



Mecanismos de resistencia química ofrecidos por el limón al ataque de *Ceratitís capitata*

Salvatore, A.¹; S. Borkosky²; E. Willink¹ y A. Bardón².

Palabras clave: Glándulas de aceite, componentes volátiles, toxicidad, resistencia.

INTRODUCCIÓN

Los cítricos son considerados por muchos autores como malos hospederos para las moscas de los frutos. Estudios en campo permitieron proponer al limonero (*Citrus limon* (L.) Burman) como especie prácticamente inmune al ataque de la mosca del Mediterráneo, *Ceratitís capitata* (Wiedemann), (Quayle, 1914; Bodenheimer, 1951), llegando incluso a cuestionarse su condición de hospedero.

Back y Pemberton (1915) sugirieron que la resistencia ofrecida por los cítricos estaba relacionada, entre otras causas, a diversos componentes de las glándulas de aceite esencial presentes en la cáscara (albedo y flabedo). Estas, al romperse liberan compuestos tóxicos para los huevos y larvas de los primeros estadios. Los principales responsables de la mortalidad observada son los componentes volátiles, especialmente los monoterpenoides oxigenados, como el citral (Greany *et al.*, 1983). En el caso de los limones, la mayor toxicidad estaría relacionada a una mayor concentración de dichos compuestos. No hay estudios que evalúen la toxicidad de otros compuestos también presentes en la cáscara.

Se observó también que la susceptibilidad de los cítricos al ataque de *C. capitata* varía de acuer-

do al grado de senescencia de los frutos y a la especie frutal; siendo posible el desarrollo en limones sobremaduros (Quayle, 1914). Aún no hay estudios que permitan explicar la disminución de la resistencia ofrecida.

El presente trabajo tuvo como principales objetivos identificar la presencia de compuestos tóxicos en el aceite esencial de las glándulas de la cáscara del limón y analizar el efecto del tiempo de estacionamiento poscosecha en la resistencia que ofrece esta fruta al ataque de *C. capitata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La toxicidad de los compuestos presentes en el aceite esencial de las glándulas de la cáscara de limón, se evaluó mediante bioensayos sobre huevos y larvas extrayendo el aceite con diferentes solventes. Además, se evaluó la mortalidad de huevos y larvas con el extracto de aceite esencial de la cáscara del limón con mayor efecto biocida obtenido a partir de limones con diferentes días de estacionamiento. Posteriormente se determinó la composición porcentual de ciertos compuestos y su fluctuación a medida que pasaban los días de poscosecha. Finalmente, se adicionaron algunos de dichos compuestos a

¹Centro de Investigaciones Cuarentenarias, Sección Zoología Agrícola, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC). William Cross 3150, 4101, Las Talitas, Tucumán Argentina. E-mail: arsalvatore@eeaoc.org.ar

²Instituto de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad nacional de Tucumán Ayacucho 471, 4000, Tucumán, Argentina.

los extractos obtenidos de limones con distintas fechas de estacionamiento y se determinó el agente causal de la mortalidad larvária.

Extracciones

Para extraer el aceite esencial de la cáscara de limón se utilizaron dos metodologías. En la primera se obtuvieron dos fracciones mediante arrastre de vapor: una fracción soluble y una insoluble. Para ello, se extrajo la cáscara de un kilo de frutos recién cosechados, se la cortó en trozos pequeños y colocó en un destilador durante dos horas y media, recuperándose aceite y agua. Se separó el aceite del agua con éter etílico monodestilado y sales de sulfato de sodio anhidro, logrando separar las dos fases, agua - aceite más éter etílico; esta última mezcla se colocó en un rotavapor para separar el aceite del solvente, colocándose el mismo en un frasco con sales de sulfato de sodio anhidro hasta completar la deshidratación y así se conservó en el freezer. En el otro caso, las extracciones se realizaron mediante arrastre con solventes de polaridad decreciente (exano, acetato de etilo y metanol), obteniéndose tres fases, una correspondiente a cada solvente. Para ello, se cosechó un kilogramo de frutos, se ralló la cáscara y se la colocó en exano por una semana. Cumplido el tiempo, se filtró la maceración, y por un lado, se recuperó el exano de la maceración por rotavapor y la fracción extraída se conservó a -20 °C. Por otro lado, se tomó la maceración y se la colocó en campana de desecación durante 3 horas para permitir la evaporación de los vestigios de exano que hubiesen quedado. Luego se la colocó con acetato de etilo y se dejó macerar una semana. Cumplido este tiempo, se filtró el producto, se recuperó el solvente y se lo conservó. Por último, se utilizó metanol para agotar la muestra, separando las sustancias químicas de mayor peso molecular, siguiendo el mismo procedimiento.

