

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**COMPARACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
EXTRACTOS ETANÓLICOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) y COLA DE
CABALLO (*Equisetum arvense*); FRENTE AL HONGO *Colletotrichum
gloeosporioides* Penz**

AUTORA:

LLIVICURA ALVARADO MERCY ALEXANDRA

TUTORA:

Dra. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD

Cuenca – Ecuador

2018

CESIÓN DE DERECHOS DEL AUTOR

Yo, Mercy Alexandra Llivicura Alvarado, con documento de identificación N° 0106890007, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **COMPARACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) y COLA DE CABALLO (*Equisetum arvense* L.); FRENTE AL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* Penz**, el que ha sido desarrollado para optar el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, está la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que entrego el trabajo en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, Octubre del 2018



.....
Mercy Llivicura Alvarado

0106890007

CERTIFICACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos, declaro que, bajo mi tutoría, fue desarrollado el trabajo de titulación: **COMPARACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) y COLA DE CABALLO (*Equisetum arvense* L.); FRENTE AL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* Penz**, realizado por Mercy Alexandra Llivicura Alvarado; obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, Octubre del 2018



.....
Dra. Inés Patricia Malo Cevallos.

0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Mercy Alexandra Llivicura Alvarado con número de cédula 0106890007 autora del trabajo de titulación: **COMPARACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) y COLA DE CABALLO (*Equisetum arvense* L.); FRENTE AL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* Penz**, certifico que el contenido total de este *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, Octubre del 2018



.....
Mercy Llivicura Alvarado

0106890007

Dedicado con mucho cariño:

A Dios, padre celestial por darme la vida, permitirme desarrollar mis capacidades y darme la fuerza necesaria para seguir adelante aun cuando los momentos fueron difíciles, quién con su mano de sabiduría me guio para llegar a ser lo que soy y cumplir con uno de mis objetivos propuestos en la vida.

A mis padres Zoila Alvarado y Claudio Llivicura, por siempre haberme brindado su amor y comprensión, además de ser un pilar fundamental en mí vida, sea este trabajo una muestra de mi profundo agradecimiento a su sacrificio, desvelos y esperanza de que llegara a ser alguien profesional en la vida.

A mi hermana Sonia, por siempre ser mi mejor compañera y amiga, por ser mi ejemplo de perseverancia y porque a pesar de nuestras diferencias me ha brindado su cariño y apoyo incondicional.

A mi sobrino, Nicolás por esas sonrisas y abrazos inocentes, quién desde el momento que llego supo llenar de alegría mis días enseñándome a ser una mejor persona.

A mis abuelitos, Manuel y Clotilde y Miguel (+) y Luisa, quienes después de mis padres han sido mi mejor ejemplo a seguir, por haberme acompañado en todo momento brindándome su cariño incondicional y haber confiado en mí, por sus sabias enseñanzas que me enseñaron a ser la persona que soy.

Mercy Llivicura

Agradezco sinceramente:

A Dios, por haberme permitido culminar con éxito esta etapa de mi vida y siempre estar presente en ella por medio de las personas que me han apoyado y ayudado.

A mis padres y hermana, quienes siempre fueron el motivo de mi superación y los promotores de mis sueños, por todo el apoyo económico y moral que me han brindado, ayudándome a que cumpla con uno de mis mayores anhelos propuestos durante mi vida estudiantil. Gracias por siempre creer en mí.

A toda mi familia, quienes creyeron en mí y me han brindado palabras de aliento que me permitieron crecer como persona.

A mis compañeros y amigas, especialmente Jhoana, Pamela y María Fernanda con quienes he compartido gratos e inolvidables momentos, así como el apoyo incondicional recibido que me permitió llevar con optimismo esta travesía por la universidad. Gracias por su cariño y amistad.

A mis profesores y tutora de tesis, Dra. Inés Malo, por brindarme sus conocimientos, experiencia, comprensión y depositar su confianza en mí trabajo experimental, motivándome a alcanzar con los objetivos propuestos. Gracias por ser un ejemplo de perseverancia, positivismo y éxito.

A la Dra. Mónica Espadero, por toda su ayuda en el laboratorio y por brindarme sus conocimientos desinteresadamente.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

EV: Extracto vegetal

EE: Extracto etanólico

R: Extracto de romero

CC: Extracto de cola de caballo

ME: Mezcla de extractos

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DCA: Diseño completamente al azar

ANOVA: Análisis de varianza

PDA: Agar papa dextrosa

ha: hectárea

kg: kilogramo

g: gramo

mm: milímetro

mL: mililitro

µm: micrómetro

µL: microlitro

°C: grados Celsius

INDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2. ANTECEDENTES	5
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	8
1.4. OBJETIVOS.....	10
1.4.1. Objetivo general.....	10
1.4.2. Objetivos específicos	10
1.5. HIPÓTESIS	11

CAPÍTULO 2

MARCO DE REFERENCIA.....	11
2.1. CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL DE ÁRBOL.....	11
2.1.1. Origen	11
2.1.2. Descripción botánica.....	11
2.1.3. Clasificación botánica.....	12
2.1.4. Condiciones agroecológicas del cultivo	13
2.1.5. Producción de tomate de árbol de árbol en Ecuador.....	13
2.1.6. Principales plagas y enfermedades	14
2.1.6.1. Género Colletotrichum.....	15

2.1.6.1.1.	Antracnosis u ojo de pollo.....	17
2.1.6.1.2.	Especies de Colletotrichum.....	17
2.1.6.1.3.	Control.....	22
2.2.	EXTRACTOS VEGETALES	23
2.2.1.	Actividad antifúngica de extractos vegetales.....	23
2.2.2.	Métodos de obtención de extractos vegetales.....	24
2.2.2.1.	Maceración	24
2.2.2.2.	Percolación	24
2.2.2.3.	Decocción.....	25
2.2.2.4.	Infusión.....	25
2.2.2.5.	Digestión	25
2.2.2.6.	Otras técnicas	26
2.2.3.	Tipos de extractos vegetales.....	27
2.2.3.1.	Extractos fluidos.....	27
2.2.3.2.	Extractos secos	27
2.2.2.4.	Extractos blancos.....	28
2.2.2.5.	Crioextractos	28
2.2.4.	Control de calidad de los extractos vegetales.....	28
2.2.4.1.	Análisis físicos-químicos	28
2.2.5.	Especies vegetales	29

2.2.5.1.	Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	29
2.2.5.1.1.	Clasificación botánica	30
2.2.5.1.2.	Principales compuestos químicos	31
2.2.5.1.3.	Actividad antifúngica	31
2.2.5.2.	Cola de caballo (<i>Equisetum arvense</i>)	32
2.2.5.2.1.	Clasificación botánica	33
2.2.5.2.2.	Componentes químicos	34
2.2.5.2.3.	Actividad antifúngica	34
2.3.	MÉTODOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	34
2.3.1.	Método de bioautografía	34
2.3.2.	Método de difusión en agar	35
2.3.3.	Microdilución en caldo	35
 CAPÍTULO 3		
	MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1.	AISLAMIENTO DEL HONGO <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , EN LABORATORIO A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL DE <i>Solanum betaceum</i> , CARACTERIZANDO EL CULTIVO	37
3.1.1.	Recolección de muestras de material vegetal de <i>Solanum betaceum</i>	37
3.1.2.	Aislamiento del fitopatógeno en condiciones de laboratorio.....	38

3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> Y <i>Equisetum arvense</i> , MEDIANTE EL MÉTODO DE MACERACIÓN, OBTENIENDO SUS METABOLITOS SECUNDARIOS.....	41
3.2.1. Procesamiento del material vegetal	41
3.2.2. Obtención de extractos etanólicos de romero y cola de caballo	43
3.2.3. Estudio de estabilidad físico-química de los extractos obtenidos.....	45
3.2.4. Tamizaje fitoquímico	47
3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS, MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR, DETERMINANDO QUE CONCENTRACIÓN TIENE MAYOR EFECTO ANTIMICROBIANO.....	53
3.3.1. Preparación del inóculo	53
3.3.2. Preparación de los extractos vegetales a diferentes concentraciones	56
3.3.3. Comparación de la actividad antifúngica de los extractos mediante prueba de sensibilidad por discos.....	59
3.4. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO, DETERMINANDO SU ACCIÓN ANTIFÚNGICA	61
3.4.1. Preparación del caldo papa	61
3.4.2. Preparación del inóculo	62
3.4.3. Microdilución.....	63

3.4.4. Revelación de la microplaca	65
 CAPÍTULO 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL HONGO <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	66
4.1.1. Recolección de muestras de <i>Solanum betaceum</i> y aislamiento del fitopatógeno en condiciones de laboratorio.....	66
4.1.2. Identificación del hongo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	67
4.1.2.1. Pruebas macroscópicas de las características fúngicas	67
4.1.2.2. Pruebas microscópicas de las características fúngicas	70
4.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> Y <i>Equisetum arvense</i>	72
4.2.1. Análisis de la estabilidad físico-química de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Equisetum arvense</i>	72
4.2.2. Ensayos para el análisis fitoquímico de los extractos.....	74
4.3. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DISCOS	78
4.4. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	86
 CAPÍTULO 5	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	89
5.1. CONCLUSIONES.....	89

