



**Universidad del Azuay**

**Facultad de Ciencia y Tecnología**

**Escuela de Ingeniería Agropecuaria**

***Obtención de extractos vegetales con actividad  
biocontroladora ante hongos fitopatógenos***

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de  
Ingeniero Agropecuario**

**Autor:**

**José Luis Cabrera Arévalo**

**Directora:**

**Ing. Aída Cazar Ramirez**

**Cuenca – Ecuador**

**2009**

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la vida, a mi madre por siempre guiarme con sus consejos, experiencias y por sobre todo por darme la mejor herencia que es la educación, a mi padre y mis hermanos que con su apoyo me hicieron siempre ver hacia delante. Millones de gracias

**José**

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos mis maestros que no solo nos enseñaron en las aulas si no que también nos dieron lecciones de vida, a todos mis compañeros/eras por su amistad, de manera especial a la Ing. Aidita Cazar y la Dra. Maria Elena Cazar por impulsar el aporte científico y por brindarnos todos sus conocimientos. Y gracias de nuevo por toda la paciencia.

## RESUMEN

En este trabajo se probó la actividad biocontroladora de extractos vegetales de tres especies de menta (*Mentha pulegium*, *M. arvensis*, y *Clinopodium* sp.), cedrón (*Lippia citriodora*), hierba luisa (*Cymbopogon citraus*), chamico (*Datura ferox*), ruda ( *graveolens*), romero (*rosmarinus officinalis*) y matico (*Buddleja globosa*).

Para establecer la actividad biocontroladora se realizaron pruebas “in vitro”: ensayos de dilución en agar y actividad antifúngica por método ELISA. Este produjo los siguientes resultados: los extractos de menta, hierba luisa cedrón y ruda controlan al patógeno *Fusarium*. Los extractos de chamico, *M. arvensis*, hierba luisa y ruda ejercen un control moderado frente a *Botrytis* así como, para el control de *Alternaria* los extractos de chamico y *M. arvensis*

## **ABSTRACT**

In the present work, extracts from three mints (*Metha pulegium*, and *Clinopodium* sp.), cedar, (*Lippia citriodora*), lemongrass (*Cymbopogon citrates*), chamico (*Datura ferox*), ruda (*Ruta graveolens*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and matico (*Buddleja globosa*) were evaluated as biocontrol agents.

The extracts were tested in two “in vitro” assays to establish the biocontrol activity of the extracts: agar dilution assays and ELISA antifungal activity method. The results obtained showed the extracts from mint, lemongrass, cedar and ruda effective against *Fusarium*. Extracts from chamico, *M. arvensis*, lemongrass and ruda have a moderate effect against *Botrytis*. The fungus *Alternaria* is inhibited by chamico and *M. arvensis* extracts.

## INDICE DE CONTENIDOS

| <b>Contenido</b>                        | <b>pág.</b>   |
|-----------------------------------------|---------------|
| Dedicatoria.....                        | ii            |
| Agradecimientos.....                    | iii           |
| Resumen.....                            | iv            |
| Abstract.....                           | v             |
| Índice de Contenidos.....               | vi            |
| Materiales y Métodos .....              | vii           |
| Índice de Ilustraciones y Cuadros ..... | viii          |
| <br><b>Introducción.....</b>            | <br><b>ix</b> |

### **CAPITULO 1: FUNDAMENTOS TEORICOS**

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Extractos Vegetales                                                                        | 1  |
| 1.1 Características de los Extractos Vegetales                                                | 1  |
| 1.2 Composición de los Extractos Vegetales                                                    | 1  |
| 1.3 Especies Vegetales Seleccionadas para la Obtencion y Evaluación<br>de Extractos Vegetales | 4  |
| 1.3.1 Hierba Luisa                                                                            | 4  |
| 1.3.2 Menta Arvensis                                                                          | 5  |
| 1.3.3 Menta Acuática (Guarmi Poleo)                                                           | 6  |
| 1.3.4 Menta Pamba Poleo                                                                       | 8  |
| 1.3.5 Cedrón                                                                                  | 9  |
| 1.3.6 Matico                                                                                  | 10 |
| 1.3.7 Chamico                                                                                 | 12 |
| 1.3.8 Borraja                                                                                 | 13 |
| 1.3.9 Ruda                                                                                    | 15 |
| 1.3.10 Romero                                                                                 | 16 |

|       |                                                      |    |
|-------|------------------------------------------------------|----|
| 1.4   | microorganismos fitopatogenos utilizados como plagas |    |
|       | objetivo                                             | 18 |
| 1.4.1 | <b><i>Botrytis sp.</i></b> Moho gris                 | 18 |
| 1.4.2 | <b><i>Alternaria sp.</i></b> Lancha Temprana         | 20 |
| 1.4.3 | <b><i>Fusarium sp.</i></b> Marchitamiento Vascular   | 22 |

## CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS

|       |                           |    |
|-------|---------------------------|----|
| 2.1   | Materiales                | 24 |
| 2.2   | Métodos                   | 25 |
| 2.2.1 | Extracción con Solvente   | 25 |
| 2.2.2 | Extracción por Maceración | 26 |
| 2.2.3 | Ensayos in Vitro          | 27 |

## CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION

|       |                                                     |    |
|-------|-----------------------------------------------------|----|
| 3.1   | Resultados                                          | 29 |
| 3.1.1 | Evaluación de Rendimiento de Obtención de Extractos | 29 |
| 3.1.2 | Método de extracción por maceración                 | 30 |
| 3.1.3 | Actividad biocontroladora de extractos              | 31 |
| 3.2   | Discusión                                           | 33 |

|  |                                       |    |
|--|---------------------------------------|----|
|  | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> | 35 |
|--|---------------------------------------|----|

|  |                     |    |
|--|---------------------|----|
|  | <b>BIBLIOGRAFIA</b> | 36 |
|--|---------------------|----|

|  |               |    |
|--|---------------|----|
|  | <b>ANEXOS</b> | 39 |
|--|---------------|----|

## INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

### Tablas:

|            |                                                         |    |
|------------|---------------------------------------------------------|----|
| Tabla N° 1 | Rendimiento de los Extractos de 10 especies vegetales   | 29 |
| Tabla N° 2 | Rendimiento de 10 E. Vegetales Obtenidas por Maceración | 30 |
| Tabla N° 3 | Actividad de los extractos frente a <i>Alternaria</i>   | 31 |
| Tabla N° 4 | Actividad de los extractos frente a <i>Fusarium</i>     | 32 |
| Tabla N° 5 | Actividad de los extractos frente a <i>Botrytis</i>     | 32 |
| Figura 1:  | Esquema de distribución de la placa de microdilución    | 28 |

## INDICE DE ANEXOS

|                |                                           |    |
|----------------|-------------------------------------------|----|
| <b>ANEXO 1</b> | Fichas de Recolección de Material Vegetal | 39 |
| <b>ANEXO 2</b> | Materiales y Reactivos Utilizados         | 42 |
| <b>ANEXO 3</b> | Fotos de Bioensayos                       | 43 |

Cabrera Arévalo José Luis  
Trabajo de Graduación  
Ing. Aida Cazar Ramírez  
Marzo, 2009

## **“Obtención de Extractos Vegetales con Actividad Biocontroladora ante Hongos Fitopatógenos”**

### **INTRODUCCION**

#### **Generalidades:**

La utilización intensiva e irracional de agroquímicos incrementa los costos de producción, deteriora el medio ambiente y atenta contra la salud humana.

