



Artículo

Perfil GC/MS y actividad antifúngica de *Zanthoxylum caribaeum* Aceite esencial de Lam contra *Moniliophthora roreri* Cif y Par, un patógeno que infecta *Theobroma cacao* L. Cultivos en los Trópicos

Marcial Fuentes Estrada^{1,2}, Andrea Jimenez-Gonzalez³, Diannefair Duarte⁴, Rogério Saavedra Barreras, Carlos Areche⁶, Elena Stashenko⁵, Nayive Pino Benitez⁷, Daniela B. arcnas-Pmirez^{8,9}, Josémi Cheel^{10,*} y Olimpo García Beltrán^{2,10,*}



Citación: Fuentes-Estrada, M.; Jiménez-González, A.; Duarte, D.; Saavedra-Barrera, R.; Areche, C.; Stashenko, E.; Pino Benítez, N.; Bárcenas-Pérez, D.; Cheel, J.; García-Beltrán, O. Perfil GC/MS y actividad antifúngica de *Zanthoxylum caribaeum* Aceite esencial de Lam contra *Moniliophthora roreri* Cif y Par, un patógeno que infecta *Theobroma cacao* L. Cultivos en los Trópicos. *quimiosensores* **2023**, *11*, 447. <https://doi.org/10.3390/quimiosensores11080447>

Editores Académicos: Mariun Josémi Aliño-González, irene dominguez pmirez y Roberto Romero-Gonzalez

Recibido: 29 junio 2023
Revisado: 4 agosto 2023
Aceptado: 7 agosto 2023
Publicado: 10 agosto 2023



Derechos de autor: © 2023 por los autores. Licenciario MDPI, Basilea, Suiza. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- 1 Facultad de Agronomía, Universidad del Tolima, Altos de Santa Helena, Ibagumi 730006, Colombia; mafuentes@ut.edu.co
 - 2 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Ibagumi, Carrera 22 Calle 67, Ibagumi 730002, Colombia
 - 3 Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Altos de Santa Helena, Ibagumi 730006, Colombia; jajimenezg@ut.edu.co
 - 4 Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO)—Fondo Nacional del Cacao (FNC), San Vicente de Chucurí-Santander 270001, Colombia; diannefair.diannefair.duarte@fedecacao.com.co
 - 5 Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, CIBIMOL, Universidad Industrial de Santander, Edificio 45, UIS, Carrera 27, Calle 9, Bucaramanga 680002, Colombia; cenivam4@tucan.uis.edu.co (RS-B.); elena@tucan.uis.edu.co (ES)
 - 6 Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Nuñoa, Santiago 7800024, Chile; areche@uchile.cl
 - 7 Grupo de Productos Naturales, Facultad de Ciencias de la Educación, Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó 270001, Colombia; d-cruznayive.pino@utch.edu.co
 - 8 Laboratorio de Biotecnología de Algas—Centro ALGATECH, Instituto de Microbiología de la Academia Checa de Ciencias, Opatovický mlýn, 37981 Třeboň, República Checa
 - 9 Facultad de Ciencias, Universidad de Bohemia del Sur, Branišovská 1760, 37005 Česká Budějovice, República Checa
 - 10 Centro Integrativo de Biología y Química Aplicada (CIBQA), Universidad Bernardo O'Higgins, General Gana 1702, Santiago 8370854, Chile
- * Correspondencia: jcheel@alga.cz (JC); jose.garcia@unibague.edu.co (OG-B.)

Abstracto: Las especies *Zanthoxylum caribaeum* pertenece a la familia Rutaceae, de la que se conocen varios núcleos químicos, entre ellos los alcaloides y las cumarinas. Además, se ha caracterizado su aceite esencial, mostrando diferencias en composición y diversas actividades antimicrobianas. En el presente estudio, el aceite esencial de *Z. caribaeum* colectada en el departamento del Tolima, centro de Colombia, se caracterizó por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS). El aceite esencial presentó una composición de alrededor de 43 compuestos (entre mayores y menores), cuyos componentes principales, según su abundancia, son los siguientes: germacreno D (228,0 ± 1,6 mg/g EO), (*m*)-β-farneseno (128,0 ± 1,5 mg/g EO), β-elemeno (116,0 ± 1,6 mg/g EO) y (*m*)-nerolidol (74,0 ± 2,2 mg/g EO). Este aceite fue probado contra microorganismos que afectan la producción de cacao en Colombia y en países tropicales donde la producción de este producto básico es muy importante para la economía. Las pruebas antifúngicas se realizaron en las especies fúngicas *Moniliophthora roreri* y mostró una actividad prometedora y significativa, inhibiendo el crecimiento en más del 95 % en concentraciones de 50 μL/mL y 100 μL/mL. Esta notable actividad antifúngica podría deberse a la presencia de compuestos principales y secundarios que mejoran la actividad sinérgicamente.

Palabras clave: *Zanthoxylum caribaeum*; GC-EM; cacao; *Moniliophthora roreri*; antifúngico

1. Introducción

el género *Zanthoxylum* Pertenece a la familia de las Rutáceas. A nivel mundial se han descrito 250 especies, distribuidas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del planeta [1]. En Colombia se encuentra principalmente en la región andina, el Caribe y parte de la Amazonía [2]. Algunas especies pertenecientes a estos géneros han mostrado una variedad de actividades biológicas debido a su alto contenido de metabolitos secundarios que incluyen alcaloides, terpenos, lignanos, esteroides, cumarinas y flavonoides, como antiinflamatorio, anticancerígeno, antipalúdico, antioxidante, anti-VIH. y actividades antimicrobianas [3–8]. Estos metabolitos se distribuyen por toda la planta, pero se han encontrado en concentraciones más altas en la corteza, las raíces y las hojas.

Una de las plantas que se cultiva anualmente en Colombia es *Theobroma cacao* (cacao), una planta milenaria del continente americano [9,10] que ha adquirido gran importancia cultural, ambiental y económica. Pertenece a la familia Malvaceae, que incluye más de 22 especies, y se divide en cacao criollo, forastero y trinitario con diferentes propiedades físicas, químicas y funcionales. Los granos secos se obtienen de los frutos, y su calidad aromática y compositiva está determinada por factores como el origen, el procesamiento y la influencia del suelo y las condiciones climáticas [11,12]. Según algunos estudios, el cacao se originó en las cabeceras de la cuenca amazónica, y una población natural de cacao se extendió hacia el oeste y el norte en la parte central de la región Amazonas-Guayana, formando el grupo Forastero-Amazonas y el segundo grupo, denominado Criollo, que tiene buena aceptación en el mercado debido a sus altas cualidades organolépticas [13]. Actualmente, este árbol se cultiva comercialmente en Asia y Oceanía, América Central y del Sur y África, con una participación global de la producción del 12,5 %, 12,7 % y 74,8 %, respectivamente. La mayor parte del cacao para el comercio internacional se cultiva en África, con Cote d'Ivoire es el mayor productor y el cacao de Ghana es el de mayor calidad [14].