5.2. RECOMENDACIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Solanum betaceum</i> en su estado inicial de crecimiento.....	13
Figura 2: Frutos de <i>Solanum betaceum</i> en óptimo desarrollo.....	14
Figura 3: Conidios asexuales y morfología colonial de <i>C. truncatum</i>	18
Figura 4: Conidios asexuales y morfología colonial de <i>C. gloeosporioides</i>	18
Figura 5: Características morfológicas de <i>C. fructicola</i>	19
Figura 6: Morfología colonial y conidios de <i>C. musae</i>	20
Figura 7: Morfología colonial y conidios de <i>C. acutatum</i>	21
Figura 8: Morfología colonial y conidios de <i>C. capcisi</i>	21
Figura 9: <i>Rosmarinus officinalis</i> en su hábitat natural.....	30
Figura 10: <i>Equisetum arvense</i> en su hábitat natural.....	33
Figura 11: Lesiones necrosadas típicas de la antracnosis.....	37
Figura 12: Selección y tratamiento de tejido enfermo de las muestras.....	38
Figura 13: Siembra de las muestras en medio nutritivo PDA.....	39
Figura 14: Resiembra de colonias aisladas.....	39
Figura 15: Características morfológica y conidios de <i>C. gloeosporioides</i>	40
Figura 16: Secado natural y mecánico de <i>Rosmarinus officinalis</i>	42
Figura 17: Maceración de las especies vegetales.....	43
Figura 18: Filtración del macerado en la bomba de vacío Millipore.....	43

Figura 19: Recuperación del solvente en el rotavapor.....	44
Figura 20: Medición de la densidad por el método del picnómetro.....	46
Figura 21: Ensayo para catequinas para <i>Rosmarinus officinalis</i>	48
Figura 22: Saponinas presentes en <i>Rosmarinus officinalis</i>	49
Figura 23: Ensayo de Shinoda para los extractos estudiados.....	49
Figura 24: Ensayo de Dragendorff para los extractos de romero y cola de caballo.....	50
Figura 25: Ensayo para determinar taninos en los extractos.....	51
Figura 26: Ensayo para determinar la presencia de fenoles en los extractos estudiados....	52
Figura 27: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> utilizado para el lavado de esporas.....	53
Figura 28: Conteo de esporas en la cámara de Neubauer bajo el lente de un microscopio compuesto con aumento de 40X.....	55
Figura 29: Filtración de los extractos mediante filtros Millipore previo a la dilución de los mismos.....	56
Figura 30: Distribución de los discos para evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos.....	59
Figura 31: Filtración del caldo papa.....	61
Figura 32: Preparación de la microplaca.....	63
Figura 33: Revelación de la microplaca con resarzurina.....	64
Figura 34: Características morfológicas de la colonia de <i>C. gloeosporioides</i>	67
Figura 35: Conidios de <i>C. gloeosporioides</i> bajo el lente 40X de un microscopio compuesto.....	69
Figura 36: Gráfica de Normalidad.....	81
Figura 37: Diagrama de cajas de los porcentajes de inhibición de los EE de R, CC y ME.....	83

Figura 38: Revelación de la microplaca mediante resarzurina tras dos horas de incubación.....	85
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Materiales usados para la recolección de muestras de <i>Solanum betaceum</i>	37
Tabla 2: Equipos y materiales usados para el aislamiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en laboratorio	38
Tabla 3: Equipos y materiales utilizados para la recolección y secado de las especies vegetales	41
Tabla 4: Equipos y materiales utilizados para obtener los extractos de romero y cola de caballo.....	43
Tabla 5: Equipos y materiales para la determinación de los parámetros físicos-químicos de los extractos	45
Tabla 6: Equipos y materiales utilizados para la caracterización cualitativa de los extractos	48
Tabla 7: Equipos y materiales utilizados para la obtención de conidios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	54
Tabla 8: Equipos y materiales usados para determinar la concentración de esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	55
Tabla 9: Equipos y materiales utilizados para la preparación de los extractos	56
Tabla 10: Tratamientos evaluados para determinar la actividad antimicrobiana de romero y cola de caballo	58
Tabla 11: Equipos y materiales para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de romero y cola de caballo frente a <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	59

Tabla 12: Diseño experimental para determinar la actividad antifúngica de los extractos .	61
Tabla 13: Equipos y materiales usados para la preparación del caldo papa.....	61
Tabla 14: Equipos y materiales utilizados para la preparación de la microplaca.....	63
Tabla 15: Tratamientos aplicados en la microplaca	64
Tabla 16: Cultivos aislados a partir de órganos de <i>Solanum betaceum</i>	66
Tabla 17: Características macroscópicas de la colonia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	67
Tabla 18: Cantidad de materia prima usada y volumen obtenido en la extracción por maceración.....	72
Tabla 19: Parámetros físicos-químicos y caracteres organolépticos evaluados para cada extracto	72
Tabla 20: Análisis fitoquímico de las especies evaluadas <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Equisetum arvense</i>	74
Tabla 21: Diámetros en mm de los halos de inhibición generados por los tratamientos evaluados sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	79
Tabla 22: Porcentaje de inhibición del hongo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	80
Tabla 23: Test de Normalidad obtenido mediante el programa estadístico SPSS	82
Tabla 24: Análisis ANOVA sobre el porcentaje de inhibición de extractos etanólicos sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	83
Tabla 25: Prueba de Tukey realizada para el porcentaje de inhibición de <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i>	85

RESUMEN

En la presente investigación se planteó comparar la actividad antifúngica de extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. [Romero] y *Equisetum arvense* L. [Cola de Caballo] frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. determinando su eficacia como fungicida natural. Se evaluó el efecto de la aplicación de extractos de *Rosmarinus officinalis* L. [Romero], *Equisetum arvense* L. [Cola de Caballo] y la mezcla de ambos en el control *in vitro* de la antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., mismo que fue aislado a partir de frutos de tomate de árbol de árbol [*Solanum betaceum* Cav.] y caracterizado mediante pruebas en laboratorio. Los extractos se obtuvieron por maceración, utilizando como solvente etanol al 96%. La actividad antifúngica se demostró mediante el método de Kirby – Bauer, utilizando concentraciones de 30%, 60% y 100% para todos los tratamientos, Romero [R], Cola de Caballo [CC] y Mezcla de extractos [ME]; observándose resultados favorables a una concentración del 100% para todos, con un diámetro de inhibición de 7.40 mm para R, 7.15 mm para ME y 6.79 mm para CC. Para la determinación de la CMI se utilizó el método de microdilución en placa para lo cual se empleó concentraciones de 75%, 37.5%, 18.75%, 9.37%, 4.68%, 2.34%, 1.17% y 0.58% para R y 80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25% y 0.63% para CC y ME, demostrando que 18,55% para R, 20% para CC y 40% para ME fueron las concentraciones óptimas de inhibición frente al fitopatógeno. El diseño estadístico dispuesto fue completamente al azar con 3 repeticiones, se realizó el ANOVA y se compararon las medias a través del Test de Tukey. Los resultados indican la baja capacidad antimicrobiana de los extractos para el control *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Palabras Claves: Antracnosis, extractos *etanólicos*, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., *Rosmarinus officinalis* L., *Equisetum arvense* L., Kirby-Bauer, CMI.

ABSTRACT

The following investigation was proposed to compare the antifungal activity of *Rosmarinus officinalis* L. [Romero] and *Equisetum arvense* L. [Cola de Caballo] ethanolic extract`s against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., determining its efficacy as a natural fungicide. The effect of the application of *Rosmarinus officinalis* [Romero], *Equisetum arvense* L. [Cola de Caballo] extracts and the mixture of both was evaluated in the *in vitro* control of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., which was isolated from tree tomato fruits [*Solanum betaceum* Cav.] and characterized by laboratory tests. The extracts were obtained by maceration, using 96% ethanol as solvent. The antifungal activity was demonstrated by the Kirby - Bauer method, using concentrations of 30%, 60% and 100% for all the treatments, Romero [R], Cola de Caballo [CC] and Mixture of extracts [ME]; it was shown favorable results at a 100% concentration for all, with an inhibition diameter of 7.40 mm for R, 7.15 mm for ME and 6.79 mm for CC. The determination of the MIC was given by the microdilution method, using the concentrations of 75%, 37.5%, 18.75%, 9.37%, 4.68%, 2.34%, 1.17% and 0.58% for R and 80% 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25% and 0.63% for CC and ME, it was shown that 18.55% for R, 20% for CC and 40% for ME were the optimal concentrations of inhibition against the phytopathogen. The statistical design was completely randomized with 3 repetitions and the ANOVA was performed, the averages were compared through the Tukey test. The results indicate the low antimicrobial capacity of the extracts for the *in vitro* control of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Key words: Anthracnose, ethanolic extracts, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.
Rosmarinus officinalis L., *Equisetum arvense* L., Kirby-Bauer, MCI

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Ecuador está considerado como uno de los países más mega diversos a nivel mundial, esta riqueza natural desafortunadamente es poco conocida, incluso por los mismos ecuatorianos, puesto que la gran mayoría de estas plantas no han sido estudiadas, dejando un campo amplio para el desarrollo de nuevas investigaciones (Fonseca, 2016).