Los fitopatógenos constituyen la principal limitante de la producción agrícola. Su control se ha basado, tradicionalmente, en el uso de productos químicos, muchos de los cuales han producido, como efecto secundario, problemas de desequilibrio ambiental, de salud humana y la aparición de poblaciones de plagas más agresivas y resistentes a ellos, los efectos en humanos incluye diversas enfermedades, alteraciones genéticas y diversos cuadros clínicos por intoxicación. (Fajardo, 2005)

Estos problemas han llevado a la búsqueda de alternativas de control que se inserten en el desarrollo de agrosistemas, basados en un manejo integrado del cultivo sin alterar el equilibrio del sistema. Una de

estas alternativas es el uso de extractos de plantas que actúan como pesticidas o simplemente como reguladores del desarrollo de los patógenos. (Sanjuán, 2005) (Gros, 1985)

En años recientes se ha explorado el potencial uso de productos naturales en el control de patógenos de plantas

La utilización de extractos vegetales constituye una alternativa innovadora y eficaz para el control de calidad de las frutas en almacenamiento. (Fajardo, 2005)

La actividad biocontroladora de extractos vegetales se basa en la producción de metabolitos secundarios como respuesta a la presencia de patógenos y a las interacciones ecológicas. (Eugenia, 2004)

La extracción y el empleo de algunas de las sustancias que intervienen como mecanismo de defensa de las plantas, puede ser de gran ayuda para los agricultores, sobre todo en aquellos casos de mayor complejidad, donde el control de plagas y enfermedades se hace más intratable. (Eugenia, 2004)

Los extractos pueden actuar como repelentes de los insectos. Las sustancias repelentes pueden ser utilizadas en forma preventiva. (Eugenia, 2004)

La calidad y concentración de las sustancias activas pueden llegar a variar hasta un 500% de una estación a otra o con la localización de la planta, edad y madurez del material vegetal con que se prepara el extracto. (Eugenia, 2004)

El principio activo se encuentra a menudo concentrado en una parte específica de la planta, aunque frecuentemente y por razones comerciales se emplee toda la planta. (Eugenia, 2004)

Otra causa de la variabilidad incluye el hecho de que la sustancia activa suele estar ligada a una azúcar y necesita ser separada por una

enzima antes de activarse, y el secado rápido impide o reduce este proceso, por lo tanto baja su efectividad. (Eugenia, 2004)

Se deduce de todo esto que una dosificación precisa se hace muy difícil con preparados caseros. Además del problema de la variabilidad estacional y la actividad a corto plazo nos encontramos con los efectos secundarios. (Eugenia, 2004)

El presente trabajo esta enfocado para crear nuevas alternativas de control que ayuden a contrarrestar el abuso de agroquímicos en los diversos cultivos y a su vez garanticen la efectividad de estos al ser aplicados en el campo, logrando así disminuir la contaminación ambiental y el efecto invernadero que producen los métodos tradicionales de control químico.

Se seleccionaron 10 especies vegetales y se las sometió a procesos de extracción con solvente la misma que se lo realizo en equipo sohlex que se basa en la extracción de la clorofila de las plantas, otra prueba también usada fue la extracción por maceración que consistió en concentrar la solución en un matraz con solvente y este vaya despigmentando al follaje.

Para las evaluaciones se realizo dos métodos, el primero fue con discos en agar para comprobar el halo de inhibición; método que no fue muy efectivo por los problemas de contaminación, el segundo método fue en placas ELISA en el cual se pudo evaluar los extractos vegetales y obtener un resultado a los ensayos realizados en los tres hongos, *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*

## **CAPITULO 1**

### **FUNDAMENTOS TEORICOS**

#### **1. Extractos Vegetales**

##### **1.1 Características de los Extractos Vegetales**

Son preparaciones que se hacen para obtener un concentrado de principios activos a partir de material vegetal

Es la preparación de una planta cuyos tejidos son tratados con un solvente, se realiza una evaporación del líquido excedente, o se hacen extracciones repetidas del tejido hasta que se obtiene un concentrado de material vegetal. En los extractos sólidos o secos se hace una evaporación total del extracto o tintura. (Bunch, 1997)

Los diferentes métodos usados para preparar los extractos vegetales son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles y con fluidos supercríticos y algunos mediante el método de sohlex (Bermúdez, 1999).

##### **1.2 Composición de Extractos Vegetales**

Los extractos vegetales están constituidos por mezclas de metabolitos secundarios de la planta en estudio

Las plantas producen una vasta y diversa gama de compuestos orgánicos, la mayoría de los cuales no parece participar directamente

en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias, tradicionalmente denominadas metabolitos secundarios frecuentemente se distribuyen en forma diferenciada a un limitado grupo de grupos taxonómicos en el reino vegetal.

Sus funciones, algunas de las cuales permanecían desconocidas en la actualidad se conocen mejor debido a la aplicación de técnicas para su elucidación.

Los metabolitos primarios en contraste, como los fitosteroles, acil lípidos, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos se encuentran en las plantas y desarrollan un rol en el metabolismo por lo cual su esencialidad y usos son evidentes. (Bermúdez, 1999).

El interés de investigación se centra en productos de gran utilidad como: tintes, polímeros, fibras, gomas aceites, ceras, agentes saborizantes, perfumes y drogas. El reconocimiento de las propiedades biológicas de miles de productos naturales ha incentivado la focalización en este campo, nombrado para la investigación de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. (Bermúdez ,1999)

El crecimiento de la apreciación de los amplios y diversos efectos biológicos producidos por los compuestos naturales han permitido una reevaluación de los posibles roles que estos compuestos juegan en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas. Algunos de estos compuestos muestran ahora una adaptación significativa en protección contra herbívoros e infecciones microbianas, como atrayentes para polinizadores y especies dispersoras de semillas, y también como agentes alelopáticos (aleloquímicos que influyen la competición entre especies de plantas. Estas funciones ecológicas afectan profundamente la supervivencia de las plantas. (Bandoni, 2000)

Basados en sus orígenes biosintéticos, los productos naturales de plantas pueden ser divididos dentro de tres grandes grupos: los

terpenoides, los alcaloides y los fenilpropanoides y compuestos fenólicos relacionados.

Todos los terpenoides, incluyendo los metabolitos primarios y más de 25.000 compuestos secundarios, son derivados del precursor de cinco carbonos isopentenil difosfato (IPP). (Harborne 1998)

Los 12.000 conocidos como alcaloides, los cuales contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los 8000 son compuestos fenólicos formados por la ruta de ácido shikímico o la ruta malonato acetato. (Buchanan, 2000).

Los metabolitos primarios cumplen la función de soporte y desarrollo de los vegetales (carbohidratos, proteínas, lípidos). Los metabolitos secundarios son moléculas que sintetiza la planta con fines de defensa (aceites esenciales), atracción para la polinización y por ello ofrecen la posibilidad de ser utilizadas con biocontroladores. (Buchanan, 2000).

### 1.3 ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS PARA LA OBTENCION Y EVALUACION DE EXTRACTOS VEGETALES

#### 1.3.1 HIERBA LUISA



**Nombre Científico:** *Cymbopogon citratus*

**Nombre Vulgar:** Hierba Luisa

**Familia:** Poaceae

**Origen:** Sureste Asiático

#### **Características Botánicas**

**Hojas:** Agrupadas cerca de la base, hasta 1m de longitud, ramas alargadas.

**Flores:** Se reúnen en espigas sesiles y pediceladas

**Tallos:** Muy ramificado de 1 a 2 m

**Raíces:** Posee un eje central del que se ramifican varios rizomas.

#### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Prefiere el suelo areno – arcilloso drenados profundos, requiere clima tropical o subtropical, la mejor adaptación se encuentra en las zonas

donde la temperatura es de 26°C, también necesita abundantes lluvias.  
(Pizarro, 2000)

### Usos

Para obtener esencias, para la separación de citral, también después de la destilación se puede dar al ganado y sirve como mejorador del suelo. (Pizarro, 2000).

### 1.3.2 MENTA ARVENSIS



**Nombre Científico:** *Mentha arvensis*

**Nombre Vulgar:** Menta

**Familia:** Lamiaceae

**Origen:** África, China y Europa

### Características Botánicas

**Hojas:** Lanceoladas, lisas y opuestas.

**Flores:** Tubulares de 5 lóbulos.

**Tallos:** Ramificados hasta 1m de altura.

**Raíces:** Son ramificadas, pivotantes

### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Las hojas poseen glándulas epidérmicas que producen aceite esencial. Su tallo semi leñoso alcanza hasta un metro de altura, sus raíces son poco profundas y de raíz pivotante. (Santana, 2005)

### **Usos**

Se pueden utilizar como Antiinflamatorias y antihistamínicas, Su uso más habitual es como digestivo, en infusión, después de las comidas.

También sirve para descongestionar las vías respiratorias, calmar la tos y combatir el insomnio.

Sus hojas sustituyen a las de la menta, en pequeñas cantidades, pero posee más aplicaciones medicinales y domésticas. (Santana, 2005)

### **1.3.3 MENTA ACUATICA**



**Nombre Científico:** *Clinopodium sp.*

**Nombre Vulgar:** Guarmi Poleo

**Familia:** Lamiaceae

**Origen:** África, China y Europa

### **Características Botánicas**

**Hojas:** Pubescentes, lisas y opuestas.

**Flores:** De 2 a 3 verticilastros rojo - violeta

**Tallos:** Ramificados hasta 1m de altura.

**Raíces:** Son poco profundas y pivotantes

### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Las hojas poseen glándulas epidérmicas. La planta en su totalidad es de un color verde muy subido a violáceo y sin ninguna vellosidad, puede alcanzar entre 30 y 80cm de altura. (Santana, 2005)

### **Usos**

Se pueden utilizar como Antiinflamatorias y antihistamínicas. Su uso más habitual es como digestivo, en infusión, después de las comidas.

