leucoantocianos, antocianinas, taninos, triterpenos y esteroides, sin embargo, el contenido de fenoles totales fue menor.

Los resultados en el análisis de los cromatogramas en los brotes tiernos de naranja, limón y toronja, mostró mayor abundancia de compuestos volátiles emitidos por los brotes de naranja, le sigue en orden de abundancia los brotes de toronja y en los brotes de limón, el número de compuestos emitidos es menor que en los otros dos cítricos. El resultado de la cuantificación de fenoles en los brotes de limón, también mostró un contenido menor, expresado en mg/ml EQAG.

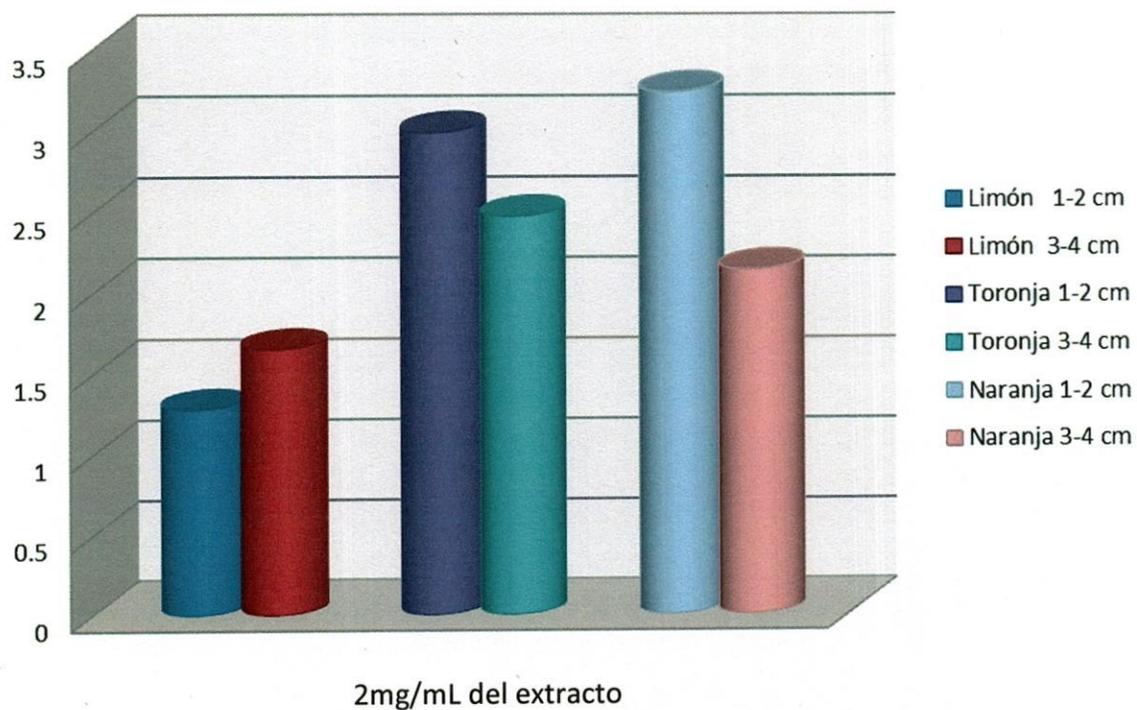


Figura 13. Cuantificación de fenoles totales de los extractos de brotes tiernos de limón mexicano, naranja y toronja; expresados en mg/mL EQAG.