Los problemas fitosanitarios son los principales factores que han contribuido a la disminución de la producción de cacao y al deterioro de la calidad del producto final. Estas incluyen enfermedades causadas por hongos fitopatógenos [15]. Este problema se ha incrementado recientemente, favorecido por la falta de un manejo adecuado del cultivo y por los cambios ambientales provocados por el hombre [dieciséis]. Las principales enfermedades que afectan a la planta de cacao en Colombia son: Moniliasis, enfermedad causada por el hongo basidiomiceto *Moniliophthora roreri* (Cifra 1), que afecta alrededor del 40% de la producción anual de cacao en Colombia, con una producción total de 62.000 TM promediada en los últimos 5 años [17,18]. Tiene alta sobrevivencia en diferentes ambientes, con rápido crecimiento y diseminación, en general, los genotipos comerciales son altamente susceptibles a este patógeno. [19] y los métodos actuales de control de enfermedades son ineficientes y aumentan los costos de producción [20]. Esta situación amenaza la sustentabilidad de la producción nacional de este cultivo. Algunas condiciones fitosanitarias relacionadas con la zona agroecológica, la severidad del inóculo y el inadecuado manejo del cultivo favorecen el daño hasta en un 100% en una plantación, por lo que la enfermedad es considerada la más prevalente y severa.



Figura 1. Fruto de *Theobroma cacao* afectado por el hongo *Moniliophthora roreri*.

Los aceites esenciales (AE) tienen un potencial natural para los mecanismos de defensa de las plantas, son compuestos volátiles producidos por muchas especies y pueden actuar contra varios microorganismos patógenos de las plantas. [5]. Su uso se perfila como una alternativa sustentable para el control de enfermedades en la agricultura actual, donde las prácticas agrícolas permiten el uso de ciertas sustancias para combatir patógenos [6]. Los productos naturales como los aceites esenciales han surgido como un

alternativa “ambientalmente amigable” de uso tan efectivo como los agentes antimicrobianos porque son fáciles de obtener y tienen baja toxicidad para los organismos no objetivo. En este estudio aislamos el hongo *M. roseri*, agente causal de la enfermedad Moniliasis en plantaciones de cacao en Colombia y países tropicales. Se cultivó el microorganismo y se desarrollaron ensayos biológicos utilizando aceites esenciales extraídos de las hojas de *Z. caribaeum* como principio activo, obteniendo resultados prometedores para el desarrollo de bioproductos.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Las especies *Z. caribaeum* fue colectada en enero de 2022 en el municipio de Piedra, Departamento del Tolima-Colombia (4°28'57"N 74°59'17"W, altitud 593 msnm), las especies fueron colectadas por Andrea Jimenez-Gonzalez, Marcial Fuentes-Estrada and Olimpo Garcia-beltran, e identificado y clasificado por el botánico Hector Esquivel y un ejemplar en el Herbario TOLI de la Universidad del Tolima (Colombia) con comprobante número N°28543.

2.2. Extracción de Aceite Esencial

Z. caribaeum las muestras de hojas se limpiaron previamente. Los aceites esenciales de *Z. caribaeum* eran extraído de las hojas utilizando un sistema de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) como método de extracción [21]. La fuente de calor del sistema fue una fuente de radiación de microondas convencional (SAMSUNG, modelo MS23J5133AG, Malasia), configurada a 2450 MHz, 1,2 kW. Se mezclaron 750 g de material vegetal con 500 mL de agua destilada, el material vegetal, especialmente las hojas, se colocaron en un balón de reacción de 2 L. Luego, se realizó un programa de calentamiento; la primera etapa fue de 10 min al 100% de potencia para precalentamiento; la segunda etapa de 45 min de destilación al 80% de potencia. Una temperatura máxima de condensación de 13°C se mantuvo.

2.3. Análisis Cromatográfico

El aceite esencial extraído de *Z. caribaeum* (20 mg) se disolvió en CH₂Cl₂ (1 mL), y una alícuota de esta dilución (2 µL) se inyectó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas y un sistema de detección de llama.

El análisis se realizó con un cromatógrafo de gases, GC 6890 Plus (Agilent Technologies, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector de masa selectiva MS 5973 Network (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) usando ionización electrónica (IE, 70 eV). Helio (99,995%, gas AP, Messer, Bogotá, Colombia) como gas portador, con una presión inicial de entrada en cabeza de columna de 113,5 kPa; el caudal volumétrico del gas portador se mantuvo constante (1 mL/min) durante la ejecución cromatográfica. El modo de inyección se dividió (30:1) y la temperatura del inyector se mantuvo a 250°C.

Los compuestos se separaron en dos columnas capilares, una que contenía la fase estacionaria polar de poli (etilenglicol), PEG (DB-WAX, J & W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m × 0,25 mm (diámetro interior) × 0,25 µm y el otro con la fase estacionaria (sf) apolar 5%-fenil-poli(metilsiloxano), 5%-Ph-PDMS (DB-5MS, J & W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) con las mismas dimensiones. En la columna polar (DB-WAX) se programó la temperatura del horno de 50°C (5 min) a 150°C (7 min), a las 4°C/min, y luego a 230°C (50 min), a las 4°C/min. Se usaron las mismas condiciones para el análisis a través del sistema de detección de llama (GC/FID). En la columna apolar (DB-5MS) se programó la temperatura del horno cromatográfico de 45°C (5 min) a 150°C (2 min) a las 4°C/min, y luego a 300°C (10 min) a las 5°C/min. La temperatura de la línea de transferencia de GC/MS se fijó en 230°C cuando se usa la columna polar y 300°C para la columna no polar. Las temperaturas de la cámara de ionización y del cuadrupolo fueron de 250°C y 150°C, respectivamente. El rango de masas para la adquisición de corriente de iones fue *m/z* 45-450 u, con una velocidad de adquisición de 3,58 scan/s. Los datos se procesaron con el software MSDChemStation G1701DA (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.). Los parámetros de integración fueron los siguientes: umbral = 18 y "área de rechazo" del pico por encima de la línea de base inferior al 1%. Se identificaron compuestos

basado en índices de retención lineal (LRI) y comparación de masa obtenida experimentalmente espectros con los reportados en las bases de datos Adams 2007, NIST 2017 y Wiley 2008.

$$LR = (100 \times n) + 100 \times \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{enfermero} - t_{Rn}} \right] \quad (1)$$

donde: n es el número de átomos de carbono en la n-parafina que eluye antes que el compuesto de interés (su tiempo de retención es t_{Rx}); t_{Rn} y $t_{enfermero}$ son los tiempos de retención de las n-parafinas con el número de átomos de carbono n y N, respectivamente, eluyendo inmediatamente antes y después del analito de interés.