También sirve para descongestionar las vías respiratorias, calmar la tos y combatir el insomnio. (Santana, 2005)

Sirven para aliviar las picaduras de avispas y otros insectos, para ahuyentar insectos -como un repelente de polillas en los cajones, por ejemplo- y, en infusión, para el tratamiento de los dolores de cabeza, resfriados y mareos. (Santana, 2005)

#### 1.3.4 MENTA PAMBA POLEO



**Nombre Científico:** *Mentha pulegium*

**Nombre Vulgar:** Pamba Poleo

**Familia:** Lamiaceae

**Origen:** Sudáfrica, Australia

##### **Características Botánicas**

**Hojas:** Ovaladas color verde grisáceo se disponen una en frente de otra.

**Flores:** En espiras características, pueden ser rosas, violetas y blancas

**Tallos:** Tallo liso redondeado y aromático

**Raíces:** Rastreras.

##### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Se da bien en zonas húmedas, el periodo de floración es de Junio - Octubre a orillas de los ríos y en terrenos desolados, es peligrosa por su alto contenido de cetona ya que es venenoso. (Goncalvez, 2000).

### **Usos:**

Se utiliza como repelente y para aplicaciones en heridas, al quemar las partes vegetativas de esta especie, su humo provoca la muerte de insectos y parásitos internos, también se ha comprobado que el aceite esencial de esta planta, es toxico para los seres humanos. (Stengle, 2008)

### **1.3.5 CEDRON**



**Nombre Científico:** *Limpia citriodora*

**Nombre Vulgar:** Maria Luisa, Cedron

**Familia:** Verbenaceae

**Origen:** Región montañosa de Argentina

### **Características Botánicas**

**Hojas:** Simples, rugosas, limbo dentado y color verde pálido

**Flores:** Pequeñas, blancas por fuera y azul violáceo por dentro, se ubica al extremo de los tallos en espigas agrupadas en panojas.

**Tallos:** Largos, leñosos angulosos y provistos de finas rayas lineares.

**Raíces:** De tipo fibrosa, color blanco y forman una cabellera alrededor del nudo

### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Se da bien en zonas húmedas, a orillas de los ríos y en terrenos desolados, es peligrosa por su alto contenido de cetona ya que es venenoso, prospera bien en suelos de consistencia media, sueltos, permeables, profundos, pH entre 6,5 y 7,2. Le favorece una buena iluminación. (Sisa, 2004)

### **Usos**

Se utiliza para hacer esencias, también para remedios caseros. Antiviral gracias a los ácidos fenólicos como: el cafeico, clorogénico y rosmarínico. (Sisa, 2004)

#### **1.3.6 MATICO**



**Nombre Científico:** *Buddleja globosa*

**Nombre Vulgar:** Matico, ballín

**Familia:** Buddlejaceae

**Origen:** Chile Argentina y a orillas de los caminos.

### **Características Botánicas**

**Hojas:** Opuestas y decusadas, de forma ovalado-lanceoladas con ápice agudo

**Flores:** Amarillo-anaranjadas hermafroditas de 5mm de largo reunidas en inflorescencias globosas, apretadas

**Tallos:** Tallos delgados y succulentos

**Raíces:** No muy profundas

### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Puede llegar a alcanzar los tres metros de altura y su periodo de floración se extiende de noviembre a mayo. Las hojas son perennes, simples, opuestas, rugosas en el haz, felpudas en el envés y cubiertas de pelos. (Hoffmann, 1998)

Se emplean para teñir tejidos, a los que aportan un tono amarronado. Posee flores que llaman la atención por su color, entre amarillo y naranja, y por la forma que tienen de agruparse, en cabezas redondas. No miden más de un centímetro y desprenden un embriagador aroma. (Hoffmann, 1998)

### **Usos**

Especie muy utilizada en jardinería. Sus hojas y flores se usan en medicina popular como cicatrizante y contra afecciones intestinales. Las hojas sirven para teñir color café. (Hoffmann, 1998)

### 1.3.7 CHAMICO



**Nombre Científico:** *Datura ferox*

**Nombre Vulgar:** Chamico, toloache, yerba del diablo

**Familia:** Solanácea

**Origen:** En todo el mundo y sobre todo en los climas calurosos y tropicales.

#### **Características Botánicas**

**Hojas:** En forma de trompeta

**Flores:** De flores hermosas

**Tallos:** Tallos suculentos y gruesos

**Raíces:** Son bien adheridas al suelo

#### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

En general las Daturas son muy fáciles de cultivar. A estas plantas les gusta el calor y la tierra rica. Para ayudar en la germinación de las semillas se las puede remojar en agua caliente (no hirviendo) durante unas 24 horas. Se puede ir cambiando el agua caliente cada 6 horas aproximadamente. Una vez hecho esto ya se puede plantar. Algunas daturas pueden tardar semanas en germinar.

Las semillas constituyen su único medio de multiplicación y difusión; los mismos quedan en las cápsulas o caen al suelo donde pasan el invierno, nacen en octubre y noviembre y las plantas vegetan hasta fines del verano, en que florecen y fructifican. (Shelli. 1971)

### Usos

Anestésico y alucinógeno, Cigarros, Adormecedores. Las Datura generan un inusual y distintivo fruto del tamaño de una nuez cubierto con púas. Ha sido usada en todas las áreas donde se la encuentra; en "ritos de pasaje" y en diversas formas de chamanismo. (Shelli. 1971)

### 1.3.8 BORRAJA



**Nombre Científico:** *Borrago officinalis*

**Nombre Vulgar:** Borraja

**Familia:** Solanácea

**Origen:** Atlántico, hispano - marroquí

### Características Botánicas

**Hojas:** Esparcidas, rugosas y oscuras

**Flores:** Azules, blancas o violáceas

**Tallos:** Tallos gruesos frágiles, leñosos

**Raíces:** Poco profundas

### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Planta anual muy hispida de la familia de las boragináceas de hasta 60 cm. Tallos erectos cubiertos de cerdas. Hojas inferiores pecioladas, ovales, en roseta basal; hojas superiores sésiles. Flores agrupadas en cimas péndulas, con corola de hasta 2,5 cm., azul y con estambres en agrupamiento cuneiforme de color púrpura. (Martínez, 2008)

Las flores contienen mucilagos neutros, abundantes sales minerales (sílice, calcio y potasio), las hojas taninos y ácido salicílico. El aceite de la semilla es rico. (Martínez, 2008)

### **Usos**

Las hojas basales frescas se utilizan como verdura de buen sabor, fácil digestión, diurética y ligeramente laxante. Muy adecuada en caso de inflamación de la próstata y prostatitis, La presencia de alcaloides pirrolizidínicos (licopsamina, supinina, thesinina y amabilina) tiene un efecto tóxico en el hígado, por lo que no se aconsejan los tratamientos prolongados así como su uso normal en casos de embarazo o sospecha de formaciones tumorales. (Martínez, 2008)

### 1.3.9 RUDA



**Nombre científico:** *Ruta graveolens*

**Nombre vulgar:** Ruda

**Familia:** Rutáceas

**Origen:** Zona Mediterránea

#### **Características Botánicas**

**Hojas:** Carnosas verde amarillentas

**Flores:** De hasta 2cm, pétalos dentados

**Tallos:** Erectos ramificados

**Raíces:** Leñosa

#### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Planta arbustiva aromática perenne de hasta 150cm de altura, a veces cultivada como planta de jardinería puede aparecer naturalizada en algunos campos de cultivo o campos abonados. (White, 1985)

## Usos

Se utiliza mucho como repelente para ahuyentar insectos, también para matar lombrices, en la piel para combatir la sarna y en animales para los parásitos externos de los bovinos. (White, 1985)

### 1.3.10 ROMERO



**Nombre Científico:** *Rosmarinus officinalis*

**Nombre Vulgar:** Romero

**Familia:** Lamiaceae (Labiatae)

**Origen:** Mar mediterráneo

#### **Características Botánicas:**

**Hojas:** Finas, como agujas, color verde oscuro en la parte superior y grisáceo en la inferior

**Flores:** Pequeñas irregulares entre blanco y azul pálido

**Tallos:** Cilíndrico de color café, leñoso

**Raíces:** Fasciculada

### **Condiciones de Crecimiento y Cultivo**

Florece durante todo el año, solo ocasionalmente fructifica pero se desconoce que sus semillas sean viables. Se da bien en suelos cultivados y es sensible a la humedad. (Santana, 2005)

### **Usos**

En nuestro medio se lo utiliza como repelente de insectos en zanahorias y repollos, esta especie, también es sembrada alrededor de los cultivos, ya que en ella hospedan enemigos naturales de las plantas. (Santana, Omar. 2005)

## 1.4 MICROORGANISMOS FITOPATOGENOS UTILIZADAS COMO PLAGAS OBJETIVO

### 1.4.1 *Botrytis sp.* Moho gris



#### Hospedantes

Fresa, frambuesa, ají, crisantemo, lechuga, orquídeas, patata, vid, tomate, rosa.