Bioensayos

Una vez obtenidas las distintas extracciones se procedió a evaluar la actividad biológica de cada una de ellas, impregnando rebanadas de limones y colocando huevos con 24 horas de desarrollo embrionario sobre las mismas. Se trabajó con una concen-

tración de 250 ppm. en los diferentes extractos. Las rebanadas se colocaron individualmente en cajas de Petri tapadas con papel film perforado, las cuales se llevaron a desecador por 30 minutos para evaporar el solvente. En cada rebanada se sembraron 20 huevos. El testigo fue tratado sólo con el solvente, sembrándose también 20 huevos por rebanada. Las rebanadas con huevos se incubaron a 25 °C durante seis días, para favorecer el desarrollo embrionario y larvario. Pasado ese tiempo, se revisaron las rebanadas bajo microscopio estereoscópico y, con la ayuda de alfileres entomológicos, se contó el número de huevos en los cuales no emergieron larvas, el número de coriones (i.e. huevos de los que emergieron larvas) y las larvas vivas y muertas. Cada rebanada de limón se tomó como una repetición, realizándose diez repeticiones para cada extracto y cinco repeticiones para el testigo.

Efecto del estacionamiento de los frutos en la toxicidad del aceite esencial

Para determinar el efecto del poder larvívora del extracto etéreo de limones con diferentes tiempos de estacionamiento desde la cosecha, se cosecharon limones y se los estacionaron a 25 °C. Semanalmente y durante dos meses, se realizaron extracciones y con la fracción soluble se procedió a evaluar la toxicidad mediante bioensayos con el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Identificación de los compuestos responsables de la toxicidad

Con el interés de determinar cuál o cuáles de los constituyentes que componen el aceite esencial son biológicamente activos en relación a la mortalidad de huevos y larvas, se procedió a realizar un análisis con espectrometría de GC-MASA de las fracciones solubles extraídas en limones con distintos tiempos de estacionamiento. De esta forma se identificaron distintos compuestos, se estimó la concentración de cada uno de ellos y se determinó la fluctuación en función del tiempo de estacionamiento poscosecha. Posteriormente se realizaron extracciones en limones con distintos tiempos de estacionamiento poscosecha y se les adicionaron compuestos presentes en el aceite esencial para determinar si ello lograba recuperar la toxicidad observada en los extractos de limones recién cosechados.

Análisis de datos

Las variables analizadas fueron viabilidad de huevos y mortalidad de larvas. La primera se calculó como el número de huevos de los que emergieron larvas dividido el total de huevos sembrados por rebanada (es decir 20). La mortalidad de larvas se estimó como el número de larvas muertas dividido el total de larvas presentes por rebanada. El efecto de las distintas fracciones sobre ambas variables fue analizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA resultó significativo las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Tukey. Para cumplir con el supuesto de homogeneidad de varianza, se transformaron los datos mediante la raíz del arcoseno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los distintos extractos de las glándulas de aceite esencial sobre eclosión y viabilidad larvaria.

En la Tabla 1 se presenta la viabilidad de huevos y la mortalidad de larvas de *C. capitata* causada por los diferentes extractos del aceite esencial del limón y el testigo. En ambos casos se encontraron diferencias significativas entre los distintos extractos y el control ($F = 8,20$; $gl = 5$; $P < 0,0001$ para viabilidad de huevos y $F = 80,3$; $gl = 5$; $P < 0,0001$ para mortalidad de larvas). Si bien ambos estados de desarrollo fueron sensibles a los distintos extractos, la mortalidad fue mucho mayor en larvas, llegando a superar en la fracción soluble el 95%.

Viabilidad de huevos y mortalidad larvaria según el tiempo de estacionamiento poscosecha de los limones.

Cuando se evaluó la mortalidad en huevos y larvas en la fracción soluble de limones con distintos tiempos de estacionamiento poscosecha se observó que el efecto tóxico sobre las larvas

disminuía a medida que transcurría el tiempo de estacionamiento poscosecha (Tabla 2, Fig 1). Los extractos realizados en limones recién cosechados mostraron una mortalidad de larvas de un 98,1 % mientras que los extractos de limones con siete semanas de estacionamiento poscosecha mostraron una mortalidad de larvas de un 22,5 %, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($F = 189,5$; $gl = 8$; $P < 0,0001$).