En los últimos años los extractos vegetales han llamado la atención de la ciencia, convirtiéndose en un área amplia de investigación y desarrollo debido a la gran acogida que tiene dentro de los diferentes tipos de industrias. Estudios realizados han demostrado que los tratamientos con extractos de origen vegetal favorecen al control biológico de diferentes microorganismos. Esta actividad se le ha atribuido a los metabolitos secundarios presentes en los extractos (Sánchez, Vargas & Jiménez, 2015).

El hongo *Colletotrichum* es uno de los géneros patógenos de plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo ya que no tiene especificidad por ningún tipo de cultivo. Este patógeno es el agente causal de la antracnosis, los síntomas característicos de esta enfermedad son lesiones necrosadas que se expanden rápidamente a través del órgano afectado, ocasionando incluso la muerte de la planta (Pérez Castro, Saquero, & Beltrán Herrera, 2013). La antracnosis es de suma importancia en la agricultura moderna, debido a que si no destruye la totalidad de la cosecha, disminuye drásticamente el rendimiento del cultivo (Jiménez, Álvarez, Mejía & Ochoa, 2012).

La severidad de esta enfermedad ha llevado a los agricultores a la aplicación exagerada de fungicidas sintéticos, causando serios problemas como la contaminación al ambiente,

deteriorando la calidad de los productos, aumentando los costos de producción y en algunos casos llevando al abandono total del cultivo ante el fracaso de esta práctica (Bolívar, Sanabria, Camacaro, Ulacio, Cumana & Crescente, 2009). A esta problemática se suma la resistencia de las plagas frente a la aplicación de agroquímicos, el inadecuado manejo del cultivo y el control de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., debido a la poca información existente acerca de la estructura y el ciclo de vida e infección del fitopatógeno, agravando aún más la situación (Giraldo, Bustamante, Pinzón & Buitrago, 2016). “Asimismo, algunos productores con la finalidad de mantener el mayor tiempo de vida de anaquel de sus productos, aplican dosis elevadas de compuestos químicos días antes de su comercialización, impidiendo que estos puedan degradarse y con ello reduce la calidad biológica de los productos a expenderse” (González, Báez & Zaragoza, 2016).

Diversos autores alrededor del mundo han reportado la actividad antifúngica de aceites esenciales o extractos vegetales y sus respectivos metabolitos mediante pruebas *in vitro* o *in vivo*; obteniendo variación en los resultados dependiendo del órgano de la planta utilizada y la especie, la técnica de extracción utilizada para la obtención de los metabolitos secundarios, el tipo de fitopatógeno y el método de evaluación utilizado (González, Báez & Zaragoza, 2016).

Dentro del gran número de especies que posee el Ecuador, para esta investigación se ha seleccionado dos especies endémicas de la Sierra Ecuatoriana, como son *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y *Equisetum arvense* L. (cola de caballo), permitiendo conocer el potencial biotecnológico de estas plantas frente a hongos fitopatógenos, implementando bases científicas para una posible solución sustentable al problema agrícola de las plagas. Por lo que se ha planteado como objetivo comparar la actividad antifúngica de los extractos

etanólicos de las plantas mencionadas frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. determinando su eficacia como fungicida natural.

1.1.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Ecuador es un país agrícola por excelencia. Sin embargo, esta actividad se ha visto afectada por la invasión de plagas y enfermedades que afectan directamente la producción de los cultivos. El cultivo de tomate de árbol en este país se ha incrementado considerablemente, existiendo alrededor de 5000 hectáreas, con una producción que oscila entre 60 y 80 toneladas por hectárea/año (Ojeda, 2016). Las provincias relevantes en la producción de esta fruta son: Imbabura, Tungurahua, Chimborazo, Azuay y Pichincha.

Los destinos de exportación de tomate de árbol apuntan principalmente a Europa, debido a la facilidad de libre mercado que ofrece; recientemente, Estados Unidos fue incluido como destino de exportación, siendo obligatorio un certificado fitosanitario que garantice la inocuidad del producto (Coellar, 2009). El tomate de árbol de calidad se reconoce por la apariencia sana de su piel sin manchas, golpes, ni picaduras, con un color intenso y brillante (Alzate, Mier, Afanador, Durango & García, 2012).

Sin embargo, la falta de plantas certificadas y un deficiente manejo del cultivo han influido para la diseminación de plagas y enfermedades, siendo una de las principales la Antracnosis, producida por especies de *Colletotrichum*. La antracnosis es una enfermedad de importancia económica, así como una seria amenaza para la producción de tomate de árbol a nivel mundial. Debido a que afecta directamente a la superficie del fruto y por ende a la calidad y su comercialización (Ramírez, Gil & Morales, 2017).

Para contrarrestar esta problemática los productores han optado por el uso de agroquímicos, que han traído consigo diferentes inconvenientes, entre los que destacan la toxicidad en humanos (Paulitz & Bélanger, 2001), detenciones de exportaciones por residuos en productos, daños al ambiente (Ramírez & Jacobo, 2002) y efectos perjudiciales en organismos benéficos que cumplen su rol como enemigos naturales de las plagas, ocasionando su proliferación (Anderson, y otros, 2003), también la pérdida de especies no objetivo como son aves, abejas o peces. Más aún, los fitopatógenos podrían desarrollar resistencia a ingredientes activos de los fungicidas sintéticos, requiriendo el uso de altas dosis y la búsqueda de nuevos agroquímicos para reemplazar a los que han mostrado resistencia en hongos.

Dado a la peligrosidad que presentan los plaguicidas para la salud humana y el ambiente, estos deben ser manipulados por personal capacitado, sin embargo en Ecuador tres de cada diez hectáreas tratadas con plaguicidas son trabajadas por productores que no han recibido capacitación técnica sobre su manejo (INEC, 2013).

Debido a la problemática por el uso indiscriminado de los fungicidas sintéticos, es necesario desarrollar alternativas naturales para el control de enfermedades. Una de estas estrategias es el uso de extractos vegetales y/o aceites esenciales (España, Arboleda, Ribeiro, Abdelnur & Guzmán, 2017). Además de tener origen biológico, son biodegradables y manifiestan un mínimo impacto sobre la salud humana y el ambiente (Ochoa, Cerna, Landeros, Hernández & Delgado, 2012).

1.2.ANTECEDENTES

El tomate de árbol es originario de los Andes, se cultiva en climas tropicales y no necesita gran humedad, siendo la Cordillera de los Andes idónea para este tipo de cultivo por sus condiciones ecológicas. En América Latina es cultivado en países como Chile, Argentina, Perú, Brasil, Venezuela, Costa Rica, Bolivia, Guatemala; pero en Ecuador y Colombia es en donde su producción es elevada (Ojeda, 2016). La sierra Ecuatoriana posee zonas caracterizadas por climas templados y suelos ricos en materia orgánica que favorecen el cultivo de tomate de árbol. Ibarra, San Gabriel, Bolívar, Tumbaco, Puembo, Tambillo, Latacunga, Salcedo, Pelileo, Baños, Biblian, Paute, Girón, Santa Isabel, Loja; son las zonas con mayor producción de tomate de árbol en el Ecuador.

Aproximadamente desde los años 40, el uso de plaguicidas ha aumentado de manera continua, llegando a cinco millones de toneladas en el año 2000 a escala mundial. Estudios demuestran que el 0.1% de la cantidad de plaguicidas aplicado llega a la plaga, mientras que el resto circula por el medio ambiente; contaminando ecosistemas terrestres, acuáticos y la biosfera en general. Estudios en el ámbito internacional revelan la gravedad del problema. Una investigación realizada en la India por Duet (1996), reportó niveles de DDT de 2.26 ppm en el suelo y 0.18 ppm en el agua, en una zona aledaña a un centro poblado en donde se controlaba la malaria.

En el estado de Sinaloa [México], la aplicación de compuestos químicos en la agricultura han sido las principales fuentes de contaminación y afecciones en la salud (García & Rodríguez, 2012). Según Albert (2008), estos problemas fueron suscitados debido al aumento en la aplicación de herbicidas -glifosato, paraquat-, insecticidas - compuestos organofosforados: malatión- y fungicidas -mancozeb, clorotalonil-. En este

país se calcula que el mayor porcentaje de plaguicidas son utilizados en cultivos de maíz, algodón, chile, tomate de árbol, papa, trigo, café, aguacate (Albert, 2008).

Según Endréu (2011), señala que uno de los países con mayor uso de agroquímicos es Costa Rica, llegando a 51.2 kg/ha, no obstante países como Colombia y Ecuador también emplean una cantidad significativa de compuestos químicos correspondiente a 16.7 kg/ha y 6 kg/ha respectivamente.

El uso de plaguicidas en Ecuador data de 1950, pero llegó a su punto máximo luego de la reforma agraria [1964 - 1979] (INEC, 2013), a partir del cual los agricultores fueron perdiendo sus conocimientos ancestrales, llegando a depender únicamente de plaguicidas.

Según un estudio realizado por ECOSALUD-CID, en el año 2006; El Carchi tiene el nivel más alto de intoxicaciones por plaguicidas en el Ecuador y más de la mitad de la población de la provincia tiene daños en su sistema nervioso. También, se ha registrado la presencia de residuos de plaguicidas que superan los límites máximos permitidos en sus productos agrícolas (Narváez, Morillo, Chamorro & Mora, 2015).