La cuantificación de compuestos se realizó con la estandarización externa por GC/FID. Las sustancias patrón se analizaron en las mismas condiciones cromatográficas que las *Z. caribe* EO. En el caso de que no se dispusiera de una sustancia de referencia, la cuantificación se realizó utilizando la curva de calibración obtenida para una molécula estructuralmente similar.

2.4. Actividad antimicrobiana

Se realizó actividad antimicrobiana in vitro contra el hongo *M. roleri*, que afecta la producción de granos de cacao en los países productores de cacao.

2.4.1. Aislamiento de *Moniliophthora roleri*

Para obtener el inóculo de *M. roleri*, los frutos infestados con síntomas y signos tempranos de formación de una mancha marrón oscura con micelio en la cáscara de la semilla de cacao (frutos) deben recolectarse en el campo.

Los frutos cosechados se lavaron y desinfectaron con hipoclorito al 1% durante dos minutos. Luego, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente estéril. Luego, los frutos desinfectados se segmentaron en porciones de 5 mm de diámetro (tejido endodérmico) en una cámara de flujo laminar y los segmentos de tejido se infestaron con *M. roleri* se colocaron en cajas de Petri que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) para incubar a 25 °C hasta que apareció crecimiento fúngico en las muestras para identificarlas por sus características macroscópicas y microscópicas, lo que se repitió hasta obtener cultivos puros.

2.4.2. Actividad antifúngica contra *Moniliophthora roleri*

Ensayo in vitro de la actividad antifúngica de *Z. caribae* aceites esenciales en *M. roleri* se realizó en condiciones controladas utilizando la técnica de envenenamiento [22,23], las concentraciones evaluadas en el ensayo fueron 5 µL, 10 µL, 50 µL, 100 µL y 495 µL y las pruebas se realizaron por triplicado. Después de la preparación del medio envenenado, se sembraron en el centro de las cajas que contenían los tratamientos, discos de micelio de 5 mm de diámetro de cultivos puros crecidos durante 7 a 10 días. Se utilizaron como control negativo cortes del patógeno en medio de agar PDA sin aceites esenciales. Oxidocloruro de cobre ($Cu_2(OH)_3Cl$), un fungicida comercial con actividad conocida sobre *M. roleri* se utilizó como control positivo. Las cajas de Petri se incubaron a 25 °C. Las placas se evaluaron diariamente midiendo su crecimiento radial en cm (Roque et al., 2001). La medición se completó cuando el micelio del patógeno cubrió por completo la placa de control negativo.

La inhibición del crecimiento micelial del patógeno se calcula como el porcentaje de crecimiento radial con respecto al control (Ecuación (2)).

$$\%Inhibición = \frac{(ENT - DT)}{ENT} \times 100 \quad (2)$$

dónde: ENT = Diámetro de control negativo, DT = Diámetro de tratamiento.

La medición deberá concluir cuando el micelio del patógeno cubra completamente la placa de tratamiento de control. La evaluación de la eficacia del producto se expresará como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando un diseño experimental de factor único con el software IBM SPSS versión 25.0 [24–26]. Este análisis se aplicó a los datos de medición biométrica in vitro obtenidos de la aplicación de *Z. caribaeum* aceite esencial, con 5 tratamientos (por triplicado) correspondientes a las dosis establecidas de 5 μ L (T1), 10 μ L (T2), 50 μ L (T3), 100 μ L (T4) y 495 μ L (T5). Además, se realizaron 2 tratamientos de control; *M. roreri* en PDA, el tratamiento 6 es solo PDA (T6) y un fungicida comercial, oxiclóruo de fósforo ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) como tratamiento 7 (T7).

Para demostrar la normalidad, la prueba de Shapiro-Wilk (SW) [27] se aplicó (*pag*-valor (prueba SW) > 0,05). Además, se aplicó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para detectar igualdad o diferencia entre al menos un par de medias de los tratamientos, y así se utilizó ANOVA de un solo factor para probar las diferencias específicas entre tratamientos mediante pruebas Post hoc (DSM o T2-Tamhane) aceptando diferencias significativas con un *pag*-valor < 0.05 [28,29].

3. Resultados y discusión

El aceite esencial de *Z. caribaeum* constaba de 43 compuestos, principalmente sesquiterpenos (67%), monoterpenos (18%), además, tres compuestos no identificados con *metrol* $\text{z}15215\text{H}$ (dieciséis O), 204 ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) y 220 ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$). Sin embargo, en este trabajo destacamos seis compuestos principales que tienen una proporción superior al 5%, entre ellos tres sesquiterpenos, germacreno D ($228,0 \pm 1,6$ mg/g EO), (*MJ*)- β -farneseno ($128,0 \pm 1,5$ mg/g EO), β -elemeno ($116,0 \pm 1,6$ mg/g EO), un monoterpeno, limoneno ($73,0 \pm 1,9$ mg/g EO) y un monoterpeno oxigenado, (*m*)-nerolidol ($74,0 \pm 2,2$ mg/g EO). (Mesa 1, Cifra 2). Comparando la composición y abundancia de metabolitos de aceites esenciales en este estudio con los informados en la literatura [30–32], quedó claro que la concentración de germacreno D en aceite esencial de *Z. caribaeum* fue mayor en los individuos utilizados en este estudio.

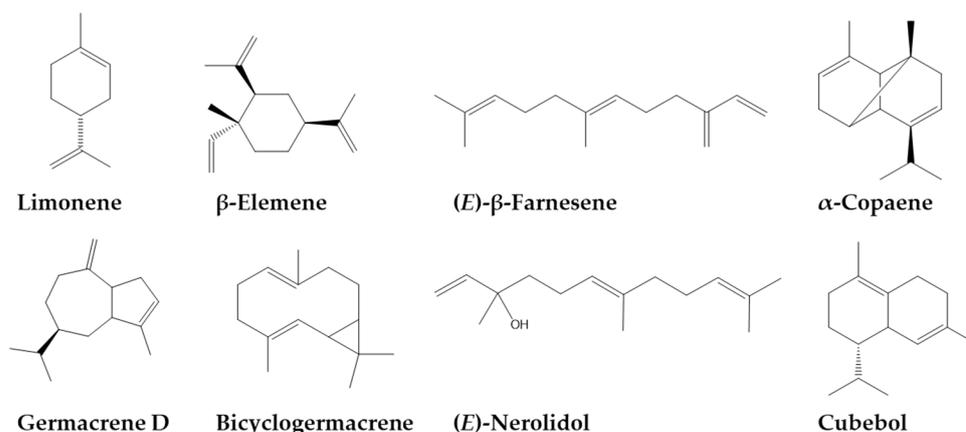


Figura 2. Componentes principales de *Zanthoxylum caribaeum* aceites esenciales.