Resultados de Bioensayos de Confirmación de Actividad Biológica

Bioensayo en Túnel de Viento

En la evaluación de la atracción del psílido *Diaphorina citri* hacia las plantas frescas de limón, naranja y toronja en el túnel de viento, se obtuvieron los siguientes resultados:

- ✓ Experimento 1, la exposición del psílido *D. citri* a hojas frescas de limón mostró que más de la mitad de los insectos 8 de los 12 psílicos (67%) fueron atraídos por el aroma de las hojas de limón.
- ✓ Experimento 2, el psílido *D. citri* al ser expuesto a las hojas frescas de naranja, mostró una mayor preferencia; los psílicos atraídos fueron 10 de 12 (83%).
- ✓ En el experimento 3, la atracción del psílido *D. citri* a las hojas de toronja fue de 67%, es decir fueron atraídos 8 de los 12 psílicos.
- ✓ Experimento control, la atracción de *D. citri* a las hojas de ruda fue negativa, es decir, de los 12 psílicos incluidos en el ensayo, ninguno mostró atracción o preferencia por las hojas tiernas de esta planta.

Todos los ensayos se repitieron dos veces y los psílicos no se utilizaron más de una vez en los ensayos.

Los resultados del bioensayo en túnel de viento mostraron que el psílido *Diaphorina citri* es atraído preferentemente a las hojas de la planta de naranja, en comparación con las hojas de limón y toronja. El bioensayo en túnel de viento llevado a cabo con hojas tiernas de ruda (*Ruta graveolens*), usada como control, no mostró atracción para el psílido *D. citri*; a pesar de que esta planta pertenece a la familia Rutaceae al igual que los cítricos naranja, limón y toronja. Esto demuestra que no todas las rutáceas son buenos hospederos para *D. citri*; además, que aún en el género *Citrus* hay diferencias que el psílido es capaz de detectar.

Es también importante considerar en el diseño de bioensayos que el *psílido D. citri* tiene una forma muy característica de alimentarse de la planta, de tal manera que se posa sobre las hojas de ésta formando un ángulo de 45° que le permite succionar la sabia de la planta de una manera continua, si esta condición no puede ser alcanzada en los bioensayos, la dificultad para realizarlos aumenta, aun cuando se le den algunas otras condiciones de acuerdo a su naturaleza o comportamiento.

Bioensayo en Olfatómetro

En el bioensayo llevado a cabo con psílicos adultos y extractos de naranja, limón y toronja en el olfatómetro de doble elección utilizando discos fluorescentes de color verde (trampas), se obtuvieron los siguientes resultados:

- ✓ **Comparación de los extractos de los brotes de naranja y control:** se adhirieron 8 de 12 insectos a la trampa de color del extracto de naranja y 0 insectos en el control (agua o ruda). Los insectos restantes se quedaron en la cámara cilíndrica, es decir no mostraron ninguna preferencia por el extracto.
- ✓ **Comparación de los extractos de los brotes de limón y control:** se adhirieron 2 de 12 insectos a la trampa de color del extracto de limón y 0 insectos al control. De los insectos restantes 2 se encontraban en el tubo del olfatómetro que contenía el extracto, siendo atraídos por el aroma de éste. Los psílicos restantes no mostraron atracción y permanecieron en la cámara cilíndrica.
- ✓ **Comparación de los extractos de los brotes de toronja y control:** se adhirieron 1 de 12 insectos a la trampa de color de los extractos de los brotes de toronja y 0 insectos al control. Los insectos restantes se encontraban en la superficie de la cámara cilíndrica, es decir, en donde había mayor iluminación.
- ✓ **Comparación de los extractos de los brotes de naranja y los extractos de los brotes de limón:** se adhirieron 4 insectos a la trampa de color del extracto de los brotes de naranja y 0 insectos en el extracto de los brotes de limón. Los insectos restantes estaban en el tubo del extracto de los brotes de naranja pero

no alcanzaron a adherirse a la trampa de color, durante el tiempo que duró el bioensayo.

- ✓ **Comparación de los extractos de los brotes de naranja y los extractos de los brotes de toronja:** se adhirieron 6 insectos a la trampa de color del extracto de los brotes de naranja y 0 insectos en el extracto de los brotes de toronja. Los insectos restantes estaban dirigiéndose o más próximos al tubo que contenía el extracto de los brotes de naranja.