#### Características de la Enfermedad

Produce podredumbres en la base de los tallos, en brotes, en hojas, en flores y en frutos.

Ataca a toda a toda la planta, aunque prefiere las de hojas blandas y tallos tiernos y carnosos.

El síntoma típico es un micelio esponjoso gris oscuro característico la zona afectada. Las partes afectadas se pudren.

Infecta penetrando las esporas por heridas que causan los insectos, el granizo, las rozaduras. (Deacon, 1988)

Las condiciones óptimas para su desarrollo son temperaturas suaves y humedad alta. Así, el moho gris se extiende con rapidez.

Ataca a cualquier parte de la planta, aunque prefiere los frutos y hojas blandas, tallos tiernos y carnosos. En una parte del fruto, se manifiesta como una mancha amarillenta de consistencia acuosa que se va extendiendo a toda la fruta cubriéndola de un polvo gris. (Deacon, 1988)

## **Organismo Causal**

*Botrytis sp.*, es un hongo patógeno que se caracteriza por los abundantes conidios (esporas asexuales), de forma oval en el extremo y conidióforos grises ramificados. El hongo además produce esclerocios altamente resistentes, como formas de resistencia en cultivos viejos. (Deacon, 1988)

## **Condiciones de Proliferación**

El clima es un factor de gran importancia para el establecimiento y desarrollo del hongo en el tejido vegetal o substrato. Los dos elementos que más influyen son la humedad relativa y la temperatura.

Las esporas de *Botrytis* requieren altos niveles de humedad para germinar, entre 93 y 100% de humedad relativa, y la esporulación del hongo comienza entre 70 y 100% de humedad relativa. (Deacon, 1988)

La temperatura óptima para la germinación es de 20°C y la esporulación tiene como óptimo 15°C; sin embargo, el micelio es capaz de crecer a temperaturas cercanas a 0°C. Los esclerocios (cuerpos de resistencia) se forman en otoño-invierno cuando las temperaturas fluctúan entre 11 y 13°C y la esporulación de estos cuerpos en primavera es favorecida por temperaturas de 12 a 22°C. (Deacon, 1988)

#### 1.4.2 *Alternaria sp.* Lancha Temprana



##### **Hospedantes**

Remolacha, ají, papa, berenjena, cítricos, brócoli, higuera, col.

##### **Características de la Enfermedad**

Puede atacar a nivel de plántulas, pero tiene mayor incidencia en los tejidos senescentes y particularmente a plantas de poco vigor, nutrición deficiente o en plantas que crecen bajo algún tipo de adversidad, debido a condiciones desfavorables de clima, insectos, virus y otras enfermedades. Además pueden sobrevivir en suelos, semillas y en residuos de cultivos infestados y malezas; y ser diseminado con la ayuda del viento agua insectos, trabajadores y maquinaria agrícola. (Rueda, Alfredo y Shelton, Anthony. 1995).

Se caracteriza porque en las zonas atacadas aparecen unas manchas de color negro o pardas ("negrón"), bien delimitadas, que en algunos casos pueden estar rodeadas por una o varias aureolas concéntricas amarillentas. Estas manchas van creciendo y se van secando. (Rueda, Alfredo y Shelton, Anthony. 1995)

En los tejidos afectados suelen aparecer unos puntos negros, que son los conidióforos que van a asegurar la reproducción del hongo. Es un hongo frecuente en hortícolas, sobre todo en tomate y patata. En general, se producen en zonas donde ha habido una herida.

No son graves porque normalmente ataca a hojas, en frutos es otra cosa.

Las plantas con deficiente fertilización son las más propensas al ataque de este hongo. (Rueda, Alfredo y Shelton, Anthony. 1995)

### **Organismo Causal**

*Alternaria sp.* Es un hongo perteneciente a la clase Deuteromycete del orden Moniliales, sus esporas marrones oscuras, en sus cadenas simples o ramificadas de las extremidades llevan conidioporas oscuras simples y son divididas en varias células por las paredes transversales y verticales. Las esporas nuevas son producidas por la protuberancia del material de la pared, a través de un poro en la extremidad de la espora anterior. (Deacon, 1988).

### **Condiciones Favorables de Proliferación**

Es mas eficaz cuando existen temperaturas elevadas, un ambiente húmedo y sobretodo es de mayor problema en época lluviosa. Cuando las plantas se encuentran estresadas por exagerada fructificación, ataque de nematodos, o deficiencias principales de nitrógeno, la enfermedad puede ser más severa. (Deacon, 1988).

### 1.4.3 *Fusarium sp.* Marchitamiento Vascular



#### Hospedantes:

Tomate riñón, ají, pimiento, pepino, espárrago, plátano, melón, sandía

#### Características de la Enfermedad

Se encuentra distribuida por todo el mundo, principalmente en nuestro país, causa pérdidas en varias especies hortalizas y frutales de alto ingreso económico. Este hongo permanece en los residuos de cultivos, sus estructuras de resistencia la permiten perdurar en el suelo por varios años. El hongo puede introducirse en la planta a través del suelo ya sea por el tallo o raíces y por medio de los haces vasculares es trasladado a toda la planta. (González, 2006)

*Fusarium sp.* Y sus varias formas, se han caracterizado por causar marchitamiento vascular, la putrefacción del corm, amarillamiento de hojas, putrefacción de la raíz, etc. Puesto que el marchitamiento es la enfermedad mas importante causada por *fusarium sp.* Existe un amarillamiento en las hojas más jóvenes que se marchitan y mueren, seguida por inclinación de las hojas más viejas (epinastia). Se identifica por el continuo marchitamiento de las hojas a partir de la base y por el

color pardo de los vasos conductores. Además, en plantas más viejas los síntomas son más notables en el periodo de floración y la maduración de la fruta. (González, 2006)

### **Organismo causal**

El organismo causal es el hongo perteneciente a la clase deuteromycete denominado *Fusarium sp.* Este presenta numerosas estructuras llamadas esporodoquios donde se agrupan las esporas. Existen dos tipos de conidios, los macroconidios que son: hialinos, tabicados, generalmente con tres tabiques y microconidios más pequeños hialinos, unicelulares. Posee células de paredes engrosadas que actúan como estructuras de resistencias, denominadas clamidiosporas pueden ser terminales o intercalares. (González, 2006)

### **Condiciones Favorables de Proliferación**

Es un hongo de temperaturas calidas el desarrollo optimo se presenta a 20 °C el rango va de 12 a 28°C con humedad relativa alta, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. Otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio. Las heridas ocasionadas a las raíces por maquinaria o nematodos como es el caso de *Melodogyne incognita* aumentan la susceptibilidad al marchitamiento y favorece el desarrollo del hongo. (González, 2006)

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 MATERIALES.

##### **Material vegetal**

Follaje fresco de las diez especies estudiadas

##### **Medios de Cultivo**

Metodología utilizada para la preparación de medio de cultivos para hongos de *Botrytis cinérea*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*. (Anexo 2)

##### **PDA:**

Se utilizo para aislamiento y mantenimiento de cepas de hongos

##### **AGAR LEVADURA MALTA**

Su utilización fue en reproducción, aislamiento, repiques de hongos

##### **YMG**

Medio aplicado en los bioensayos con papel filtro

##### **MEDIO MINIMO**

Aplicado en los bioensayos con placas ELISA para los tres hongos

##### **Cepas de Hongos**

Para los bioensayos se obtuvieron aislados de *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium*. A partir de material vegetal con síntomas visibles de la enfermedad, mediante repiques sucesivos se realizaron purificaciones, las cepas se mantuvieron en placas y tubos de ensayo en refrigeración.

##### **Aislamiento y mantención de cepas puras**

El aislamiento se lo realizó en el laboratorio, a partir de plantas que presentaban síntomas de la enfermedad. El material vegetal se

desinfectó utilizando alcohol o hipoclorito de sodio al 1%, para evitar la contaminación por otros microorganismos presentes en las muestras. El medio en el que se reprodujo el hongo fue agar-malta (Anexo 2), se colocó pedazos pequeños en cajas petri con el agar y se los selló con parafilm. En la estufa a 27° C se verificó el crecimiento, limpiando y repicando si había presencia de levaduras.

El aislamiento de *Botrytis* se lo realizó a partir de frutillas las cuales fueron colocadas en una cámara húmeda, a temperatura ambiente. En el lapso de 48 horas, se verificó la presencia de síntomas. A partir de este material se inocularon en cajas con agar- malta (Anexo 2)

Las cajas inoculadas con el hongo que tenían un crecimiento moderado se las repicó cada 2 días con el fin de mantenerlas puras y libres de impurezas.