Con el fin de obtener datos confiables y verificados, se realizaron dos estudios cromatográficos utilizando dos columnas capilares, la primera con un DB-5MS es una columna de polímero de fenil arileno polar con 5% de fase estacionaria de fenil-poli(metilsiloxano), este tipo de columna tiene una excelente desempeño con su relación señal/ruido, muy importante para el desarrollo de aplicaciones analíticas, además, muestra alta sensibilidad e integridad espectral de masas. El segundo con una columna DB-WAX de alta polaridad con fase estacionaria de poli (etilenglicol), el uso de esta columna permite su uso en aplicaciones de alimentos, fragancias y sabores. Su uso a bajas temperaturas muestra una excelente resolución de principios activos de bajo punto de ebullición. Los cromatogramas obtenidos de ambas columnas mostraron los mismos componentes con diferentes tasas, 1; Cifra 3).

Tabla 1. Caracterización química vía GC/FID y GC/MS del aceite esencial destilado de *Z. caribe*.

Pico N ^o	Compuesto	Índices de retención lineal				% Área, GC-FID DB-5MS	mg Compuesto/g OE, Valor \pm sk x			
		DB-5 (no polar)		DB-WAX (polar)			\pm	x	\pm	x
		Exp.Lit.	Exp.Lit.	Exp.Lit.	Exp.Lit.					
1	(Z)-hex-3-en-1-ola, b, d	855	856 [33]	1383	1380 [33]	0.3	3.7	\pm	0.12	
2	(m)-hex-2-en-1-ola, b, d	865	864 [33]	1404	1399 [33]	0.2	2.9	\pm	0.13	
3	Hexan-1-ola, b, d	869	869 [33]	1351	1351 [33]	0.3	3.2	\pm	0.13	
4	α -tujenoa,b,e	926	927 [33]	1022	1026 [33]	0.2	1.64	\pm	0.09	
5	α -pinenoa B C	934	936 [33]	1017	1025 [33]	0.2	2.1	\pm	0.10	
6	sabinenoa B C	974	973 [33]	1118	1122 [33]	0.3	3.54	\pm	0.08	
7	β -mircenoa B C	989	988 [34]	1162	1160 [33]	2.2	32	\pm	2.40	
8	α -terpinenoa B C	1018	1017 [33]	1177	1177 [33]	0.3	3.3	\pm	0.15	
9	pag-cimenoa B C	1026	1024 [33]	1270	1270 [33]	1.5	13.6	\pm	0.27	
10	limonenoa B C	1032	1029 [33]	1199	1198 [33]	9.3	73	\pm	1.9	
11	β -felandrenoa, b, f	1034	1030 [33]	1207	1209 [33]	1.4	14.0	\pm	0.17	
12	(m)- β -ocimenoa,b,g	1047	1047 [33]	1251	1250 [33]	1.2	17	\pm	2.5	
13	γ -terpinenoa B C	1060	1059 [35]	1244	1245 [33]	1.4	13.9	\pm	0.13	
14	Linalola B C	1100	1099 [33]	1546	1543 [33]	0.6	6.01	\pm	0.07	
15	4,8-dimetil-1,3,7-nonatrienoa,b,g	1113	1116 [AA]	1306	1306 [AA]	0.2	2.33	\pm	0.08	
dieciséis	Terpinen-4-ola,b,c,h	1185	1177 [AA]	1605	1601 [33]	0.2	2.39	\pm	0.07	
17	NI M+•metrol/z15215HdieciséisO)a, b, h	1201	-	-	-	0.3	3.19	\pm	0.07	
18	(m, m)-2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ola, b, h	1209	1209 [AA]	1820	1830 [AA]	1.4	14.73	\pm	0.09	
19	(Z)-Ocimenonaa, b, h	1233	1226 [34]	1698	1697 [AA]	0.5	5.58	\pm	0.07	
20	(m)-Ocimenonaa, b, h	1241	1235 [34]	1718	1718 [AA]	0.3	3.62	\pm	0.07	
21	α -cubebenoun, b, yo	1349	1351 [33]	1459	1460 [33]	0.7	7	\pm	1.4	
22	α -copaenoun, b, yo	1380	1376 [33]	1495	1491 [33]	3.0	27	\pm	1.5	
23	NI M+•metrol/z20415H24)un, b, yo	1385	-	1581	-	0.6	6	\pm	1.4	
24	β -Elemenoun, b, yo	1395	1390 [33]	1594	1590 [33]	13.4	116	\pm	1.6	
25	β -Ylangenoun, b, yo	1426	1421 [33]	1577	1576 [33]	0.7	7	\pm	1.4	
26	(m)- β -cariofilenoa B C	1429	1420 [33]	1601	1598 [33]	0.3	3.26	\pm	0.08	
27	(m)- α -bergamotenoun, b, yo	1438	1434 [33]	1587	1579 [AA]	1.3	12	\pm	1.5	
28	(m)- β -farnesenoun, b, yo	1457	1455 [33]	1669	1663 [33]	14.8	128	\pm	1.5	
29	α -humulenoa, b, c, yo	1465	1453 [33]	1674	1666 [33]	0.3	2.81	\pm	0.08	
30	aloaromadendrenoun, b, yo	1469	1460 [AA]	1649	1649 [33]	0.2	1.70	\pm	0.08	
31	Germacreno Da, b, c, yo	1492	1480 [33]	1718	1710 [33]	26.4	228	\pm	1.6	
32	biciclogermacrenoun, b, yo	1504	1499 [34]	1737	1734 [33]	3.3	29	\pm	1.4	
33	Cubebola, b, j	1524	1514 [34]	1941	1941 [33]	1.6	24	\pm	2.3	
34	δ -cadinenoun, b, yo	1524	1523 [33]	1758	1755 [33]	2.3	21	\pm	1.5	
35	Elemola, b, j	1554	1547 [34]	2078	2078 [33]	0.4	4.37	\pm	0.07	
36	(E)-nerolidola,b,c,j	1564	1560 [33]	2040	2036 [33]	6.2	74	\pm	2.2	
37	espatulenola, b, j	1585	1576 [33]	2122	2126 [33]	0.3	3.01	\pm	0.06	
38	Germacreno D-4-ola, b, j	1585	1574 [33]	2049	2056 [33]	0.6	7.21	\pm	0.07	
39	(E)-Hidrato de sesquisabinenoa, b, j	1585	1583 [33]	2084	2092 [33]	0.5	5.42	\pm	0.07	
40	Ledola, b, j	1615	1601 [34]	2029	2039 [33]	0.2	1.89	\pm	0.07	
41	NI M+•metrol/z22015H24O)a, b, j	1649	-	-	-	0.6	6.67	\pm	0.08	
42	α -Cadinol	1664	1652 [34]	2229	2227 [33]	0.1	1.66	\pm	0.07	
43	Fitolun, b, yo	2107	2102 [36]	-	2613 [33]	0.1	1.42	\pm	0.08	

aIdentificación tentativa basada en índices de retención lineal medidos con DB5 (no polar) y DB-WAX (polar) columnas [33–36]. bIdentificación tentativa basada en espectros de masas (MS; ionización de electrones, 70 eV, >95 % de coincidencia), estudio de patrones de fragmentación y comparación con espectros de MS del NIST (2017), Adams (2007) [34] y Wiley (2008) [37] bases de datos espectrales. cIdentificación confirmatoria basada en sustancias estándar por comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención (tr) con los de los componentes EO. NI no identificado. dCuantificación en oct-1-en-3-ol equivalentes. micuantificación en equivalentes de α -pineno. fCuantificación en equivalentes de α -terpineno. gramocuantificación en equivalentes de β -mirceno. hCuantificación en equivalentes de linalol. icuantificación en (m)equivalentes de β -cariofileno. jCuantificación en (Z)equivalentes de γ -nerolidol, ver calibración curva (Tabla de material complementario S1). kSx, desviación estándar calculada para n=3 utilizando el error estándar residual en la calibración.