El 70% de los hombres y el 80% de las mujeres no entienden el significado de los códigos de colores en las etiquetas, siendo un factor clave para el manejo de estos productos (Albert, 2008). Furadan y Monitor, son pesticidas considerados altamente tóxicos, su comercialización y utilización es restringida en países desarrollados, y prohibida en países subdesarrollados como el Ecuador, sin embargo, es común encontrar estos productos circulando por los diferentes cultivos (Narváez, Morillo, Chamorro & Mora, 2015). En 2012 Manabí invirtió 36 millones de USD para el manejo fitosanitario de más de 152 000 hectáreas de 14 cultivos. Otro es el caso en la región Costa, en donde los últimos

años se alcanzó el 53% de intoxicaciones en humanos reportados en el país (Valarezo & Muñoz, 2012).

Los productos y sistemas naturales utilizados antes de la aparición de los productos químicos vuelven a ser demandados en la época actual, debido a la concientización de la gente por consumir productos saludables y contribuir con el desarrollo sostenible del ambiente. Nuevas técnicas optadas por la agricultura ecológica como son policultivos, manejo integrado de plagas y agroecología contribuyen a disminuir el uso de prácticas que la agricultura convencional ha implementado desde la llamada Revolución Verde (Villacis, León, Santana, Mangui, Carranza & Pazmiño 2017).

El uso de extractos vegetales para combatir plagas y enfermedades en la agricultura ha tomado gran importancia a nivel mundial, siendo México uno de los pioneros en el desarrollo de esta nueva tecnología, así lo demuestra Cáceres et al. (2013), en su estudio “Actividad antifúngica de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*”; en donde comprobó que la actividad biológica que presentan estos extractos se debe a la composición química de los mismos, siendo los compuestos fenólicos y flavonoides los más importantes.

Hoy en día la tendencia de volver a las fórmulas que la naturaleza brinda ha tomado fuerza, optando por fórmulas orgánicas y naturales; y conseguir a partir de extractos naturales sustancias que cumplan la misma u optimicen la función de los plaguicidas sintéticos, con la ventaja que brindan principalmente soberanía alimentaria y un ambiente ecológicamente viable (Rodríguez, Asela, Suárez & Estrada, 2014).

1.3.JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador, la agricultura se ha basado en patrones tecnológicos propiciados por países desarrollados para controlar plagas y enfermedades que afectan a los cultivos; el hombre en su intento de controlar estos problemas, crea una alta dependencia al uso de agroquímicos de elevados costos y el uso indiscriminado de los mismos ha causado alteraciones en el equilibrio natural y en la salud de los productores y consumidores (Ojeda, 2016).

En la actualidad existe una gran variedad de plantas que crecen y son recolectadas en el Ecuador, ya que contienen metabolitos secundarios que presentan actividad farmacológica; por lo mismo son utilizadas para fines terapéuticos como es el caso del romero [*Rosmarinus officinalis* L.] que es utilizado principalmente como digestivo o carminativo (López, 2012); mientras que la cola de caballo [*Equisetum arvense* L.] es usada como depurativo, diurético, astringente, antioxidante y antiinflamatorio (Azüero, Jaramillo, & D'Armas, 2016).

Sin embargo, a la mayoría de estas plantas no se les ha realizado un estudio profundo para conocer los múltiples beneficios que estas poseen, incluyendo así el uso de plantas o partes de ellas para contrarrestar plagas y enfermedades en la agricultura.

Uno de los controles que ha adquirido importancia en los últimos años, es aquel que basa su acción en el uso de sustancias de origen natural, es decir, extractos obtenidos de plantas cuyos metabolitos secundarios tengan acción fungicida, bactericida o herbicida (Pérez, Rojas, Chamorro, & Perez, 2013).

El cultivo de tomate de árbol es una de las actividades principales que se desarrollan en el Ecuador, sin embargo se ha visto afectado por un sin número de plagas y enfermedades, destacándose entre estas la –antracnosis-, cuyo agente causal es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., provocando grandes pérdidas económicas. En consecuencia, los fruticultores han optado por el uso de agroquímicos que ha sido la principal estrategia para reducir la enfermedad (Villacis et al., 2017).

El uso indiscriminado de estos productos ha provocado graves problemas, entre los que desatacan el incremento de residuos químicos potencialmente tóxicos al humano y ambiente y la proliferación de fitopatógenos resistentes (Cremer & Glayeto, 2014).

Los problemas mencionados anteriormente, sumado al aumento de los precios de los productos químicos, provocan una tendencia a nivel mundial a reducir su uso (Landeró, Lara, Andrade, Aguilar & Aguado, 2013). La demanda de los consumidores hacia productos alimenticios de calidad que no constituyan un riesgo para su salud ha sido un factor clave para la búsqueda de alternativas de origen natural que sean económicas, efectivas y menos dañinas al ambiente y a la salud de los consumidores; por medio de la utilización de productos agrícolas de origen orgánico y la implementación de métodos naturales destinados al control de plagas en los cultivos (Arguello, 2011). De manera que se han reportado estudios que demuestran la actividad antifúngica, antibacterial o insecticida de diversas plantas (Martínez, 2013).

1.4.OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Comparar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de romero [*Rosmarinus officinalis* L.] y cola de caballo [*Equisetum arvense* L.] frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, determinando su eficacia como fungicida natural.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Aislar el hongo fitopatógeno, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en laboratorio a partir de material vegetal de frutos de *Solanum betaceum*, caracterizando el cultivo.
2. Obtener extractos etanólicos de las especies vegetales de romero [*Rosmarinus officinalis* L.] y cola de caballo [*Equisetum arvense* L.], mediante el método de maceración, obteniendo sus metabolitos secundarios.
3. Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos obtenidos, mediante el método de difusión en agar [Kirby – Bauer], determinando que concentración tiene mayor efecto antimicrobiano.
4. Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de romero [*Rosmarinus officinalis* L.] y cola de caballo [*Equisetum arvense* L.] por el método de microdilución en placa, determinando su acción antifúngica frente a *Colletotrichum gloeosporioides*.

1.5.HIPÓTESIS

Si los extractos etanólicos de las especies vegetales de romero [*Rosmarinus officinalis* L.] y cola de caballo [*Equisetum arvense* L.] tienen actividad antifúngica sobre el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., se podrían utilizar como materia prima para la formulación de fungicidas naturales.

CAPÍTULO 2

MARCO DE REFERENCIA

2.1.CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL

2.1.1. Origen

El tomate de árbol o también conocido como tamarillo [*Solanum betaceum* Cav.], es una fruta originaria de Los Andes sudamericanos, en donde es cultivado considerablemente. Este cultivo es plantado a nivel mundial en varios países de Oceanía, Europa, América Central y del Sur (Ramírez, Gil & Morales, 2017). El tomate de árbol es una alternativa productiva en zonas de climas moderadamente fríos, en donde es cultivado para aprovechar el alto nivel nutricional que posee, razón por la cual se ha incrementado la demanda de esta fruta.

2.1.2. Descripción botánica

La planta de *Solanum betaceum* Cav. puede llegar a crecer de uno a cuatro m de altura con una vida útil de ocho a doce años si la planta tiene el mantenimiento adecuado. Su tallo es leñoso y se ramifica a partir de 1.5 m de altura formando una corona amplia, las hojas son grandes midiendo aproximadamente 40 x 30 cm; siendo su fragancia fuerte la característica principal de estas, como se puede apreciar en la Figura 1. Las inflorescencias

están formadas por agrupaciones de 10 a 50 flores, a partir de las cuales se producen hasta seis frutos de tamaño mediano, lo cual se puede observar en la Figura 2 (Acosta, Riofrío, Rojas, Vilanova, Plazas & Prohens, 2016).

Provitamina A, Ácido ascórbico, carotenoides y vitamina B6 son los principales componentes del tomate de árbol, brindándole una alta capacidad antioxidante. Se conocen cinco tipos morfológicos de este cultivo basándose en el color y la forma del fruto: naranja, naranja puntiaguda, rojo y rojo cónico, existiendo una gran diferencia entre ellos para el sabor de la fruta, ácidos orgánicos y azúcares solubles (Acosta et al., 2016). Sin embargo, estudios moleculares realizados en los últimos años en países como Ecuador, Bolivia, Perú y Colombia han demostrado una gran diversidad genética de esta especie (Tandazo, Ruiz, Rojas, Capa, Prohens, Alejandro & Acosta, 2017).

2.1.3. Clasificación botánica

Reino:	Plantae
División:	Magnolophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	Solanum
Especie:	betaceum

Nombre científico: *Solanum betaceum* Cav.



Figura 1: *Solanum betaceum* en su estado inicial de crecimiento
Fuente: Autor

2.1.4. Condiciones agroecológicas del cultivo

El cultivo de tomate de árbol se adapta fácilmente a climas templados y fríos, con temperaturas que oscilan entre los 13 °C a 20 °C, siendo estas temperaturas óptimas para la floración y desarrollo del fruto. Crece entre los 1800 a 2600 msnm con una humedad relativa entre 70% a 80%. Este cultivo requiere suelos profundos, con buen drenaje y alta contenido de materia orgánica, con un pH que varía de 6.5 a 7. En el Ecuador el tomate de árbol se cultiva en altitudes que van desde los 1000 a 3000 msnm, con un rango de temperatura entre 8 °C a 26 °C y una humedad relativa de 60 al 80% (Coellar, 2009).