Fluctuación de los distintos compuestos presentes en el aceite esencial del limón en función del tiempo de estacionamiento poscosecha de los frutos.

Se observó que ciertos compuestos disminuían a medida que pasaba el tiempo (Tabla 3). El neral, geranial y las cumarinas llegaron a valores menores al 50% de la concentración inicial (Fig. 2), mientras que los otros compuestos no disminuyeron en forma tan pronunciada. A su vez, se pudo ver que esta disminución se dio principalmente entre la primera y la segunda semana de estacionamiento.

Análisis y confirmación de los compuestos responsables de la mortalidad larvaria

Para confirmar si el neral, el geranial y la cumarina eran los responsables de la mortalidad observada en las larvas, se realizaron extracciones a limones con distintas fechas de estacionamiento, se les adicionó cumarina y citral (mezcla natural de los isómeros neral + geranial) y se evaluó la toxicidad mediante bioensayos como los realizados anteriormente. En vistas del potencial efecto sinérgico del linalol, se evaluó también el efecto de este compuesto junto con la cumarina. La adición de los compuestos recuperó la capacidad larvicida de los extractos en limones con más de dos semanas de poscosecha (Tabla 4). Asimismo, el linalol potenció el efecto de las cumarinas.

Tabla 1: Efecto de los distintos extractos del aceite de la glándula esencial de limón sobre la viabilidad de huevos y larvas de *C. capitata*.

| Extracto | Viabilidad huevos (%) | Mortalidad larvaria (%) |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|
| Acetato de etilo | 85,50 ± 1,57 a | 93,08 ± 1,84 c |
| Exano | 84,00 ± 1,63 a | 71,18 ± 6,60 b |
| Metanol | 85,00 ± 1,29 a | 94,11 ± 1,73 c |
| Fracción insoluble | 77,00 ± 3,67 a | 93,78 ± 2,12 c |
| Fracción soluble | 84,50 ± 2,03 a | 97,49 ± 1,68 c |
| Testigo | 94,00 ± 1,63 b | 2,64 ± 1,15 a |

Media ± error estándar. Para cada extracto se analizaron diez repeticiones con 20 huevos cada una de ellas. Los valores seguidos de una misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Prueba de Tukey, $P < 0,05$).

Tabla 2: Efecto del extracto etéreo de limones con distintos tiempos de estacionamiento poscosecha sobre la viabilidad de huevos y larvas de *C. capitata*.

| Estacionamiento (semanas) | Viabilidad huevos (%) | Mortalidad larvaria (%) |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 0 | 92,33 ± 1,45 ab | 98,95 ± 0,56 f |
| 1 | 93,33 ± 1,16 ab | 95,77 ± 1,38 f |
| 2 | 88,00 ± 1,36 a | 81,91 ± 2,44 e |
| 3 | 88,67 ± 2,21 a | 68,54 ± 2,42 d |
| 4 | 88,00 ± 2,06 a | 74,75 ± 2,30 de |
| 5 | 92,33 ± 0,67 ab | 61,66 ± 3,27 d |
| 6 | 90,33 ± 1,03 a | 36,18 ± 2,24 c |
| 7 | 90,33 ± 1,03 a | 22,50 ± 2,78 b |
| Testigo | 95,33 ± 1,14 b | 3,46 ± 1,21 a |

Media ± error estándar. Para cada extracto se analizaron diez repeticiones con 20 huevos cada una de ellas. Los valores seguidos de una misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Prueba de Tukey, P < 0,05).