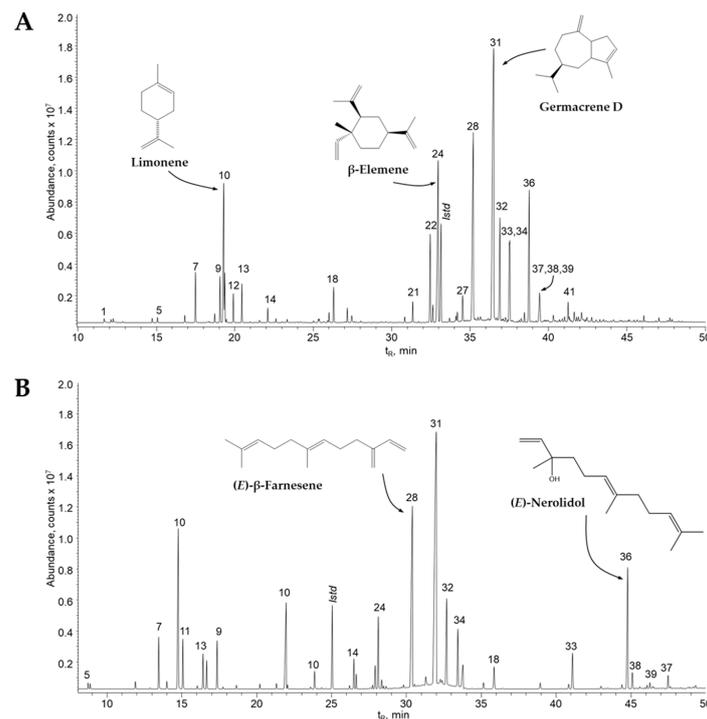


Figura 3.Perfiles cromatográficos del aceite esencial destilado de *Z. caribaeum* obtenidos por GC/MS (barrido completo). (A) columna DB-5MS (60 m), inyección dividida 1:30, MSD (EI, 70 eV); (B) Columna DB-WAX (60 m), inyección dividida 1:30, MSD (EI, 70 eV).

La inhibición del crecimiento micelial se determinó macroscópicamente colocando un fragmento de la colonia fúngica en una placa de Petri que contenía PDA suplementado con diferentes diluciones de aceite esencial (5, 10, 50, 50, 100 a 496 $\mu\text{L}/\text{mL}$), control negativo (PDA sin tratamiento) y control positivo (oxicloruro de cobre); cada ensayo se realizó por triplicado. El crecimiento del micelio se determinó midiendo el diámetro de la colonia (cm) durante 7 días y se determinó su porcentaje de inhibición (Tabla 2). Al calcular el porcentaje de inhibición, se evidencia que el aceite esencial de *Z. caribaeum* está activo; presenta una alta inhibición del crecimiento de *M. rozeri* a bajas concentraciones de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, que inhibe el 88,3%. Es notoria la relación concentración/porcentaje de inhibición, observándose una proporcionalidad con el aumento de la concentración a 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, determinando que se alcanzó una inhibición del 96% del crecimiento del hongo. Esto determina que las concentraciones oscilan entre 10 y 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ son prometedores para el desarrollo futuro de bioproductos que involucran aceites esenciales con un perfil químico comparable.

Tabla 2. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y valores de inhibición porcentual por tratamiento.

Tratos	% inhibición	GR * (cm/día)	Shapiro-Wilk		
			\bar{X}	gl	Sig.
T1 (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	28.27	0.75	1.76	3	0.342
T2 (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	88.29	0.25	0.97	3	0.917
T3 (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	95.99	0.05	0.20	3	0.391
T4 (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	98.96	0.033	0.04	3	0.000
T5 (496 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	100.00	0.00	0.00	3	0.000
T6 (control -) PDA	0.00	0.83	2.63	3	0.000
T7 (control +) Oxicloruro de fósforo ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$)	100.00	0.00	0.00	3	0.000

* Tasa de crecimiento por día; T1-T7 = Tratamientos; \bar{X} = Significar; gl = Reproducibilidad; Sig. = *pag*-valor < 0,05.

La prueba estadística realizada muestra que los datos son normales (Figura de material complementario S1), determinada por el p -valor mayor que 0,05, por lo tanto la hipótesis nula no se rechaza ($p > 0,05$), pero se acepta que la muestra sigue una distribución normal para los demás datos. Para elegir el mejor tratamiento, una comparación múltiple entre tratamientos, para lo cual se utilizó la prueba de Tamhane (Tabla de Suplemento S2), debido a que los datos analizados no mostraron homogeneidad entre varianzas. Esto demostró que T5 tiene diferencias significativas en comparación con los otros tratamientos, este sería el de mayor grado de inhibición, ya que produce un diámetro promedio de crecimiento de 0.04667 cm menor que T4, siendo este último el segundo mejor de tratamiento en términos de inhibición del fitopatógeno. En cuanto a los demás tratamientos que presentaron diferencias significativas, se consideró a T6 y T7 como tratamientos control (Cuadro 2). Los ensayos antifúngicos mostraron una inhibición de la actividad de *M. roleri* por el tratamiento T2 (10 μ L/mL); sin embargo, la actividad de los aceites esenciales fue más estable en el tratamiento T4 (100 μ L/mL) durante el período de estudio (7 días) (Figura 4).

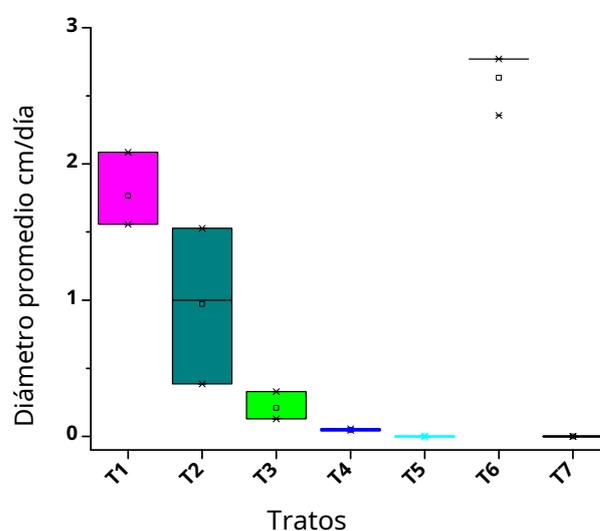


Figura 4. Diagrama de caja comparativo de crecimiento biométrico en el día 7 entre tratamientos evaluados contra *M. roleri*.