Los resultados finales mostraron una mayor atracción del psílido hacia el extracto de los brotes de naranja en la evaluación olfatométrica. En el túnel de viento se observaron resultados similares, es decir la mayor preferencia del psílido fue hacia la planta de naranja.

CONCLUSIONES

La caracterización de los compuestos volátiles de los tres cítricos mostró una amplia variedad de metabolitos secundarios. En los brotes tiernos de naranja se observó mayor número de compuestos volátiles, en comparación con los extractos de los cítricos limón y toronja.

En el análisis fitoquímico de los cítricos se encontró que los extractos de brotes tiernos de limón y naranja de 1-2cm y 3-4cm, ambos tamaños tuvieron diferencias de compuestos presentes, lo que indica una diversidad de compuestos en los tamaños de los brotes.

Los extractos de los cítricos analizados poseen un contenido de compuestos fenólicos significativo. Los extractos de los brotes de naranja de 1-2cm presentaron la mayor concentración de fenoles totales, seguido por los extractos de toronja y finalmente los de limón, la menor concentración.

El psílido mostró preferencia por las plantas frescas de naranja en el bioensayo en túnel de viento; el resultado fue similar con el extracto de naranja en el olfatómetro de doble elección. En los otros dos cítricos la atracción fue menor. Esto se relaciona con la composición volátil y de compuestos fenólicos de los brotes de naranja.

Se concluye que el insecto se guía en la selección de hospedero, al menos por dos tipos de estímulos, los visuales y los olfativos, por lo tanto, el color del brote tierno y su composición química podrían actuar como señales químicas de atracción para *Diaphorina citri*.

El planteamiento de estrategias para el manejo integrado de esta plaga deberá hacerse en base al comportamiento del insecto hacia los dos tipos de estímulos: el visual y el olfativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta M, González M, Araque M, Velazco M, Khourt N, Rojas L, Usubillaga A. 2003. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurenscens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. Rev. Fac. Farm. 45(1):19-24.
- Arthur CL, Pawliszyn J. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Anal. Chem. 62(1): 2145-2148.
- Baker TC, Carde RT. 1984. Technique for behavioral bioassays. in: techniques in pheromone. entom. 45- 73.
- Bernays EA. 2000. Plant insect interactions. A synthesis abstr. Book I. XXI Int. Congr. Entom. Brazil. Plenary Lectures VIII-XIII.
- Beaulieu JC, Lea JM. 2006. Characterization and semiquantitative analysis of volatiles in seedless watermelon varieties using solid-phase microextraction. J. Agric. Food Chem. 54(1): 7789-7793.
- Bové J. 2006. Huanglongbing a destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. J. Plant Path. 88(1): 7-37.
- Blum MS. 1981. Chemical defenses of arthropods. Acad. Press. 562.
- Bruneton J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª Edición. Acribia, Zaragoza.
- Camarena G. 2009. Señales en la interacción planta insecto. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. 15(1): 81-85
- Chen J, Pu X, Deng X, Liu S, Civerolo E. 2009. A phytoplasma related to *Candidatus phytoplasma asteri* detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in guandong. Phytopathol. 99(1): 236-242.
- Clark TJ, Bunch JE. 1997. Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-mass spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 45 (1): 844-849.
- Corella MA, Harris K, Fu AA, Martínez MA, Valenzuela EM, Gálvez JC, Vargas I. 2011. Volatiles emitted by *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch as a prelude for