Una vez obtenido las cajas con un buen crecimiento del hongo se procedió al aislamiento de esporas de *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium*.

## **2.2 METODOS**

Los métodos de extracción utilizados para la preparación de los extractos vegetales de las especies evaluadas como biocontroladores fueron:

### **2.2.1 EXTRACCION CON SOLVENTE**

#### **Preparación del Material Vegetal**

Se procedió primero a la selección del follaje fresco y sano del material vegetal a procesar, el cual fue secado en una estufa a 50°C por un lapso de 24 a 48 horas.

El material vegetal seco fue triturado en una licuadora hasta obtener un polvo fino. Este material se guardó en paquetes de aproximadamente 500gr cada uno, identificados adecuadamente.

### **Extracción con Equipo Soxhlet**

La extracción se desarrolló a partir de material pulverizado el cual fue tratado con metanol en el sistema de extracción Soxhlet. En este equipo el solvente alcanza una temperatura adecuada para extraer los principios activos del material vegetal durante el desarrollo de extracción.

Cuando se observa una suficiente pigmentación del solvente, se suspende el suministro de calor y el extracto obtenido es evaporado a presión reducida mediante un rotavapor.

#### **2.2.2 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN**

La extracción por maceración siguió el procedimiento que se describe a continuación:

Aproximadamente 115 a 120 gramos de follaje de las plantas en estudio fueron colocadas en un matraz, y sumergidos en 200 a 300 ml de metanol. Este sistema se dejó en reposo a temperatura ambiente y oscuridad por 48 horas.

Luego de este período de maceración se filtró el material, obteniéndose un extracto, que se dispensó en ependorfs, en volúmenes de 1ml, debidamente identificados. Con las soluciones obtenidas se desarrollaron los bioensayos posteriores.

### **Evaluación de Patógenos de Prueba y Cuantificación de Esporas**

Se seleccionó una caja petri con cada hongo observando que cada una haya alcanzado un crecimiento adecuado, con una pipeta automática se colocó cuidadosamente cinco mililitros de agua destilada estéril en el cultivo de los hongos.

Las esporas de hongos fueron cuantificadas mediante recuento en la cámara de Neubauer. Para el efecto, 100 µl de la solución de esporas fueron colocadas en la rejilla de la cámara. Posteriormente, se procede a observar en el microscopio en los diferentes campos usando un objetivo de 40x. De la cuadrilla central se escogen 4 cuadrículas y se estima el promedio del número de esporas. Este promedio se multiplica por un factor de  $4 \times 10^6$  (Chiriboga 2005).

### **2.2.3 ENSAYOS IN VITRO**

Para probar la actividad antifúngica de los extractos se utilizaron cepas de los hongos *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium*.

#### **Bioensayo por Dilución en Agar para Extractos Obtenidos por Extracción con Solvente**

Se prepararon 200ml de medio YMG (Anexo 2) para la evaluación de los tres hongos de prueba. Los medios fueron esterilizados en autoclave y dispensados en cajas petri, siendo inoculados previamente con la solución de esporas.

Después de la solidificación de los medios en las placas, se dispusieron discos de papel filtro, impregnados con volúmenes de 10 µl y 20 µl de extracto a ensayar. Para este ensayo se evaluaron discos impregnados con 10 µl y 20 µl de metanol como testigo. Se evaluó la formación de halos de inhibición transcurridas 72 horas; período de incubación en estufa a 25°C. Estas son las condiciones para el crecimiento de los hongos.

# **Bioensayo con placas Elisa para extractos obtenidos por maceración**

Para evaluar el efecto antifúngico de los extractos en medio líquido se probó la metodología de evaluación en placas ELISA.

Se prepararon soluciones de trabajo a partir del extracto, disueltos en medio mínimo de 1000ml

A partir de estas soluciones se preparó una placa ELISA transfiriendo 100µl de la solución de trabajo a la primera fila de la placa.

Se realizó una microdilución con una pipeta multicanal de la fila 2 – 10. La fila 11 sirvió como control de esterilidad, y la fila 12 como control de crecimiento del microorganismo.

Toda la placa, a excepción de la fila 11 fue inoculada con esporas del hongo de prueba, mediante la adición de agua destilada estéril se ajustó el volumen de 300µl.

Las placas fueron inoculadas a 27°C por 48 horas, transcurrido este tiempo se evaluó visualmente el crecimiento de las esporas.

|   | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11                                                                         | 12                                                                                               |
|---|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A |               |   |   |   |   |   |   |   |   |    | C<br>O<br>N<br>T<br>R<br>O<br>L<br><br>D<br>E<br><br>M<br>E<br>D<br>I<br>O | C<br>O<br>N<br>T<br>R<br>O<br>L<br>D<br>E<br>C<br>R<br>E<br>C<br>I<br>M<br>I<br>E<br>N<br>T<br>O |
| B |               |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                            |                                                                                                  |
| C | MICRODILUSIÓN |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                            |                                                                                                  |
| D |               |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                            |                                                                                                  |
| E |               |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                            |                                                                                                  |
| F |               |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                            |                                                                                                  |
| G |               |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                            |                                                                                                  |
| H |               |   |   |   |   |   |   |   |   |    |                                                                            |                                                                                                  |

**Figura 1:** Esquema de Distribución de la Placa de Microdilución

## CAPITULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

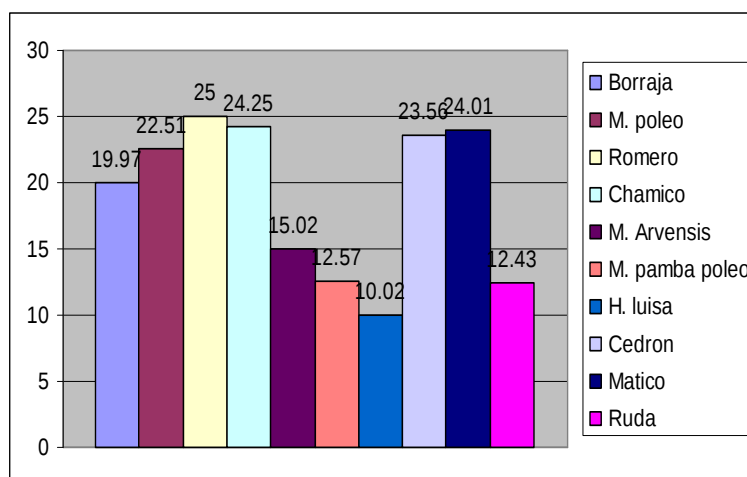
#### 3.1 Resultados

##### 3.1.1 Evaluación de Rendimiento de Obtención de Extractos

Los volúmenes de los extractos de las diez especies utilizadas permitieron establecer los rendimientos de cada especie.

El rendimiento obtenido por el primer método (extracción con solvente) se presenta en la Tabla 1; y se expresa en porcentaje (p/v).

**Tabla N° 1** Rendimiento de los Extractos de 10 especies vegetales mediante el método de extracción por solvente

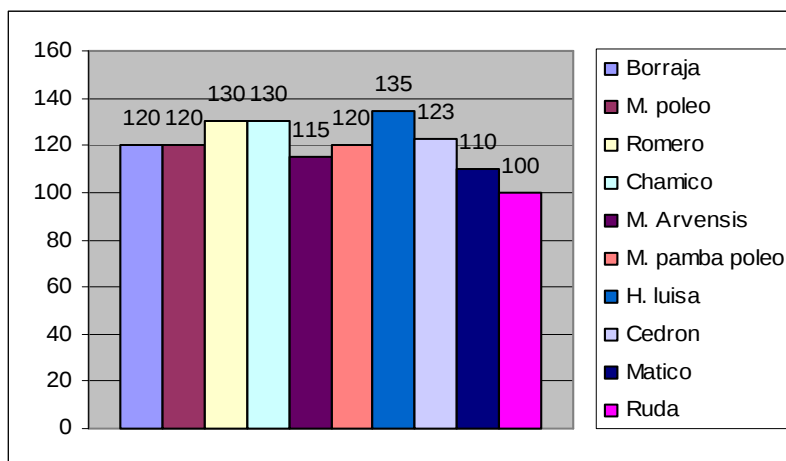


| Especie               | %/p/v |
|-----------------------|-------|
| <b>Borraja</b>        | 19.97 |
| <b>M. poleo</b>       | 22.51 |
| <b>Romero</b>         | 25    |
| <b>Chamico</b>        | 24.25 |
| <b>M. Arvensis</b>    | 15.02 |
| <b>M. pamba poleo</b> | 12.57 |
| <b>H. luisa</b>       | 10.02 |
| <b>Cedron</b>         | 23.56 |
| <b>Matico</b>         | 24.01 |
| <b>Ruda</b>           | 12.43 |

### 3.1.2 Método de Extracción por Maceración

Con este segundo método se obtuvieron extractos cuyo rendimiento se reporta en la tabla 2.