Los principales compuestos de *Z. caribaeum* son germacreno D, (*m*)- β -farneseno, (*m*)-nerolidol y bicyclgermacreno. Sin embargo, cabe señalar que los compuestos (*m*)- β -farneseno, (*m*)-nerolidol y bicyclgermacrene son componentes de aceites esenciales que exhiben actividad antimicrobiana, pero tal actividad no se les puede atribuir [39]. Estudios han evaluado el efecto inhibitorio del aceite esencial (AE) de *Z. armatum* sobre el hongo filamentoso *Aspergillus flavus*. El aceite esencial mostró una composición química donde sus compuestos mayoritarios fueron linalool (41,73%), D-limoneno (13,24%), β -felandreno (7,53%), transnerolidol (6,30%) y terpinen-4-ol (5,33%). Cuando se evaluó el aceite, mostró una disminución en el crecimiento radial de *A. flavus* también cuando se realizó un estudio microscópico se observó que el micelio se redujo considerablemente, así como el número de colonias a temperatura ambiente [40]. Por el contrario, llama la atención la alta concentración de germacreno D, y cabe señalar que existe una relación directa entre la presencia de esta sustancia y la actividad antifúngica. Varios estudios han demostrado actividad antifúngica en diferentes grupos de hongos. Un ejemplo de ello son los aceites esenciales ricos en germacreno extraídos de especies como *artemisa campestris*, que han mostrado actividad antifúngica in vitro contra *Fusarium graminearum*, que ataca cultivos como el arroz, la avena y el maíz [40]. También se ha demostrado que inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos, incluidos varios *fusarium* especies, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* [41–43]. En *Glechone* especies, se ha constatado la capacidad antifúngica frente a hongos de interés humano como *Candida*, y el aceite extraído tiene en común que el germacreno D es uno de sus principales componentes [44]. En *Buddleja perfoliata* y *Pelargonium graveolens* especies, el aceite esencial extraído mostró una

actividad tífungica contra diversos hongos que afectan la poscosecha de las plantas. En particular, este aceite mostró una amplia actividad contra las cepas de *Aspergillus amylovorus*, *A. flavus*, un nombre, un ostiano, *Eurotium halophilicum*, *Eupenicillum hirayamae*, *Penicillium cinnamopurpureum* y *P. viridicatum* variedad yo [45].

4. Conclusiones

En el aceite esencial de *Z. caribaeum*, se identificaron los principales compuestos, principalmente moléculas de germacreno D ($228.0 \pm 1,6$ mg/g EO), (*MI*)- β -farneseno ($128,0 \pm 1,5$ mg/g EO), β -elemeno ($116,0 \pm 1,6$ mg/g EO) y (*mi*)-nerolidol ($74,0 \pm 2,2$ mg/g EO) en su composición química. El aceite esencial fue probado contra el basidiomiceto *M. roreri*, un hongo que afecta la producción de cacao a nivel mundial y por lo tanto tiene un impacto particular en la economía familiar. Los resultados muestran un potencial prometedor de este aceite en concentraciones entre 50 μ L/mL y 100 μ L/mL, donde mostró un porcentaje de inhibición del 96% y 99%, respectivamente, concentraciones suficientes para mantener bajo control el crecimiento del hongo. Además, cabe señalar que, aunque se encontraron cuatro compuestos principales, el germacreno D es la sustancia a la que se le atribuye una actividad antifúngica del 26,4 % en base a los antecedentes mostrados. Los otros tres compuestos se encontraron en aceites que mostraban actividad antimicrobiana; sin embargo, sus concentraciones no son apreciables, pero se puede especular que su efecto combinado potencia la actividad antimicrobiana. Este es un paso hacia el desarrollo de bioproductos para el control fitosanitario sostenible de los microorganismos que infestan los cultivos de cacao.

Materiales complementarios: La siguiente información de apoyo se puede descargar en: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/chemosensors11080447/s1>, Tabla S1: Curvas de calibración para la cuantificación de compuestos en *Z. caribaeum* aceite esencial; Tabla S2: Análisis descriptivo del crecimiento de *M. roreri* en las diferentes concentraciones de aceite esencial de *Z. caribaeum*; Figura S1: Diagrama QQ normal del diámetro medio de crecimiento de *M. roreri* tratada con aceites esenciales de *Z. caribaeum*.

Contribuciones de autor: Conceptualización, MF-E., AJ-G., CA, ES, NPB y OG-B.; metodología, DD, MF-E., RS-B. y OG-B.; validación, CA, ES, NPB, JC, DB-P. y OG-B., curación de datos, RS-B. y MF-E.; escritura: MF-E., AJ-G., OG-B.; redacción—revisión y edición, OG-B., CA, JC y DB-P.; administración de proyectos, ES, NPB y OG-B.; adquisición de fondos, ES, NPB y OG-B. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Fondos: ES, NPB y OG-B., gracias al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (Minciencias), Ministerio de Educación, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, Programa Ecosistema Cienti yoco—Centro Colombiano yoca, del Francisco José mi Fondo de Caldas (Concesión RC-FP44842-212-2018). Autoridad Nacional de Licenciamiento Ambiental de Colombia apoyó a la Universidad de Ibaguá. Permiso Marco para la Colecta de Especímenes de Especies de Especies Silvestres de Especímenes Biológicos de Especies Silvestres de Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones (Resolución N° 01003-2019). Los financiadores no estuvieron involucrados en los aspectos técnicos del desarrollo de la investigación y CA, Gran FONDECYT REGULAR 1230414 de Chile.

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: No aplica.

Declaración de consentimiento informado: No aplica.

Declaración de disponibilidad de datos: Los autores pueden compartir los conjuntos de datos obtenidos en este estudio previa solicitud y en términos razonables y buenos.

Expresiones de gratitud: Los autores agradecen a Héctor Esquivel por la identificación de la especie *Z. caribaeum* FEDECACAO por permitir realizar los trabajos de actividad biológica en sus instalaciones del municipio de San Vicente de Chucuri (Santander-Colombia) y CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflicto de intereses. Los patrocinadores de financiación no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio; en la recolección, análisis, interpretación de datos; en la redacción del manuscrito y en la decisión de publicar los resultados.