- semiochemical investigations to focus on *acrobasis nuxvorella nuenzig* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest management science*. 67 (12): 1522-1527.
- Da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 109-136.
- Da Graca J.V, Korsten. 2004. Etiology, history and world situation of citrus huanglongbing. *Rev. Phytopathol.*
- Da Graca JV, Korsten L. 2005. Citrus huanglongbing: review, present status and future strategies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 230-244
- Da Graca J.V. 2008. Biology, history and world status of Huanglongbing. *Memorias del taller internacional sobre el huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos.* Hermosillo, Son.
- Davies F., Albrigo L. 1999. Cítricos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- De Albuquerque E.M.R. 2000. Tamizaje farmacológico y tamizaje fitoquímico. Programa iberoamericano de ciencias y tecnología para el desarrollo. 195-204.
- Deng X, Peng J, Luo B. Wei M. 2004. A direct quantitative analysis method for monitoring biogenic volatile organic compounds released from leaves of *Pelargonium hortorum* in situ. *Anal. Chem.* 380(1): 950-957
- De Moraes CM, Lewis WJ, Pare PW, Alborn HT, Tumlinson JH. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393 (1): 570-573.
- Dicke M, Sabelis MW. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Func. Ecol.* 2(1):131-139.
- Ding F, Wang G, Yi G, Zhong Y, Zeng J, Zhou B. 2005. Infection of wampee and lemon by the citrus huanglongbing pathogen (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in China. *J. plant path.* 87(3): 207-212.
- Domínguez, X. 1988. Métodos de investigación fitoquímica .Limusa. México DF, México.
- [FAOSTAT] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. Rango de países en el mundo, por producto.
- Farnsworth KD, Focardi S, Beecham JA. 2002. Grassland herbivore interactions: how do grazers coexist?. *American Naturalist* 159(1):24-39.
- Finch S. 1986. Assessing host-plant finding by insects. In: *insect-plant interactions.* entom. 23 - 63.

- Gómez HD. 2009. Huanglongbing (HBL) and nutrient deficiency symptoms. Citrus Health Response Program.
- González S, Estarrón M, Gómez JF, Andrade I. 2009. Effect of the temperature on the spray drying of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Plant Foods for Human Nutrition*. 64(1):62-67.
- González S, Estrada A, Del Val R, Rosales T, Andrade I, Hernández A. 2010. Determinación de compuestos volátiles en noni (*Morinda citrifolia* L.) mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases. Memoria del VI Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos, A.C. Acapulco, Guerrero, México. pp: 1-6.
- Gutierrez MC, Droguet M. 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (U.PC.)* 122: 36-38
- Gutiérrez DM, Ortiz CA, Mendoza A. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidantes en malezas usadas para alimentación animal. Universidad Autónoma de Querétaro, Simposio de metrología.
- Grigonis D., Venskutonis P.R., Sivik B., Sandahl M., Eskilsson C.S. 2005. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidant from sweet grass (*Hierochloa odorata*). *J. Supercritical Fluids*. Vol. (33): 223-233.
- Halbert S, Manjunath L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entom.* 87(3): 330-352
- Hall D.G. 2009. An assessment of yellow sticky card traps as indicators of the relative abundance of adult *Diaphorina citri* in citrus. *J. Econ. Entom.* 102(1):446-452.
- Halitschke R, Stenberg JA, Kessler D, Kessler A, Baldwin IT. 2008. Shared signals 'alarm calls' from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. *Ecology Letters* 11(1): 24-34.
- Harborne JB, Williams C. 2000. Flavonoids, advances in research since 1992. *Phytochem.* 55(1): 481-504.