Tabla 3: Constituyentes del aceite esencial del limón y sus concentraciones en limones con distintos tiempos de poscosecha.

| Compuesto | Semanas poscosecha | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| α -bergamoteno | 0,56 | 0,67 | 0,45 | 0,54 | 0,51 | 0,43 | 0,61 | 0,48 | |
| α -pineno | 1,02 | 0,92 | 1,16 | 1,03 | 1,31 | 1,42 | 1,08 | 1,30 | |
| α -terpinol | 0,33 | 0,36 | 0,24 | 0,28 | 0,27 | 0,25 | 0,30 | 0,25 | |
| β -bisaboleno | 0,71 | 0,84 | 0,52 | 0,63 | 0,61 | 0,51 | 0,79 | 0,60 | |
| β -mirceno | 0,97 | 0,97 | 0,98 | 1,01 | 1,01 | 0,98 | 0,95 | 0,96 | |
| β -pineno | 8,72 | 8,68 | 9,25 | 8,74 | 10,53 | 12,12 | 9,93 | 11,28 | |
| 3-careno | 8,43 | 8,34 | 7,42 | 7,88 | 8,28 | 8,35 | 9,05 | 8,24 | |
| Cariofileno | 0,36 | 0,37 | 0,22 | 0,28 | 0,28 | 0,24 | 0,36 | 0,24 | |
| Cumarina | 0,22 | 0,21 | 0,04 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,11 | 0,09 | |
| Geranial | 1,49 | 1,28 | 0,60 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,74 | 0,78 | |
| Geraniol | 0,09 | 0,16 | 0,06 | 0,10 | 0,09 | 0,07 | 0,14 | 0,08 | |
| Limoneno | 74,28 | 73,93 | 76,73 | 75,89 | 73,50 | 72,02 | 72,98 | 72,97 | |
| Linalol | 0,09 | 0,10 | 0,07 | 0,08 | 0,09 | 0,07 | 0,11 | 0,07 | |
| Neral | 1,11 | 0,90 | 0,47 | 0,59 | 0,63 | 0,59 | 0,54 | 0,63 | |
| Nerol | 0,45 | 0,62 | 0,41 | 0,48 | 0,45 | 0,40 | 0,66 | 0,45 | |

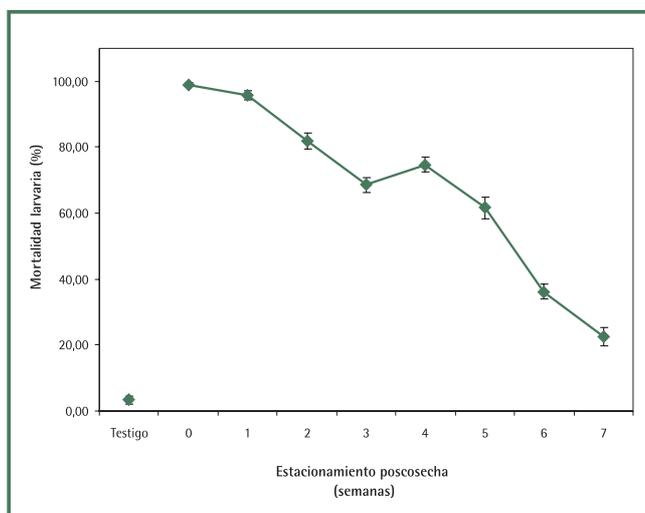


Figura 1: Mortalidad larvaria evaluada del extracto soluble del aceite de la glándula esencial de limones con distintos tiempos de estacionamiento poscosecha.

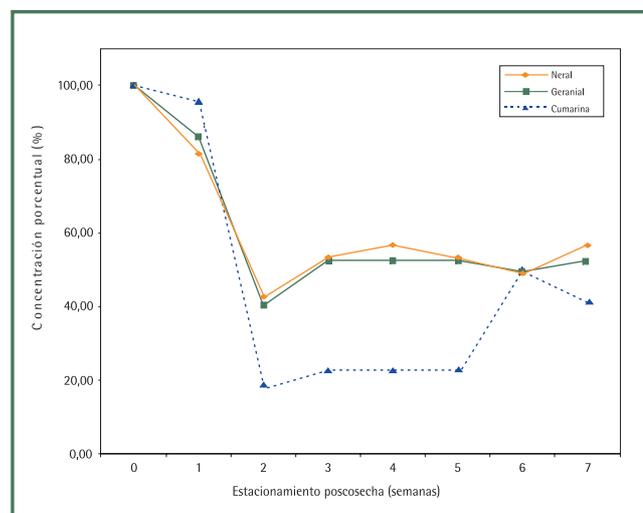


Figura 2: Concentración porcentual del neral, geranial y cumarina en el aceite de limones en función del tiempo de estacionamiento poscosecha.