**Tabla N° 2** Rendimiento de 10 Especies Vegetales Obtenidas por Maceración



| Especie        | %/p/v |
|----------------|-------|
| Borraja        | 120   |
| M. poleo       | 120   |
| Romero         | 130   |
| Chamico        | 130   |
| M. Arvensis    | 115   |
| M. pamba poleo | 120   |
| H. luisa       | 135   |
| Cedron         | 123   |
| Matico         | 110   |
| Ruda           | 100   |

### 3.1.3 Actividad Biocontroladora de Extractos

#### Evaluación por Ensayo de Difusión en Agar

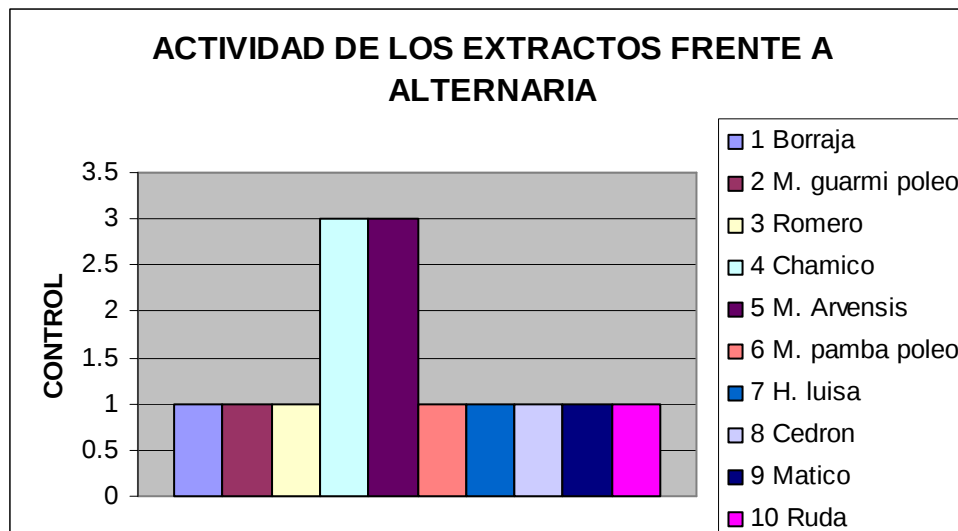
Los ensayos realizados por medio de difusión en agar no nos dio un valor de inhibición muy bueno lo podemos justificar debido a un bajo índice de control del medio.

#### Ensayo en placas ELISA

Para establecer el nivel de actividad se diseñó la escala que se reporta a continuación:

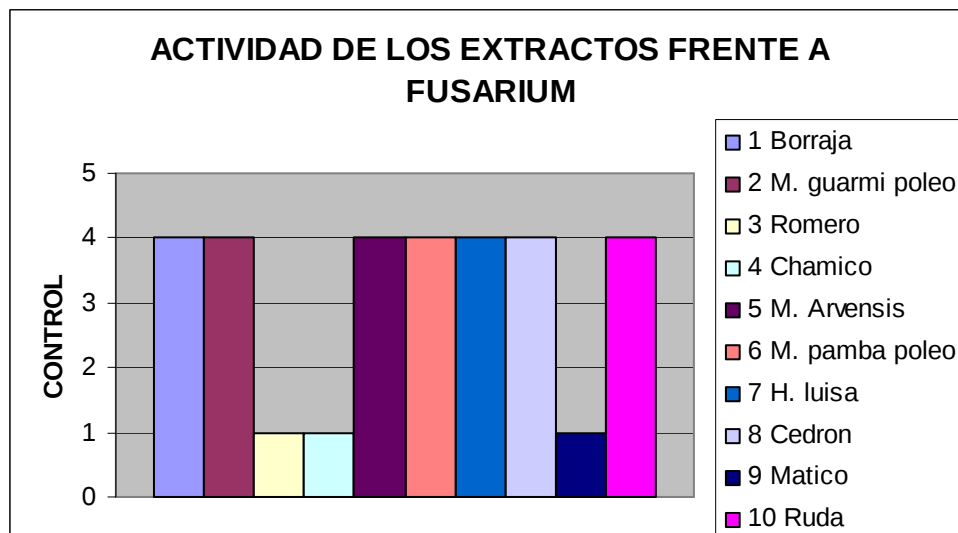
| <b>Nivel de actividad</b> | <b>NIVEL</b> |
|---------------------------|--------------|
| No actúan                 | 1            |
| Débil                     | 2            |
| Moderado                  | 3            |
| Control total             | 4            |

Tabla N° 3



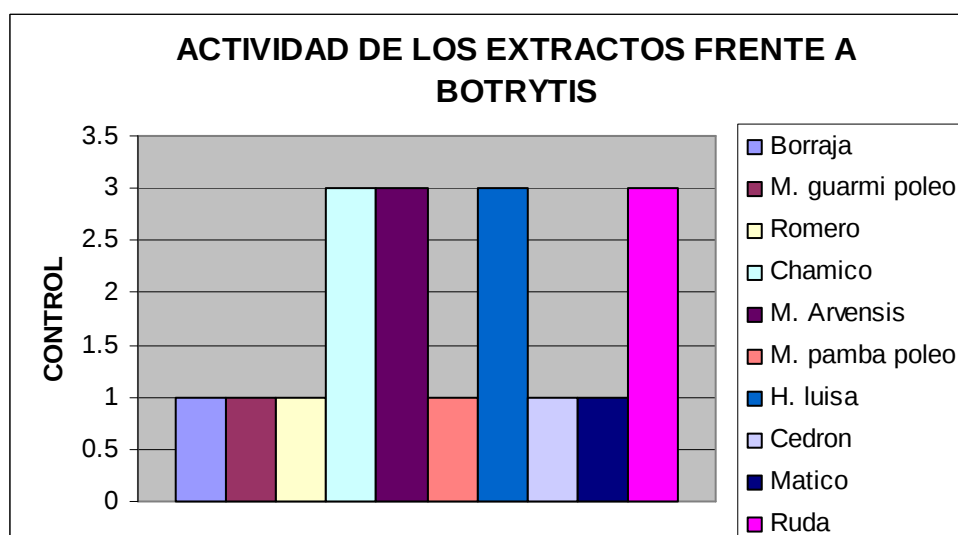
Analizando los resultados se observa que los extractos de chamico y guarmi poleo presentan una actividad biocontroladora moderada frente a Alternaria, los restantes extractos presentan un nivel de actividad débil.

Tabla N° 4



Se determina que los extractos de borraja, menta poleo, guarini poleo, hierba luisa, cedrón, ruda, presentan un nivel de control total. Los extractos de chamico, romero y matico no son eficientes en el control de fusarium.

Tabla N° 5



Se observa que los extractos de chamico, menta acuática, hierba luisa y ruda presentan un nivel de control moderado. Los extractos de restantes presentan un nivel de control débil.

### 3.2 Discusión

En base a los resultados obtenidos en este trabajo podemos establecer una comparación de la actividad biocontroladora de los extractos y de los aceites esenciales de las especies de Menta Acuática (Guarmi Poleo), valorando su actividad frente a **Alternaria** demostraron un nivel de un control moderado, en tanto que los aceites esenciales de estas especies observamos que el aceite esencial de menta presenta un control del 100% .Esto demuestra que para esta especie el control del patógeno Alternaria se alcanza mediante el uso del aceite esencial. (Cárdenas – Zhimnay 2006)

Los resultados de actividad biocontroladora ante **Fusarium**, de los extractos vegetales y aceites esenciales; se observa el grupo de las mentas, Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), Cedron (*Lippia citriodora*) y Ruda (*Ruta graveolens*) controla en un 100% al hongo. En tanto que los aceites de las mismas especies alcanza porcentajes de control del 50 y 75% (Cárdenas – Zhimnay 2006)

En el caso de **Botrytis** los extractos demuestran un nivel de control moderado con los extractos Chamico (*Datura ferox*), Menta Arvensis (*Mentha Arvensis*) hierba luisa (*Cymbopogon citratos*) y ruda (*Ruta graveolens*).

Se reporta también la actividad del extracto de chamico (*Datura ferox*), los para *Alternaria* y *Botrytis* en nivel 3 (control moderado) de acuerdo a los resultados obtenidos en los bioensayos desarrollados.

En base a este análisis podemos señalar que los resultados obtenidos con los extractos vegetales, difieren para las especies de menta ( *Mentha* , *Mentha poleo*, *mentha arvensis*) las que demuestran una eficiente capacidad de control como aceites esenciales.