2.1.5. Producción de tomate en Ecuador

El tomate de árbol es una fruta propia de climas templados y fríos, el Ecuador posee varias zonas caracterizadas por este tipo de clima; siendo la sierra ecuatoriana la más favorable para el desarrollo de este cultivo (Coellar, 2009). Ocupando una superficie

comercial de 5000 hectáreas y registrando un rendimiento de 60 a 80 toneladas/año de fruta. Las provincias más representativas para el cultivo de esta fruta son: Tungurahua [Pelileo, Los Andes, Baños, Patate, Montalvo]; Chimborazo; Azuay [Sigüi, Bulan, Sevilla de Oro, Palmas, Biblián, Paute]; Pichincha [El Quinche, Pifo, Puembo, Tumbaco, Yaruquí] e Imbabura [Caranquí, San Antonio, Chaltura, Pimampiro] y en menores cantidades en otras provincias serranas y orientales en donde la planta es más propensa al ataque de plagas por sus condiciones ambientales (Feicán, Encalada & Becerril, 2016).

Según Ojeda (2016) Tungurahua es el mayor productor de tomate de árbol del país, abasteciendo el 60% del mercado nacional de esta fruta.

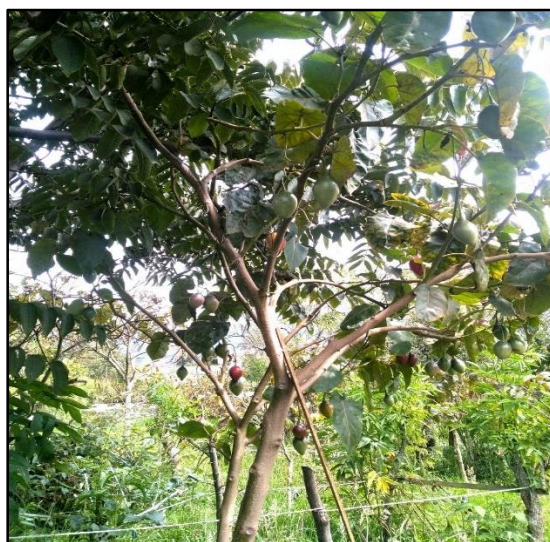


Figura 2: Frutos de *Solanum betaceum* en óptimo desarrollo
Fuente: Autor

2.1.6. Principales plagas y enfermedades

Las plagas más importantes que atacan el cultivo de tomate de árbol son los áfidos o pulgones [*Aphis sp.*], gusanos trozadores [*Agrotis sp.*], cutzo [*Phyllofaga sp.*], chinche foliado [*Leptoglossus zonatus*] y nemátodos. Las enfermedades son producidas por virus,

hongos, bacterias, e insectos plagas. Los hongos y bacterias penetran la planta a través de aperturas naturales de las plantas o por heridas; mientras que los virus se transmiten a través de insectos vectores o por intervención humana (Pérez & Maila, s. f.).

Entre las principales enfermedades que atacan a este cultivo se encuentran: pudrición radicular [*Fusarium oxisporum*], mancha negra [*Fusarium solani*], tizón temprano [*Alternaria sp.*], tizón tardío [*Phytophthora infestans*], oidio o cenicilla [*Oidium sp.*] y antracnosis u ojo de pollo [*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.]; siendo esta último de mayor importancia debido a la severidad con la que ataca los cultivos (Revelo, Pérez, & Maila, 2016).

2.1.6.1. Género *Colletotrichum*

Colletotrichum es un género de hongos fitopatógenos significativo, causando antracnosis en números cultivos agrónomicamente importantes, ocasionando pérdidas económicamente sustanciales en pre y postcosecha. “Este género incluye más de 100 especies, responsables de antracnosis en diferentes cultivos, destinados a la producción de alimentos, fibras y forrajes” (Dean, Van, Hammod, Di, Spanu, Rudd, Dickman, Kahmann, Ellis & Foster, 2012). Climas cálidos y húmedos favorecen el desarrollo, reproducción y diseminación de esta especie.

“Comprende el estado asexual de *Gromerella* [telemorfo], perteneciente al phylum Ascomycota, clase Hypocreomycetidae, orden Glomerallaceae” (Révloba, Gams & Seifert, 2011).

Las especies de este género son muy variables, manifestándose así en la morfología de la colonia, tamaño y forma de los conidios, presencia y forma de vellosidades, presencia o

ausencia de setas, esclerocios, acérvulos, sensibilidad a fungicidas, entre otras características (Orozco, 2006). Así como también características de cultivo como son: color de la colonia, textura y tasa de crecimiento. Sus conidios son incoloros y unicelulares, ovoides o cilíndricos. La agrupación de estos forma una masa con tonalidades rosa o salmón. *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum orbiculare* son las especies representativas de este género (Maita, 2011). “Sin embargo, de acuerdo a análisis filogenéticos se han identificado complejos de especies dentro de este género, los mismo que se encuentra clasificado en los siguientes clados: clado acutatum (29 especies), clado boninense -27 especies- (Damm, Cannon, Woundenberg, & Crous, 2012), clado destructivum -13 especies- (Damm, Cannon, Groenewald, & Crous, 2014), clado gloeosporioides -22 especies-, clado orbiculare -8 especies- (Damm et al., 2013), clado graminicola -13 especies-, clado dematium -6 especies-, clado spaethianum -5 especies- y clado truncatum -3 especies-” (Udayanga, Manamgoda, Lui, Chukeatirote, & Hyde, 2013:165)

El patógeno ataca a la mayoría de órganos de la planta; pero las más afectadas son las aéreas [brotes tiernos, inflorescencias, frutos en formación y en estado avanzado de desarrollo]. “Las etapas de desarrollo de las especies de *Colletotrichum* pueden dividirse en: 1- deposición de conidias en la superficie del hospedante, 2- fijación de la conidia en la superficie, 3- germinación de la conidia, 4- producción de apresorios, 5- penetración en la epidermis de la planta, 6- crecimiento y colonización en los tejidos del hospedante, 7- producción de acérvulos y esporulación” (Rodríguez, Cárdenas, Hernández, Gutiérrez & Mayek, 2013:901).

2.1.6.1.1. Antracnosis u ojo de pollo

Esta enfermedad se encuentra distribuida en la mayoría de las zonas productoras en Ecuador, “siendo de vital importancia por su amplia distribución y por la magnitud de las pérdidas que ocasiona “ (Pérez & Maila, s. f.: 14) . Se hace evidente cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo del hongo , generalmente en épocas lluviosas en donde la humedad ambiental puede llegar hasta 95% y la temperatura de 13 a 15°C (Feicán et al., 2016).

Los síntomas ocasionados por esta enfermedad se manifiestan por la aparición de lesiones ovaladas, necrosadas y hundidas, con presencia de masas de esporas; formando acérvulos; pudiendo llegar a cubrir todo el órgano afectado (Salazar, Hernández, Tapia & Gómez, 2012). “Bajo condiciones de humedad elevada y precipitaciones continuas, el centro de la lesión adquiere tonalidades rosa, salmón o naranja que corresponde a la formación de esporas del hongo” (Pérez & Maila, s. f.:18). El ingreso del fitopatógeno al fruto puede producirse antes de la maduración del fruto y hacerse evidente cuando este maduro (Trinidad, 2017).

La acción del viento, lluvia, herramientas, insectos u otros animales contribuyen a la diseminación del fitopatógeno. “Las pérdidas causadas por esta enfermedad se evidencian en la reducción de la cantidad y calidad del fruto cosechado” (Orozco, 2006:15).

2.1.6.1.2. Especies de *Colletotrichum*

- *Colletotrichum truncatum*

Presenta conidios unicelulares de tamaño 22.8-23.8 x 3-3.02 um, hialinos, de paredes lisas, sin septas; por lo general su parte centrada se encuentra curvada con paredes paralelas,

terminando en bases redondeadas con alto contenido granular, lo cual se puede observar en la Figura 3. Sus colonias son de forma irregular o circular, de coloración blanco a salmón o gris a negro, con masas conidiales formando anillos concéntricos (Rojo et al., 2017).

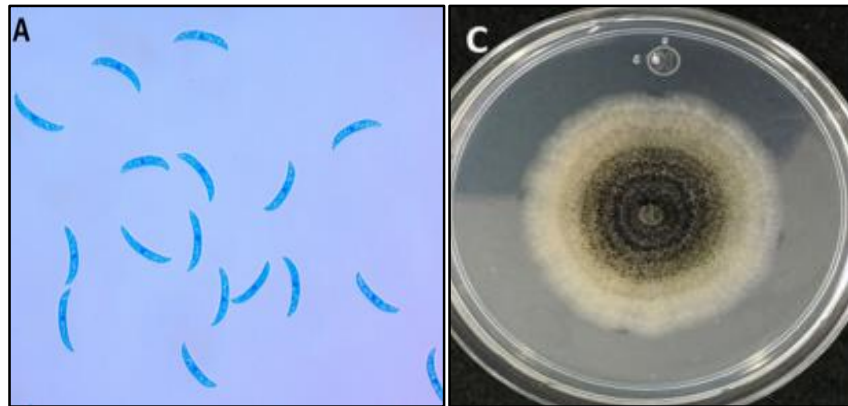


Figura 3: Conidios asexuales y morfología colonial de *C. truncatum*
Fuente: (Rojo, Álvarez, García, León, Sañudo & Allende., 2017)

- ***Colletotrichum gloeosporioides***

“Sus conidios son ovoides presentando un tamaño de 13.56 – 14.24 x 4 – 4.02 μm , las colonias de esta especie presentan crecimiento micelial de forma radial, con un margen ondulado o entero, generalmente con coloración blanco y masas conidiales anaranjadas en el centro de la colonia” (Rojo et al., 2017). Lo descrito anteriormente se puede identificar en la Figura 4.