Tabla 4. Efecto de la adición de distintos compuestos en el extracto etéreo de limones con distintos tiempos de estacionamiento poscosecha sobre la mortalidad larvaria de *Ceratitis capitata*.

| Estacionamiento (semanas) | Mortalidad larvaria (%) | | | | | |
|---------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|-----------------------------|-------------|
| | EE | EE + cumarina | EE + cumarina + linalol | EE + citral | EE + cumarina + citral (T5) | Testigo |
| 0 | 97,9 ± 0,7 aA | 96,2 ± 1,1 aA | 98,9 ± 0,6 aA | 95,3 ± 1,1 aA | 98,2 ± 0,6 aA | 3,3 ± 1,0 g |
| 1 | 95,8 ± 1,4 aA | 93,6 ± 1,8 aA | 97,5 ± 0,9 aA | 93,5 ± 1,4 aA | 96,5 ± 0,7 aA | 2,4 ± 0,7 g |
| 2 | 79,9 ± 2,7 bB | 93,0 ± 1,2 aA | 98,2 ± 1,0 aA | 93,1 ± 1,0 aA | 98,2 ± 0,6 aA | 2,8 ± 0,9 g |
| 3 | 63,9 ± 2,6 cD | 88,5 ± 1,9 aC | 98,2 ± 0,7 aA | 92,3 ± 1,8 aA | 98,5 ± 0,6 aA | 2,3 ± 0,9 g |
| 4 | 66,7 ± 2,2 cC | 78,6 ± 2,3 bB | 98,9 ± 0,6 aA | 93,8 ± 1,4 aA | 97,5 ± 0,6 aA | 2,7 ± 0,8 g |
| 5 | 50,9 ± 3,2 dC | 77,8 ± 2,1 bB | 98,6 ± 0,8 aA | 91,4 ± 1,9 aA | 97,2 ± 0,8 aA | 3,1 ± 0,7 g |
| 6 | 36,2 ± 2,2 eC | 68,6 ± 2,2 cB | 98,5 ± 0,8 aA | 92,9 ± 1,2 aA | 96,1 ± 1,3 aA | 3,1 ± 0,9 g |
| 7 | 20,5 ± 1,7 fC | 54,6 ± 2,3 dB | 97,2 ± 1,0 aA | 89,9 ± 1,3 aA | 95,6 ± 1,1 aA | 2,7 ± 0,8 g |

Media ± error estándar. Para cada extracto se analizaron 15 repeticiones con 20 huevos cada una de ellas.

EE: Extracto etéreo.

Los valores seguidos de una misma letra minúscula no difieren estadísticamente (Prueba de Tukey, $P < 0,05$). Las letras mayúsculas corresponden a las comparaciones múltiples realizadas para cada extracto.

Tomado de Salvatore, A., S. Borkosky, E. Willink and A. Bardón. 2004. Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitis capitata*. J. Chem Ecol. 30: 323-333.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo permiten concluir que:

1. Los componentes de la cáscara de limón tienen un efecto tóxico sobre huevos y larvas.
2. Este efecto es más fuerte en larvas que en huevos.
3. En los extractos de limones estacionados por varias semanas luego de la cosecha la mortalidad larvaria disminuye.
4. Ciertos aldehídos, como el citral (neral y geranial), y cumarinas disminuyen su concentración a medida que pasa el tiempo de estacionamiento de la fruta.
5. La adición de citral, cumarina y linalol recupera el efecto larvicida en extractos realizados en limones con varias semanas de poscosecha.
6. Estos compuestos son los agentes causales de la mortalidad en las larvas.

7. Lo expuesto demuestra que el limón presenta mecanismos naturales de resistencia química al ataque de *C. capitata*.

REFERENCIAS

- Back, E. A. y C. E. Pemberton. 1915.** Suceptibility of citrus fruits to the attack of the Mediterranean fruit fly. J. Agric. Res. 3: 311-330.
- Bodenheimer, F. S. 1951.** Citrus Entomology in the Middle East. W. Junk Pub. Co., The Hague: 102- 111.
- Greany, P. D.; S. C. Styer; P. L. Davis; P. E. Shaw and D. L. Chambers. 1983.** Biochemical resistance of citrus to fruit flies. Demonstration and elucidation of resistance to the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. Ent. Exp. Appl. 34: 40-50.
- Quayle, H. J. 1914.** Citrus fruit insects in Mediterranean countries. U. S. Dep. Agric. Bull: 134 p.
- Salvatore, A., S. Borkosky, E. Willink and A. Bardón. 2004.** Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitis capitata*. J. Chem Ecol. 30: 323-333.