Referencias

1. Appelhans, MS; Reichelt, N.; Groppo, M.; Paetzold, C.; Wen, J. Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeny and biogeography of the pantropical genus *Zanthoxylum* sus parientes más cercanos en el grupo proto-Rutaceae (Rutaceae). *mol. Filogeneta. Evol.* **2018**, *126*, 31–44. [Referencia cruzada] [PubMed]
2. De, P.; rutáceas, ZL; Rivas-arancibia, SP Patrones de distribución del género *Zanthoxylum* L. (Rutaceae) en México. *Rev. Méx. Biodiversos.* **2013**, *84*, 1179–1188. [Referencia cruzada]
3. Syowai, E.; Kimutai, F.; Mbandi, E.; Nyongesa, E.; Ochieng, W.; Nanjala, C.; Njambi, C.; Kirega, M.; Muguci, M.; Wahiti, R.; et al. Usos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos del género pantropical *Zanthoxylum* L. (Rutaceae): Una actualización de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. *J. Etnofarmacol.* **2023**, *303*, 115895. [Referencia cruzada]
4. Bronceado, MA; Sharma, N. Alcaloides fito-carbazoles de la familia Rutaceae como posibles agentes protectores contra enfermedades neurodegenerativas. *Antioxidantes* **2022**, *11*, 493. [Referencia cruzada] [PubMed]
5. Xia, R.; Zhou, Q.; Zhou, Q.; Xie, Y.; Kan, A.; Zhou, Z.; Lv, X.; Liu, L. Fitoterapia (\pm)-Zanthonitidumines A y B: dos nuevos enantiómeros de alcaloides de benzofenantridina de *Zanthoxylum nitidum* su actividad antiinflamatoria. *Fitoterapia* **2023**, *164*, 105362. [Referencia cruzada]
6. Qin, F.; Wang, F.; Wang, C.; Chen, Y.; Li, M.; Zhu, Y.; Huang, X.; Ventilador, C.; Wang, H. Fitoterapia Los efectos neurotróficos y antineuroinflamatorios de los fenilpropanoides de *Zanthoxylum nitidum* variedad *tomentosum* (rutáceas). *Fitoterapia* **2021**, *153*, 104990. [Referencia cruzada]
7. Kerubo, L.; Nchiozem-ngnitedem, V.; Guefack, MF South African Journal of Botany Actividades antibacterianas de trece compuestos naturales de dos plantas medicinales de Kenia: *Zanthoxylum paracanthum* (Mildbr.) Kokwaro (Rutaceae) y *Dracaena usambarensis* (Asparagaceae) contra fenotipos MDR. *S.Afr. J. Bot.* **2022**, *151*, 756–762. [Referencia cruzada]
8. Wang, Z.; Zhou, Y.; Shi, X.; Xia, X.; Ey, Z.; Zhu, Y.; Xie, T.; Liu, T.; Xu, X.; Luo, X. Food Bioscience Comparación de componentes químicos en diversas hierbas *Zanthoxylum* y evaluación de su actividad antibacteriana y nematocida relativa. *Alimentos Biosci.* **2021**, *42*, 101206. [Referencia cruzada]
9. Rusconi, M.; Conti, A. *Theobroma cacao* L., El Alimento de los Dioses: Una aproximación científica más allá de mitos y afirmaciones. *Farmacol. Res.* **2010**, *61*, 5–13. [Referencia cruzada]
10. Dillinger, TL; Barriga, P.; Esca, S.; Jiménez, M.; Lowe, DS; Grivetti, LE Chocolate: La ciencia moderna investiga una antigua medicina Alimento de los dioses: ¿cura para la humanidad? Una historia cultural del uso medicinal y ritual del chocolate 1. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2057–2072. [Referencia cruzada]
11. P. mirez-Vicente, L. *Moniliophthora roreri* HC Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: Impacto, síntomas, diagnóstico y manejo. *Rev. Protección verduras* **2018**, *33*, 1–13.
12. de Brito, ES; Garcia, PNH; Hielao, MI; Cortelazzo, AL; Feveiro, PS; Braga, MR Cambios estructurales y químicos en el cacao (*Theobroma cacao* L.) durante la fermentación, secado y tostado. *J. Ciencia. Alimentación Agrícola* **2001**, *288*, 281–288. [Referencia cruzada]
13. Bari, V.; Cihat, N.; Akyil, S.; Said, O. Trends in Food Science & Technology Bebidas a base de cacao: composición, valor nutricional, procesamiento, problemas de calidad y nuevas perspectivas. *Tendencias Ciencias de la alimentación. Tecnología* **2023**, *132*, 65–75. [Referencia cruzada]
14. Swaray, R. Reducción de existencias reguladoras de productos básicos: el papel de la Organización Internacional del Cacao en los precios y los ingresos. *J. Modelo de Política.* **2011**, *33*, 361–369. [Referencia cruzada]
15. Hebbar, PK et al. Enfermedades del cacao: amenazas importantes para la producción de chocolate en todo el mundo Enfermedades del cacao: una perspectiva global desde el punto de vista de la industria. 1997.
16. Cubillos, G. Frosty Pod Rot, enfermedad que afecta al cacao (*Theobroma cacao*) cultivos en Colombia. *Cultivo. prot.* **2017**, *96*, 77–82. [Referencia cruzada]
17. Hütz-Adams, F.; Campos, P.; fuente, aire acondicionado *Barometro del cacao Base de referencia para latinoamericano*; Consorcio del Barometro del Cacao. 2022.
18. Wuellins, D. *Cadena del Valor del Cacao*; FONTAGRO: Washington, DC, EE. UU., 2019; ISBN 9789942364654.
19. Correa Álvarez, J.; castro martinez, S.; Coy, J. Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronomica* **2014**, *63*, 388–399. [Referencia cruzada]
20. Guillermo, J.; Gil, R. P. mieconomía de rdaómicas asociadas a la pudricion de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., en la hacienda Theobroma, Colombia. *Reverendo De Protección verduras* **2016**, *31*, 42–49.
21. Manrique-moreno, M.; Klais-luna, MC; Stashenko, E.; Zafra, G.; Ortiz, C. Efecto de los aceites esenciales sobre la inhibición del crecimiento, la formación de biopelículas y la integridad de la membrana de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *antibióticos* **2021**, *10*, 1474.
22. Palumbo, JD; Keeffe, TLO Método para la detección de actividad antifúngica de alto rendimiento de bibliotecas de cepas bacterianas. *J. Microbiol. Métodos* **2021**, *189*, 106311. [Referencia cruzada]
23. Garnier, L.; Salas, ML; Pinón, N.; Wiernasz, N.; Pawtowski, A.; Cotón, E.; Mounier, J.; Valence, F. Nota técnica: método de alto rendimiento para la detección de actividad antifúngica en un modelo que imita el queso. *J. Ciencias de la leche* **2018**, *101*, 4971–4976. [Referencia cruzada]
24. Hornby, BD; Bateman, GL; Payne, RW; Brown, ME Pruebas de campo de bacterias y fungicidas aplicados al suelo como agentes de control para llevar todo en el trigo de invierno. *Ana. aplicación Biol.* **1993**, *122*, 253–270. [Referencia cruzada]
25. Nguyen, TTH; Dinh, MH; Chi, HT; Wang, SL; Nguyen, QV; Tran, TD; Nguyen, AD Actividad antioxidante y citotóxica de líquenes recolectados en el Parque Nacional Bidoup Nui Ba, Vietnam. *Res. química Intermedio* **2019**, *45*, 33–49. [Referencia cruzada]
26. Maric, M.; de Haan, E.; Huizenga, HM ScienceDirect Evaluación de la importancia estadística y clínica de los efectos de la intervención en diseños experimentales de caso único: un método SPSS para analizar datos univariados. *Comportamiento El r.* **2015**, *46*, 230–241. [Referencia cruzada]