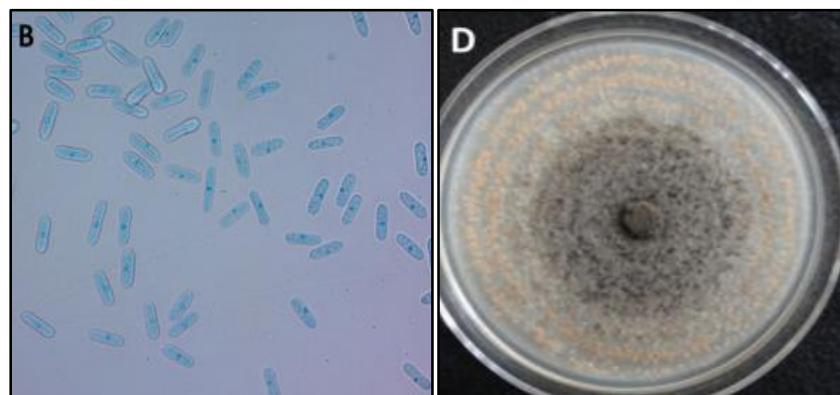


Figura 4: Conidios asexuales y morfología colonial de *C. gloeosporioides*
Fuente: (Rojo et al., 2017)

- *Colletotrichum fructicola*

Las colonias se desarrollan en medio PDA a nivel de laboratorio, caracterizadas por ser redondas y de borde entero, de 78 a 90 mm de diámetro, alcanzando su máximo crecimiento a los diez días. Su micelio es algodonoso y de color blanco a verde oliváceo, los conidios miden aproximadamente 10,3 - 20 x 2 - 4,8 um, unicelulares, rectos y cilíndricos, con extremos redondeados a oblongos; lo cual se expresa en la Figura 5. Los apresorios son simples o irregulares con uno o tres lóbulos amplios y poco profundos, llegando a medir alrededor de 8.6 - 16,8 x 4,7 - 7um (Gañán, Álvarez & Castaño, 2015).

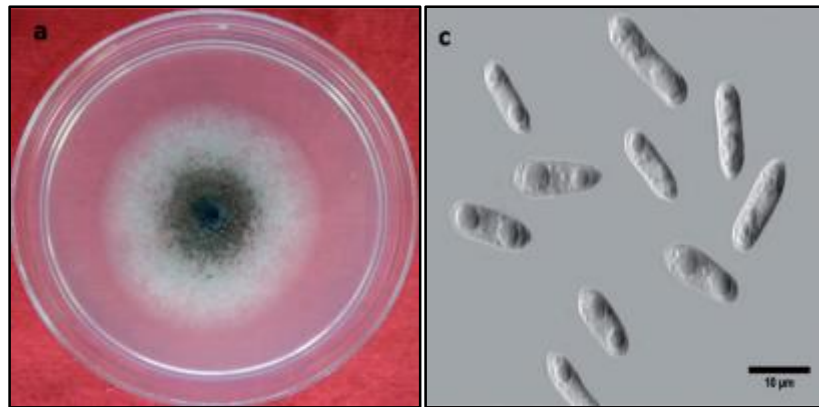


Figura 5: Características morfológicas de *C. fructicola*

Fuente: (Fuentes, Juárez, Vargas & Silva, 2018)

- *Colletotrichum musae*

Es la especie principal asociada con la antracnosis o pudrición del fruto del banano. Las colonias son redondas o irregulares con borde entero o semi-ondulada elevadas de 68 a 70 mm de diámetro después de 10 días de crecimiento a una temperatura de 20°C. El micelio aéreo es esparcido, semi-algodonoso y de coloración blanca a crema, lo cual se aprecia en la Figura 6. Los conidios miden cerca de 10.8 - 18.5 x 3 - 5.9 um; caracterizados por ser unicelulares, rectos, elípticos o cilíndricos; con extremos redondos a oblongos (Gañán, Álvarez & Castaño, 2015).

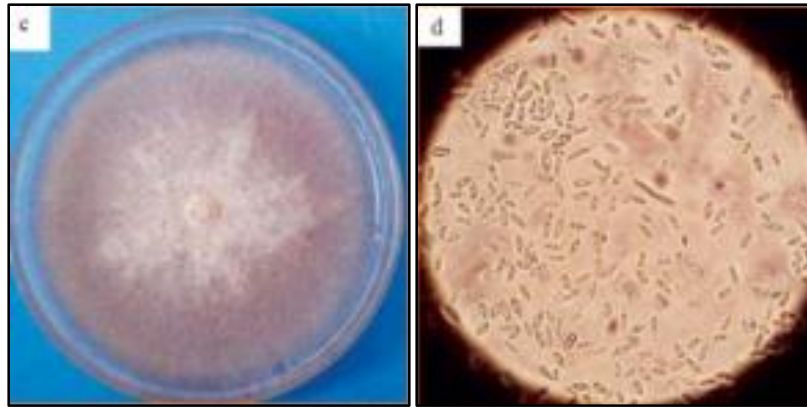


Figura 6: Morfología colonial y conidios de *C. musae*
Fuente: (Aguilar, García, Dulanto, & Maldonado, 2013)

- ***Colletotrichum acutatum* (Simmonds)**

Es una de las especies de mayor distribución del género *Colletotrichum*. Su complejo produce antracnosis sobre frutos de manzana, mora, cítricos, aguacate, mango, etc., y se encuentra formado por 31 especies.

La característica principal de esta especie es la forma de sus conidias, siendo estas fusiformes o elipsoides; es decir, que al menos uno de sus extremos tenga un lado puntiagudo, su tamaño aproximado es de 8.5 – 16.5 x 2.5 – 4 μm . Sus colonias son de color blancas en sus inicios, tornándose rojas o naranjas con el paso del tiempo; como se puede observar en la Figura 7. En muchos casos, algunas cepas de esta especie liberan pigmentos rojos o naranjas. Se diferencian de otras especies por su crecimiento lento (Santacruz, 2013).

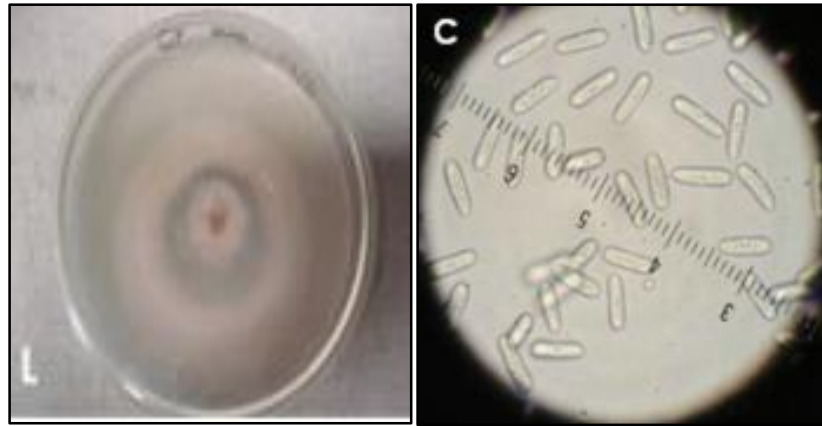


Figura 7: Morfología colonial y conidios de *C. acutatum*
Fuente: (Quirós, Peres, & Arauz, 2013)

- ***Colletotrichum capcisi***

Produce conidias de 17-26 x 3.75 um con paredes lisas o hialinas, en muchos de los casos son fusiformes. Sus colonias en medio PDA son blancas en sus estados iniciales, sin embargo, a los diez días se observa un cambio de coloración a verde grisáceo, alcanzado 85 mm de diámetro radial, siendo este su máximo crecimiento (Santacruz, 2013). Lo mencionado en el párrafo anterior se puede observar en la Figura 8.



Figura 8: Morfología colonial y conidios de *C. capcisi*
Fuente: (Chai, Zhao, Shi, Xie, & Li, 2014; Long, Tan, Boi & Trung, 2018)

2.1.6.1.3. Control

El control de las enfermedades producidas por este género depende de manera fundamental de las prácticas culturales como el uso de semillas libres de contaminación, poda, uso de variedades resistentes, rotación de cultivos, eliminación manual de órganos afectados, tratamientos físicos, control químico [benomyl, mancozeb, captafol, folpet] y biológico [extractos de plantas, microorganismos antagonistas] (Landro, Lara, Andrade, Aguilar & Aguado, 2016).

Los fungicidas más utilizados son de la clase benzimidazol y estrobilurinas que actúan inhibiendo la división nuclear y la respiración mitocondrial del hongo (Torres, Tapia, Higuera, Martín, Nextipacan & Pérez, 2015).