- Hare J.D. 1998. Bioassay methods with terrestrial invertebrates. In: Methods in chemical ecology. Kluwer Academic Publishers. 2: 212-270.
- Heath J.J., Williams R.N., Phelan P.L. 2001. High light intensity: a critical factor in the wind-tunnel flight of two scarabs, the rose chafer and Japanese beetle. *Journal Chem. Ecol.* 27(1): 419-429.
- Henaó J, Muñoz L, Ríos E, Padilla L, Girardo G. 2009. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* h.b.k. Cultivada en el departamento del Quindío. *Rev. Invest. Univ. Quindío* 19:159-164
- Jawwad A, Rogers M, Hall D, Philip A, 2009. Incidence of Invasive *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and Its Introduced Parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Florida Citrus. *Horticultura Entom.* 102 (1): 247-256.
- Kataoka H, Lord HL., Pawliszyn J. 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Review. J. Chromatogr. A.* 880: 35-62.
- Lock O. 1994. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales". Pontificia universidad católica del Perú.
- López-Arroyo JI, Peña MA, Rocha A, Loera J. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). *Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología*, pp.68
- Marín C., Céspedes C. 2007. Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications. *Rev. Fitotec.* 30(4): 327-351.
- Martínez M.A. 2005. Flavonoides. Universidad de Antioquia.
- Martínez S., González J., Culebras M., Tuñón J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria.* 6: 271-278.
- Martínez J., Suárez A., Valenzuela J. 2011. Manejo Regional del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (hemíptera: psyllidae) management in southern Sonora, México. 20 simposio nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México.
- Mareggiani G. 1996. Semiochemicals: the role of allomones and kairomones in natural crop protection. *Biocontrol.* 2(1):65-70.

- Mareggiani G. 2001. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. Manejo integrado de plagas. 60(1): 22-30.
- Mestres M, Martí MP, Miracle M, Sala C, Busto O, Guasch J. 2000. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis de aroma en vinos. Técnicas de laboratorio. 251: 289-295.
- Orozco SS. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México, Universidad Autónoma Chapingo, México. pp.150.
- Palomino O. 2001. Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).
- Pawliszyn J. 1997. Solid Phase Microextraction: theory and practice. Wiley-VCH.
- Pillonel L, Bosset JO, Tabacchi R. 2002. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 35: 1-14.
- Reineccius GA. 2007. Flavour isolation techniques. in: flavours and fragrances .Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Berger, R.G. (Ed.). Springer. Germany. pp: 409-426
- Robbins R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J. agric.food chem. 51(1): 2866-2887
- Rogers ME, Stansly PA, Stelinski L. 2009. Florida citrus pest management guide: Asian Citrus Psyllidae and Citrus Leafminer. University of Florida. 726-734.
- Rubinson J.F. y Rubinson K.A. 2001. Análisis Instrumental. Editorial Prentice Hall.
- Sagaram US, DeAngelis K, Trivedi GL, Andersen S, Lu E, Wang. 2009. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Gene Clone Library Sequencing. Applied and Environmental Microbiology. 75(1): 1566-1574.
- Salcedo D, Hinojosa G, Covarrubias I, DePaolis F, Cintora C. Mora S. 2010. Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HBL) en la cadena citrícola mexicana. pp.144.

- Setamou FM, French D, Hall V. 2008. Dispersion Patterns and Sampling Plans for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Citrus. *J. econ. entomo.* 101(4): 1478-1487
- [SAGARPA] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2008. Programa de trabajo de la Campaña de Prevención de la introducción de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos a operar con recursos 2008 del componente de Sanidad de Inocuidad del Programa de Soporte.
- [SAGARPA] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2009. Situación Fitosanitaria de la Citricultura en México.
- [SAGARPA] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2010. Programa de trabajo de la campaña contra el Huanglongbing de los Cítricos, a operar con recursos del subcomponente de Sanidad Vegetal del Programa de Soporte 2010, en el estado de Sonora.
- Texeira DC, Ayres EW, Kitajima L, Danet S, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C, Bové JM. 2005. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil and association of a new *Liberibacter* species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. San Paulo, Brasil.
- Trujillo AJ. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. 2° Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido Asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.
- Ulrich S, Martens J. 1997. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective method for the assay of antidepressant drug in human plasma. *J. Chromatogr.* 696(1): 217-234
- [USDA] Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. 2010. Huanglongbing o dragón amarillo de los cítricos.
- Vermerris W, Nicholson R. 2006. Phenolic compound biochemistry. Ed. Springer.
- Wenninger EJ, Stelinski LL, Hall DG. (2009) Roles of Olfactory Cues, Visual Cues, and Mating Status in Orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to Four Different Host Plants. *Environ. Entomol.* 38(1): 225-234.