27. Liang, J.; Tang, M.; Chan, PS Una estadística generalizada de Shapiro-Wilk W para pruebas de alta dimensión. *computar Estadística Análisis de datos*. **2009**, *53*, 3883–3891. [Referencia cruzada]
28. Sesaaazi, CD; Pedro, EL; Mtewa, AG Los efectos antinociceptivos del extracto etanólico de partes aéreas de *Schkuhria pinnata* en ratones. *J. Etnofarmacol.* **2021**, *271*, 113913. [Referencia cruzada]
29. Shirani, M.; Savabi, O.; Mosharraf, R. Comparación de translucidez y opalescencia entre diferentes cerámicas monolíticas dentales. *J. Prótesis. Mella*. **2021**, *126*, 446.e1–446.e6. [Referencia cruzada]
30. Nogueira, J.; Iutoao, SC; Dolabela, IB *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) aceite esencial: Investigación química y efectos biológicos sobre la ninfa de *Rhodnius prolixus*. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 4271–4279. [Referencia cruzada]
31. Farouil, L.; Días, RP; Popotte-Julisson, G.; Bibián, G.; Adou, AI; de Mata, AP; Silvestre, M.; Harynuk, JJ; Cebri, G. El Perfil Metabolómico del Aceite Esencial de *Zanthoxylum caribaeum* (sin. *quiloperona*) Cultivo en Guadalupe FWI usando GC × GC-TOFMS. *Metabolitos* **2022**, *12*, 1293. [Referencia cruzada]
32. de Lara de Souza, JG; Toledo, AG; Walerius, AH; Jann Favreto, Washington; da Costa, WF; da Silva Pinto, FG Composición Química, Actividad Antimicrobiana, Repelente y Antioxidante del Aceite Esencial de *Zanthoxylum caribaeum*. *Justicia. J. Esencia. Oso de aceite. Plantas* **2019**, *22*, 380–390. [Referencia cruzada]
33. Babushok, VI; Linström, PJ; Zenkevich, Índices de retención de IG para compuestos de aceites esenciales vegetales informados con frecuencia. *J. física. química Árbitro. Datos* **2011**, *40*, 043101. [Referencia cruzada]
34. Espectrometría, M.; Adams, PR *Identificación de componentes de aceites esenciales por cromatografía de gases*; Publicación Texensis: Gruver, TX, EE. UU., 2017; ISBN 9781932633214.
35. Le, NV; Sam, LN; Huong, LT; Ogunwande, IA Composiciones químicas de aceites esenciales y actividad antimicrobiana de *Piper albispicum*. CENTROS PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES. de Vietnam. *J. Esencia. Oso de aceite. Plantas* **2022**, *25*, 82–92. [Referencia cruzada]
36. Base de datos de referencia estándar del NIST. *Biblioteca espectral NIST/EPA/NIH con programa de búsqueda, versión 2.3*; Instituto Nacional de Estándares y Tecnología: Gaithersburg, MD, EE. UU., 2017.
37. McLafferty, FW; Douglas, BS *Registro Wiley/NBS de datos espectrales de masas*, 2ª ed.; Wiley: Nueva York, NY, EE. UU., 1989.
38. Echeverri, LI; Arroyave, EA; Barajas, FH Comparación de pruebas de normalidad. *XXI Simp. En t. Estad* **2015**, 8–11.
39. Li, T.; Chen, M.; Ren, G.; Hua, G.; Mi, J.; Jiang, D. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Zanthoxylum armatum*. CORRIENTE CONTINUA. en *Aspergillus flavus* aflatoxinas en semen de *Platycladi* almacenado. *Frente. Microbiol.* **2021**, *12*, 633714. [Referencia cruzada] [PubMed]
40. Houicher, A.; Hechachna, H.; Özogul, F. Determinación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Artemisia campestris* de Argelia. Determinación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Artemisia campestris* de Argelia. *En t. J. Alimentos Prop.* **2016**, *19*, 1749–1756. [Referencia cruzada]
41. Fraternali, D.; Ricci, D.; Biomolécolari, S.; Biología, S.; Carlo, U. Composición de aceites esenciales y actividad antifúngica de partes aéreas de *bola negrassp foetida* recolectada en épocas de floración y fructificación. *Nat. Pinchar. común* **2014**, *9*, 1934578X1400900733. [Referencia cruzada]
42. Hsouna, AB; Halima, NB; Abdelkafi, S.; Hamdi, N. Aceite esencial de *Artemisia phaeolepis*: composición química y actividades antimicrobianas. *J. Oleo Sci.* **2013**, *980*, 973–980. [Referencia cruzada]
43. Alvarenga, ES; Moreira, C.; Barreto, RW Caracterización química de compuestos volátiles de *lantana camara* Tierra L. *rádula Swy* su actividad antifúngica. *Moléculas* **2012**, *17*, 11447–11455. [Referencia cruzada]
44. Venturi, RC; Danielli, LJ; Klein, F.; Apel, MA; Montanha, JA; Bordignon, SAL; Roehe, PM; Alejandro, M.; Henriques, AT; Venturi, CR; et al. Análisis químico y actividad antiviral y antifúngica in vitro de aceites esenciales de *espátula de Glechony Glechon marifolia*. Análisis químico y actividad antiviral y antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Glechon spathulata* y *Glechon marifolia*. *Farmacía Biol.* **2015**, *53*, 682–688. [Referencia cruzada]
45. Yoarez, ZN; Bach, H.; Sa Sánchez-Arreola, E.; Garzaandez, LR Actividad antifúngica protectora de los aceites esenciales extraídos de *Buddleja perfoliatay Pelargonium graveolens* contra hongos aislados de granos almacenados. *Aplicación J. Microbiol.* **2016**, *120*, 1264–1270. [Referencia cruzada]

Descargo de responsabilidad/Nota del editor: Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones pertenecen exclusivamente a los autores y contribuyentes individuales y no a MDPI y/o a los editores. MDPI y/o el(los) editor(es) declinan toda responsabilidad por cualquier daño a personas o propiedad que resulte de cualquier idea, método, instrucción o producto mencionado en el contenido.