El control biológico de la antracnosis ha demostrado tener elevada efectividad, así lo confirman González et al. (2016) quienes observaron que los hidrodestilados y aceites esenciales de *C. Zeylanicum*, *Z. aromaticum* y *P. dioica* poseen metabolitos secundarios capaces de reducir el crecimiento y la formación de conidias de *Colletotricum gloeosporioides* en la papaya.

2.2.EXTRACTOS VEGETALES

2.2.1. Actividad antifúngica de extractos vegetales

Hoy en día el uso de extractos vegetales para combatir plagas y enfermedades, enfocándose en una agricultura sostenible constituye una alternativa favorable, debido a su bajo costo, mayor efectividad y menor daño al ambiente.

Los EV se caracterizan por la presencia de diferentes compuestos químicos conocidos como metabolitos secundarios, los cuales se encuentran formando parte de las plantas, pero no tienen un rol definido en los procesos vitales de la planta [respiración, asimilación, transporte], a diferencia de los metabolitos primarios [carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos] que cumplen un papel fundamental en estos procesos (Robles et al., 2016).

Las plantas en su evolución han generado los metabolitos secundarios que se sintetizan a partir de los metabolitos primarios y no de manera generaliza, es decir, depende de la planta, el género e incluso la especie. Aunque estos metabolitos se caracterizan por sintetizarse en pequeñas cantidades muchos de ellos cumplen importantes funciones ecológicas, interviniendo en los mecanismos de defensa de la planta, producción de sustancias atrayentes o repelentes de enemigos naturales, favoreciendo la reproducción al atraer a insectos polinizadores, y por ende la dispersión de semillas (Ruiz, 2013).

“Los compuestos antifúngicos, se encuentran incluidos en las clases mayores de metabolitos secundarios, como son los compuestos fenólicos, alcaloides, saponinas, flavonoides, terpenoides, etc.” (Arif, Bhosale, Kumar, Mandal, Bendre, Lavekar & Dabur, 2009).

“Estudios realizados, demuestran que los EV pueden ser utilizados para el control de hongos y bacterias fitopatógenas, constituyendo una herramienta clave para el manejo integrado y ecológico del ecosistema, contribuyendo a una agricultura sustentable” (Villacís et al., 2017).

2.2.2. Métodos de obtención de extractos vegetales

Los procesos de extracción se dividen de acuerdo al tipo de disolvente utilizado, pudiendo ser los siguientes:

2.2.2.1. Maceración

Se define como maceración al contacto prolongado de una especie vegetal debidamente fragmentada con el solvente seleccionado, formando un conjunto homogéneo; en el cual el solvente actúa sobre todas las proporciones de la especie vegetal circulando en todas las direcciones disolviendo sus principios activos. “El conjunto de la especie vegetal más el solvente debe ser protegido de la luz para evitar posibles reacciones, mantenerlo a temperatura ambiente y ser agitado constantemente” (Carrión & García, 2010:41). El tiempo de maceración es diverso dependiendo únicamente de la especie vegetal a macerarse. Finalmente el macerado es filtrado y rota-evaporado recuperando el solvente y obteniendo el extracto concentrado (Camel, 2014).

2.2.2.2. Percolación

La técnica consiste en extraer los principios activos de la especie vegetal pulverizada y dispuesta en un aparato denominado percolador o lixiviador, por medio del solvente que actúa de manera continua y descendente hasta agotar el material.

El material vegetal debe ser humedecido previo a la colocación en el percolador, con una cantidad apropiada del solvente. Una de las ventajas que posee este método es que los lixiviadores o percoladores, poseen dispositivos de carga y descarga permitiendo, una extracción total de los principios activos; obteniéndose un promedio del 95% de los metabolitos presentes (Carrión & García, 2010:41).

2.2.2.3.Decocción

Es un método extractivo en el cual el solvente actúa a temperatura de ebullición sobre la especie vegetal durante un tiempo determinado [según la planta o principio activo a extraer], en el que el solvente extrae los principios activos solubles en el mismo (Contreras & Ruíz, 2012). Este procedimiento es usado para obtener principios activos que no sufran alteraciones con la temperatura.

2.2.2.4.Infusión

Al igual que la decocción, son las preparaciones más antiguas que se conocen, consiste en verter el solvente hirviendo sobre la especie vegetal debidamente triturada, se cierra el envase y se deja macerar aproximadamente 20 minutos; finalmente se filtra para clarificar el macerado. Este método es muy utilizado para evitar que los aceites volátiles se evaporen (Contreras & Ruíz, 2012).

2.2.2.5.Digestión

Este procedimiento es similar a la maceración, con un ligero calentamiento durante el proceso, tomando en consideración que esta temperatura no altere los principios activos del material vegetal. Las temperaturas comúnmente utilizadas oscilan entre 35 y 40 °C (Camel, 2014).

2.2.2.6.Otras técnicas

Además de los métodos de extracción convencionales, nuevos y eficientes métodos se están poniendo en práctica actualmente, debido a las ventajas que estos poseen; entre los cuales se puede mencionar la extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido y la extracción por fluidos supercríticos, siendo la última la de mayor importancia (Yang, Di, Qing, & Da, 2014).

- **Extracción por fluidos supercríticos**

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica ecológica utilizada para la obtención de metabolitos secundarios. El dióxido de carbono es utilizado como único y principal disolvente de extracción en lugar de disolventes orgánicos, dado que la mayoría de ellos son tóxicos y reducen los campos de acción de los extractos. Además el dióxido de carbono posee bajo punto crítico, características amigables con el ambiente y bajo costo (Farías, Rostagno, Coaquira & Meireles, 2015).

La ventaja principal de esta técnica es que minimiza las reacciones de degradación de los metabolitos a extraerse y la posibilidad de controlar la composición del extracto, ya que la extracción se realiza en un extractor cerrado sin la presencia de luz y oxígeno (Baldino, Scognamiglio & Reverchon, 2018). La temperatura del proceso es leve, sin embargo se debe encontrar por encima de la temperatura crítica del disolvente; lo que hace que sea una técnica factible para la extracción de compuestos termolábiles (Irmak, Solakyildirim, Hesenov, & Erbatur, 2010). La presión debe ser superior a la presión crítica del disolvente, aumentando la densidad del solvente y por ende la potencia de solvatación, obteniéndose una extracción más rápida (Farías, Rostagno, Coaquira & Meireles., 2015).

Otro aspecto importante es que permite separar el solvente de extracción del extracto, simplemente por la migración del fluido hacia la salida del recipiente extractor, permitiendo la recuperación y reutilización del mismo.

2.2.3. TIPOS DE EXTRACTOS VEGETALES

2.2.3.1.Extractos fluidos

Son preparados líquidos constituidos generalmente por soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas; al menos que se requiera otro solvente más adecuado para la extracción de los principios activos, en el cual el solvente se ha evaporado hasta conseguir una concentración de principio activo similar a la concentración de principio activo de la especie vegetal inicial. “Generalmente los extractos fluidos son obtenidos por percolación o maceración (Sotelo, 2016). Los extractos fluidos son muy susceptibles a la luz y el aire, alterándose fácilmente ante la presencia de estos factores”(Carrión & García, 2010:41).

2.2.3.2.Extractos secos

Estos extractos son obtenidos mediante evaporación o liofilización de la especie vegetal en un disolvente y su posterior concentración de la solución a través de la evaporación total del disolvente y desecación del residuo, hasta conseguir un producto con textura a polvo (Comas, 2014).

El producto final es muy concentrado respecto a la especie vegetal inicial. Su carácter higroscópico representa un serio inconveniente para su manipulación y conservación (López, 2002). Los extractos secos no deben presentar una humedad mayor al 5%.

2.2.2.4.Extractos blancos

“Este tipo de extractos se caracterizan por presentar consistencia semisólida, con una concentración de principio activo superior a la de la especie vegetal inicial. Los solvente más usados para obtener estos extractos son el agua o mezclas hidroalcohólicas” (Comas, 2014:6).

2.2.2.5.Crioextractos

Sotelo (2016:47) menciona que los crioextractos:

“Son obtenidos a partir de la congelación (196 °C) de la especie vegetal, los principios activos son obtenidos mediante nitrógeno líquido seguido de la adición de alcohol etílico para solubilizarlos. Los crioextractos son muy utilizados para la extracción de proteínas y enzimas, sin embargo el proceso resulta muy costoso”.

2.2.4. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

2.2.4.1.Análisis físicos-químicos

Este análisis permite conocer la composición del EV, caracterizando sus principios activos. El análisis físico-químico incluye ensayos cualitativos y cuantitativos.

- **Ensayos cuantitativos**

Este tipo de análisis permite determinar valores específicos de parámetros como son: el porcentaje de humedad, cenizas totales, pH, densidad e índice de refracción (Tirado, Montero & Acevedo, 2015).

- **Ensayos cualitativos**

En este ensayo se considera el análisis organoléptico de los extractos, considerándose caracteres como olor, color, sabor y textura. Además, permite identificar sustancias mediante reacciones simples para un principio activo o componente característico del EV; por medio de estas reacciones se puede determinar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios como alcaloides, heterósidos, saponinas, flavonoides, taninos, etc. Son muy útiles debido a su rapidez y sencillez y por lo general se efectúan directamente sobre el extracto (Tirado, Montero & Acevedo, 2015).