Los extractos vegetales de chamico (*Datura ferox*), presentan actividad biocontroladora para *Alternaria* y *Botrytis*, en cambio el de Borraja

(*Borrigo officinalis*) presenta actividad biocontroladora solo para *Alternaria*.

Esto nos anima a pensar que el aporte de este trabajo genera la posibilidad de uso y desarrollo de potenciales alternativas de control, amigables con el ambiente, de fácil preparación en fincas y al alcance del pequeño y mediano agricultor.

En especial, los resultados obtenidos para *Fusarium* se deben resaltar debido a que este fitopatógeno por su naturaleza es uno de los más agresivos y difíciles de controlar.

Será importante, entonces, desarrollar pruebas a nivel de invernadero y campo para corroborar los resultados obtenidos en este trabajo preliminar.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El trabajo experimental desarrollado en este trabajo de investigación nos permite establecer las siguientes conclusiones.

- La actividad biocontroladora de especies aromáticas y medicinales difiere en función de la parte y forma de aplicación del vegetal.
- Los extractos vegetales, contienen una mezcla heterogénea de principios activos que en este trabajo presentaron diferencias de acuerdo al método de extracción usado para su obtención, lo que puede potenciar o disminuir su actividad biocontroladora.
- De las diez especies estudiadas para determinar en actividad biocontroladora como extractos. Las especies borraja y chamico en extractos obtenidos por maceración demuestran controlar a los patógenos *Fusarium sp*, *Alternaria* y *Botrytis*.
- Recomendamos que en base a los resultados obtenidos se desarrollen los ensayos de invernadero y campo que validen la efectividad de los extractos vegetales como biocontroladores
- Sería importante continuar con este tipo de trabajo, buscando nuevas especies que tengan reportados efectos repelentes a plagas agrícolas.
- Las alternativas que se generan para el desarrollo de biocontroladores constituyen un aporte importante para el avance de la producción orgánica que garantice productos sanos y menor contaminación ambiental.

## BIBLIOGRAFIA

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

BANDONI.A.L. (2000) Concretos de especies silvestres argentinas. En: Anales X Congreso S.A.I.P.A., pag. 224.

BERMUDEZ.A (1999)Enfoques Metodológicos para la Investigación Etnobotánica sobre plantas Medicinales.

BUNCH (1997) *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Caracas. pag.520

BUCHANAN,B.,Gruissem,W.,Jones,R.,Eds.2000 ). Natural products, Biochemistry & Molecular Biology of Plants Physiologists

CHIRIBOGA, Carlos. Guia de microbiologia para tercer nivel. Escuela Politecnica. Facultad de ciencias Agropecuarias. IASA. Sangolqui, 23 de Agosto de 2007. Pag. 142 – 145

DEACON, J .W. *Introduction to Modern Mycology*. Traducido por JIMENEZ Javier. 2da.Ed. Editorial Limusa. Mexico. 1988. Pag. 270 – 285. ISBN: 0-632-01156-4ay, Santiago. Pag.254.

FAJARDO C. M. 2005. Extractos acuosos y etanólicos en el control del hongo *Alternaría solani* en laboratorio. Tesis de Maestría en Ciencias en productividad de agroecosistema. ITAO No 23 Nazareno, Oaxaca. México. 95 p.

GROSS, E. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Washington, D.C: OEA. 134p. (Monografía No. 30. Serie de Química).

HOFFMANN, A. 1998. Flora Silvestre de Chile (matico), Zona Central. Edición 4. Fundación Claudio G WHITE, Alan. Herbs of ecuador.3ra Ed. Ediciones Libri Mundi. Quito – Ecuador 195. Pag.202

SANJUAN 2005. Evaluación de extractos vegetales para el control de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) en calabacita (*Cucúrbita pepo*), frijol (*Phaseolus sp.*) Y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de Maestría en Ciencias en productividad de agroecosistema. ITAO No 23 Nazareno, Oaxaca. México. 70 p.

WHITE, Alan. Herbs of Ecuador.3ra. Ed. Ediciones Libri Mundi. Quito – Ecuador 1985. Pag. 202

### REFERENCIAS ELECTRONICAS:

EUGENIA M. M. 2004. Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales Agencia Córdoba Ciencia-Unidad CEPROCOR. [www.monografias.com](http://www.monografias.com). Consultado 7 diciembre 2007.

GONCALVEZ, Carlos *Aromaterapia* [en línea]. [200] [ref. de 11 de junio de 2008]. Disponible en: [www.pr.fagro.edu.uy/fitopato/index.html](http://www.pr.fagro.edu.uy/fitopato/index.html).

GONZALES, Pablo. Enfermedades del Tomate[en línea]. Facultad de Agronomía/Unidad de Fitopatología. [Montevideo, Uruguay]. Febrero 2008 [ref. de 5 de noviembre de 2008]. Disponible en :[http.pr.fagro.edu.uy/fitopato/index.html](http://pr.fagro.edu.uy/fitopato/index.html)

MARTINEZ, Vicent. Plantas Medicinales (Medicina Natural) [en línea] 1998 [ref. de 11 de Marzo de 2008] Disponible en: [www.botanical-online.com/medicinalsborraja.htm](http://www.botanical-online.com/medicinalsborraja.htm)

PIZARRO, Arelis *Cymbopogon Citratus* (DL) stapf (caña santa) [en línea].1997 [ref. de 08 de noviembre de 2008]. Disponible en Web: [www.monografias.com/trabajo29/cana-santa/cana-santa.shtml](http://www.monografias.com/trabajo29/cana-santa/cana-santa.shtml)

RUEDA, Alfredo. SHELTON, Anthony. Tizon Temprano [ en línea]. Coronell internacional institute for food, agricultura and Developed. Abril

1995 [ref. de 5 de octubre 2008]. Disponible en web [www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/spanish/eblight.html](http://www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/spanish/eblight.html).

SANTANA, Omar. Las confusas mentas [en línea]. Febrero 2005 [ref. de 21 de septiembre 2008] disponible en Web: [www.jardinactual.com/articuloshtm2.phparticulo284](http://www.jardinactual.com/articuloshtm2.phparticulo284)

STENGLE, M.; STAHL-BISKUP, E. Seasonal variation of the essential oil of European Pennyroyal (*mentha pulegium* L.) [en línea]. [s.a.] [ref. de 15 de septiembre de 2008]. Disponible en Web: [www.actahort.org/books/344/344\\_5.htm](http://www.actahort.org/books/344/344_5.htm)

SISA, Joan Cedron(*Lippia citriodora*). [línea]. [s.a] 2007. [ref. de 8 de octubre de 2008]. Disponi

SHELLI. 1971. Pasturas, malezas y plagas2chamico.htm [en línea]. [s.a.] [ref. 12 de diciembre de 2008].

## ANEXO 1

## Ficha de Recolección de Material Vegetal

|                       |                                        |
|-----------------------|----------------------------------------|
| Nombre:               | Hierba Luisa/ <i>cymbopogon citrus</i> |
| Familia:              | Poaceae                                |
| Parte de la planta:   | Follaje                                |
| Lugar de recolección: | San Joaquin                            |
| Ciclo de vida:        | Perenne                                |
| Peso muestra:         | 250gr                                  |
| Rendimiento:          | (1) 24.01ml/kg (2) 135                 |
|                       |                                        |

|                      |                           |
|----------------------|---------------------------|
| Nombre:              | Menta/ <i>menta poleo</i> |
| Familia              | Lamiaceae                 |
| Parte de la planta   | Follaje                   |
| Lugar de recolección | Sayausi                   |
| Ciclo de vida        | Perenne                   |
| Peso muestra         | 250gr                     |
| rendimiento          | (1)22.51 ml/kg (2)120     |
|                      |                           |

|                      |                               |
|----------------------|-------------------------------|
| Nombre               | Menta/ <i>Mentha aquatica</i> |
| Familia              | Lamiaceae                     |
| Parte de la planta   | Follaje                       |
| Lugar de recolección | Quingeo                       |
| Ciclo de vida        | Perenne                       |
| Peso muestra         | 300gr                         |
| rendimiento          | (1) 15.02 ml/kg (2)115        |
|                      |                               |

|                      |                                       |
|----------------------|---------------------------------------|
| Nombre               | M.pamba poleo/ <i>Mentha pulegium</i> |
| Familia              | Lamiaceae                             |
| Parte de la planta   | Follaje                               |
| Lugar de recolección | Cuenca                                |
| Ciclo de vida        | Perenne                               |
| Peso muestra         | 300gr                                 |
| rendimiento          | (1)12.57 ml/kg (2) 120                |
|                      |                                       |