- Wilkes JG, Conte ED, Yongkyoung K, Holcomb M, Sutherland JB, Miller DW. 2000. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. A review. *J. Chromatogr.* 880(1): 3-33.
- Yang X, Peppard T. 1994. Solid phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.* 42(1): 1925-1930.
- Zhang Z, Yang MJ, Pawliszyn J. 1994. Solid phase microextraction. *Anal. Chem.* 66(1): 844-853.

ANEXOS

Anexo 1. Muestreo de material vegetal

1. Los árboles que se seleccionarán serán aquellos en inicio de brotación (Los brotes deberán ser brotes nuevos tiernos, de preferencia de árboles jóvenes).

2. No se cortará solo el brote, se deberá cortar un trozo de vareta o tallo, para evitar la liberación y pérdida de volátiles.

3. El tamaño del brote será de 1-4 cm, si el brote es más pequeño, que 1 cm, se incluirá en el lote de 1 cm para el estudio.

No todos los cítricos inician la brotación al mismo tiempo; para el estudio se requieren brotes de limón mexicano, naranja dulce y toronja, por lo que habrá que observar y registrar el período de brotación de cada cítrico.

4. Como los brotes estarán en crecimiento se tendrá que observar diariamente cómo va el desarrollo del mismo, esto nos indicará la frecuencia del muestreo, es decir si al principio del muestreo la inspección se lleva a cabo con una diferencia entre cada muestreo de 3-4 días o si podemos esperar mayor tiempo para obtener la muestra, de esta manera para el siguiente período de brotación ya quedará establecido el tiempo de recolección de la muestra, sobre todo en aquellos cítricos que tienen varios períodos de brotación en el año.

5. Los árboles seleccionados para el muestreo deberán cubrir el perímetro del área a muestrear seleccionada, que son los que reciben más luz y son los que brotarán primero, puede hacerse un muestreo interior por hileras espaciadas de acuerdo al área de la huerta; además se deberá identificar el árbol con una cinta de color para facilitar su localización posterior, como se muestra en la figura.



6. La cantidad de muestra deberá ser como mínimo 250 gr de brotes; lo que indica que el número de varetitas recolectadas será mayor que la cantidad mencionada.
7. Se recolectarán en bolsas de papel y de ahí estas mismas bolsas se meterán en otra bolsa de plástico con todo y varetas, para transportarse, si es posible en hielera equipada con gel refrigerante o hielo.
8. Etiquetar debidamente las muestras, esto incluye. Ejemplo:



9. De preferencia las muestras deberán ser de árboles no infectados o con infestación mínima. Si no se puede, indicar el grado de infestación.

Anexo 2. Muestreo del Insecto Adulto

Los insectos de *Diaphorina citri* se buscan principalmente en los brotes tiernos de los árboles de los cítricos; pueden ser capturados por medio de un aspirador, se succiona con cuidado para no dañar al insecto.

Aspirador: es un dispositivo de gran utilidad, diseñado principalmente para el muestreo de insectos muy pequeños. Consiste de un tubo (Plástico o de vidrio), un tubo de succión y una manguera. La manguera y el tubo de succión están insertados en una tapa de goma, cuya función es succionar los insectos al interior de éste.



Anexo 3. Cuantificación de Fenoles Totales.

Método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado para la cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales.

Reactivos:

Agua destilada

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)

Ácido Gálico

Procedimiento:

- 1.- Tomar 120 μL de muestra y disolver en 900 μL de agua destilada.
- 2.- Agregar 240 μL de Folin-Ciocalteu
- 3.- Agregar 360 μL de Carbonato de Na al 20%
- 4.- Aforar a 3mL con agua destilada (1380 μL)
- 5.- Mezclar
- 6.- Incubar 2 hrs.
- 7.- Leer a 760 nm.
- 8.- Los resultados se expresan mg/mL EQAG (Equivalentes de ácido gálico)

Curva de Calibración de Ácido Gálico