|                      |                                  |
|----------------------|----------------------------------|
| Nombre               | Cedron/ <i>Limpia citriodora</i> |
| Familia              | Verbenaceae                      |
| Parte de la planta   | Follaje                          |
| Lugar de recolección | Cuenca                           |
| Ciclo de vida        | Perenne                          |
| Peso muestra         | 300gr                            |
| rendimiento          | (1)23.56 ml/kg (2) 123           |
|                      |                                  |

|                      |                                 |
|----------------------|---------------------------------|
| Nombre               | Matico/ <i>Buddleja globosa</i> |
| Familia              | Buddlejaceae                    |
| Parte de la planta   | Follaje                         |
| Lugar de recolección | Cuenca                          |
| Ciclo de vida        | Perenne                         |
| Peso muestra         | 320gr                           |
| rendimiento          | (1)24.01 ml/kg (2) 110          |
|                      |                                 |

|                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
| Nombre               | Chamico/ <i>Datura ferox</i> |
| Familia              | Solanácea                    |
| Parte de la planta   | Follaje                      |
| Lugar de recolección | Machala                      |
| Ciclo de vida        | Perenne                      |
| Peso muestra         | 350gr                        |
| rendimiento          | (1)24.25 ml/kg (2)130        |
|                      |                              |

|                      |                                     |
|----------------------|-------------------------------------|
| Nombre               | Borraja/ <i>Borrigo officinalis</i> |
| Familia              |                                     |
| Parte de la planta   | Follaje                             |
| Lugar de recolección | Cuenca                              |
| Ciclo de vida        | Perenne                             |
| Peso muestra         | 300gr                               |
| rendimiento          | (1)19.97 ml/kg 120                  |
|                      |                                     |

|                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
| Nombre               | Ruda/ <i>Ruta graveolens</i> |
| Familia              | Rutáceas                     |
| Parte de la planta   | Follaje                      |
| Lugar de recolección | Cuenca                       |
| Ciclo de vida        | Perenne                      |
| Peso muestra         | 300gr                        |
| rendimiento          | (1)12.43 ml/kg (2)100        |
|                      |                              |

|                      |                                       |
|----------------------|---------------------------------------|
| Nombre               | Romero/ <i>Rosmarinus officialins</i> |
| Familia              | Lamiaceae (Labiatae)                  |
| Parte de la planta   | Follaje                               |
| Lugar de recolección | Cuenca                                |
| Ciclo de vida        | Perenne                               |
| Peso muestra         | 350gr                                 |
| rendimiento          | (1)25.00 ml/kg (2)130                 |
|                      |                                       |

## ANEXO 2

### 2.1 Preparación de medios de cultivo:

#### Materiales:

|                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| Balanza                | Eppendorf              |
| Autoclave              | Pipetas                |
| Mechero                | Puntas estériles       |
| Puntas                 | Cajas petri            |
| Vasos de precipitación | Tubos de ensayo        |
| Bisturí                | Centrifuga, agitadores |
| Gasas                  | Cámara de Neubauer     |
| Papel aluminio         | Microscopio            |

#### Reactivos:

|                                     |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Agar                                | Sulfato de manganeso $MgSO_4$ |
| Malta                               | Cloro                         |
| Glucosa                             | Alcohol                       |
| Puré de papa                        | Metanol comercial             |
| Extracto de levadura                | Acrosistina Nistatina         |
| Sulfato de amonio $NH_4SO_4$        |                               |
| Fosfato acido de potasio $KH_2PO_4$ |                               |
| Cloruro de calcio $CaCl_2$          |                               |

#### Medios Utilizados:

##### PDA

Agar 20gr/lit  
 Puré de papa 15gr/lit  
 Glucosa 15gr/lit

##### AGAR LEVADURA MALTA

agar 20gr/lit  
 extracto de levadura 5gr/lit  
 extracto de malta 40gr/lit

##### YMG

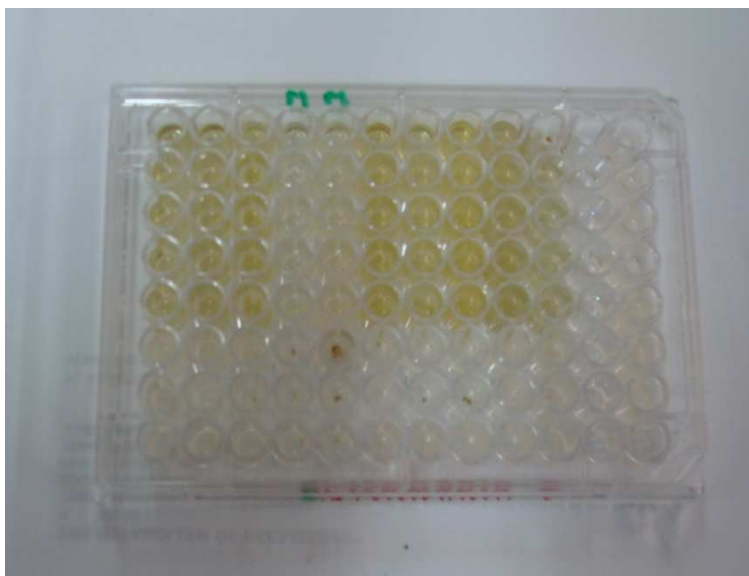
Extracto de levadura 4gr/lit  
 Extracto de malta 10gr/lit  
 Glucosa 4gr/lit  
 Agua destilada 1000gr  
 Agar 20gr/lit

##### MEDIO MINIMO

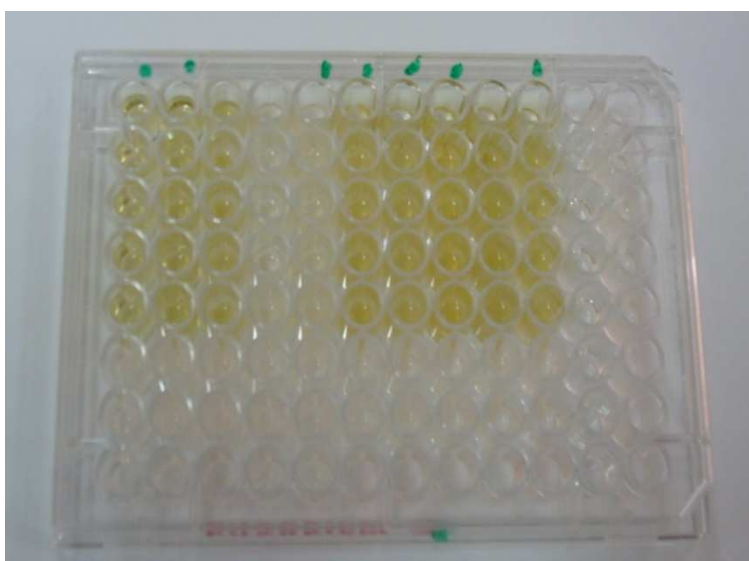
$NH_4SO_4$  0.5gr  
 $KH_2PO_4$  0.125gr  
 $MgSO_4$  0.025gr  
 $CaCl_2$  0,002gr  
 Glucosa 5gr  
 H<sub>2</sub>O Destilada 50ML

### ANEXO 3

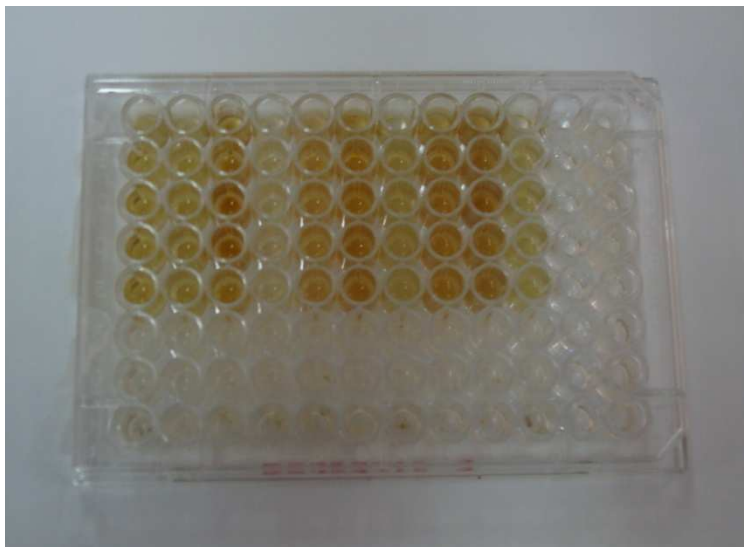
#### FOTOS DE BIOENSAYOS



Control Moderado en Chamico y Menta Arvensis



Control total en borraja, M. Guarmi poleo, M. Arvensis, M. Pamba Poleo, Hierba Luisa, Cedrón, Ruda



Control moderado en: Chamico, M. Arvensis, Hierba Luisa, Ruda.