2.2.5. ESPECIES VEGETALES

2.2.5.1. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

El romero es una planta nativa de la región mediterránea; ha sido cultivada desde tiempos antiguos con fines medicinales, culinarios y ornamentales (Mateu et al., 2013). Actualmente, es utilizado en productos farmacéuticos y en medicina ancestral como digestivo, tónico, astringente, diurético y es útil para dolencias urinarias.

Esta especie crece fácilmente en climas con una precipitación media de 200 a 600 mm, morfológicamente es una planta arbórea de hasta 1.5 m de altura, manteniéndose siempre verde y recta, con hojas perennes de olor característico, como se observa en la Figura 9. El romero es rico en aceite esencial, pudiéndose extraer de las flores o las hojas, en donde se encuentran la mayor parte de glándulas productoras de esta sustancia (Zermane, Meniai & Barth, 2010).

Rosmarinus officinalis es un hierba medicinal muy utilizada y ampliamente aceptada como una especie con mayor capacidad antioxidante natural, siendo sus extractos los primeros antioxidantes naturales en ser comercializados (Dilas et al., 2012).

Los extractos de las hojas muestran una alta actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica. Además de ser muy utilizados como aditivos alimentarios, se están evaluando su capacidad como inhibidores de la tumorigénesis cutánea (Tounekti, Vadel, Ennajeh, Khemira & Munné, 2011). Estudios recientes han demostrado que el extracto etanólico del romero inhibe el virus del herpes simple tipo 2 y el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (Edwards, Rocha, Williamson & Heinrich, 2015).

2.2.5.1.1. Clasificación botánica

Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Género: Rosmarinus
Especie: officinalis

Nombre científico: *Rosmarninus officinalis* L.(Achour et al., 2018)



Figura 9: *Rosmarinus officinalis* en su hábitat natural

Fuente: Autor

2.2.5.1.2. Principales compuestos químicos

Las hojas contienen hasta el 2.5% de aceite esencial, cuya composición varía de acuerdo a las características morfológicas de la planta y el ambiente en el que se desarrolla; alcanfor [5-31%], 1.8 cineol [15-55%], α -pineno [9-26%], borneol [1.5-5%], canfeno [2.5-12%], β -pineno [2-9%], limoneno [1.8-5.1%], β -cariofileno [1.8-5.1%] y mirceno [0,9-4.5%]son los principales compuestos químicos de esta especie. Asimismo, contienen grandes cantidades de ácidos fenólicos [rosmarínicos, clorogénicos, y cafeicos], terpenoides y diterpenos [carnosol, ácido carnosólico, rosmanol], triterpenos [ácido oleanólico y ursólico] y flavonoides (Edwards et al., 2015).

2.2.5.1.3. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de esta especie depende, en primer lugar, de sus características genéticas, nivel de crecimiento, calidad de la planta original, origen geográfico,

condiciones climáticas, época de cosecha, almacenamiento, procesamiento; y en segundo lugar, el proceso de extracción y parámetros a considerarse (Cavero et al., 2005).

Los compuestos asociados a su capacidad antifúngica son los diterpenos fenólicos (ácido carnósico, carnosol, rosmanol, rosmariquinona, romaridifenol), ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido rosmarínico) y flavonas (Irmak et al., 2010).

2.2.5.2.Cola de caballo (*Equisetum arvense* L.)

Equisetum es un género de plantas vasculares más antiguas, comprende aproximadamente 15 especies distribuidas a nivel mundial (Elgorriaga, Escapa, Rothwell, Tomescu & Rubén, 2018) . *Equisetum arvense* L., o también conocida como “cola de caballo”, es una planta pteridofita con tallos aéreos ramificados y verticilios regulares; algunos son fértiles, midiendo de 10 a 20 cm de altura, no se ramifican y terminan en una espiga de color beige. Mientras que los tallos infértiles miden de 20 a 80 cm de altura, presentando verticilios o nudillos a partir de los cuales emergen las hojas; ambos crecen en lugares húmedos y con climas templados [Figura 10] (Calsin, 2017). Es ampliamente conocida por ser una planta medicinal que posee características antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, anticonvulsionante y sedante. En medicina tradicional es usado como diurético, para la regeneración de huesos y cartílagos, así como también para la prevención de la osteoporosis (Khakestani, Jafari, Zahedi, Bagheri & Hajiaghaee, 2017).

2.2.5.2.1. Clasificación botánica

Reino:	Plantae
Sub-reino:	Tracheobionta
División:	Equisotophyta
Clase:	Equisetopsida
Orden:	Equisetales
Familia:	Equisetaceae
Género:	Equisetum
Especie:	arvense

NOMMRE CIENTÍFICO: *Equisetum arvense* L. (Al-Snafi, 2017)



Figura 10: *Equisetum arvense* en su hábitat natural

Fuente: Autor

2.2.5.2.2. Componentes químicos

Los compuestos químicos en esta planta consisten en alcaloides [nicotina, palustrina], fitoesteroles, taninos, triterpenoides, compuestos fenólicos y flavonoides [0.6-0.9%] (Al-Snafi, 2017), proteínas y aminoácidos, saponinas, aceites volátiles. A más de ser rico en minerales como potasio, manganeso, magnesio, sulfuro y un contenido considerable de sílice [5-8%] (Khakestani et al., 2017).

2.2.5.2.3. Actividad antifúngica

En forma de tintura *Equisetum arvense* L. es utilizado por sus propiedades antisépticas, y estudios previos han demostrado el alto potencial antimicrobiano de extractos hidroalcohólicos y aceites esenciales (Bessa et al., 2012). Esta especie tiene la capacidad de producir sustancias alelopáticas como resultado de su metabolismo. El extracto acuoso de *Equisetum arvense* afecta al desarrollo del estadio larvario de algunos insectos plagas, impidiendo que estos proliferen, evitando infecciones fungosas en el follaje y los frutos del cultivo.

2.3. MÉTODOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las técnicas más comunes para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos, extractos y aceites esenciales de plantas se basan en métodos de bioautografía, difusión y dilución (Pannek, Gach, Boratyński & Olejniczak, 2018).

2.3.1. Método de bioautografía

Este método implica detectar la cantidad específica de agente a la concentración deseada en la placa de cromatografía en capa fina [TLC]. Después del desarrollo, el cromatograma

se sumerge en una solución del microorganismo y se incuba en condiciones favorables para el desarrollo del mismo. Las zonas de inhibición se pueden visualizar directamente o con sales de tetrazolio, tales como MTT, que se convierte en formazano púrpura mediante deshidrogenasas microbianas (Jesionek et al., 2015; Wedge et al., 2009).

2.3.2. Método de difusión en agar

Es una de las técnicas más utilizadas en investigaciones, el método consiste en emplear una cantidad definida del inóculo microbiano en un medio de cultivo específico. La suspensión estandarizada del inóculo se esparce sobre el medio de cultivo contenido en placas Petri, seguido a esto, los discos empapados por concentraciones determinadas del extracto a evaluar se colocan en el agar y las placas se someten a incubación (Teixeira et al., 2013).

Una variante de este método es el de difusión en pozos, el método se lleva a cabo de manera similar al anterior, es decir, el inóculo debidamente diluido en la superficie del medio de cultivo; pero difiere en la forma de implementar el compuesto o extracto, el cual es agregado directamente a un pozo en el medio inoculado (Benbelaid, Abdoune, Khadir & Benfahou, 2013). El pozo es previamente realizado con ayuda de un sacabocados estéril.

En ambos métodos, el valor de la actividad antimicrobiana se define como la tasa de inhibición (Sim & Shin, 2014).

2.3.3. Microdilución en caldo

Los métodos de dilución se mantienen en uso para evaluar distintas concentraciones de un compuesto frente a una cepa microbiana; de tal manera que permite obtener una valoración cuantitativa de su capacidad de inhibición del agente microbiano, permitiendo

conocer la mínima concentración que inhibe el desarrollo del microorganismo [Concentración Inhibitoria Mínima - CMI](Derita, Castelli & Sortino, 2015). Se denomina CMI al valor que indica la menor concentración de compuesto o extracto que inhibe más de la mitad del crecimiento visible del agente microbiano o la dosis que no causa ningún crecimiento visual (Guzman et al., 2013).

El método microdilución involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en microplacas de 96 pocillos estériles; la misma que debe incluir un pocillo de control de crecimiento y un control negativo (CLSI, 2012). El procedimiento abarca la preparación del inóculo microbiano y su distribución en los 96 pocillos de la microplaca, incubación y determinación del crecimiento microbiano. Las placas de microdilución se deben sellar para evitar la evaporación del medio de cultivo; posterior a la incubación se determina por turbidez o cambio de coloración, por medio de la adición de reactivos específicos, el crecimiento o no del microorganismo. El pocillo que contenga la menor concentración del agente que inhibe en su totalidad el crecimiento microbiano se define como CMI (Ramírez & Marín, 2009).

Para determinar la efectividad de la prueba; se toma un volumen determinado del pocillo con la CMI y se cultiva en una placa Petri incubándola por un periodo de tiempo determinado, dependiendo del tipo de microorganismo (Pannek et al., 2018).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la ejecución de esta tesis tipo investigativa-experimental, “Comparación *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de romero [*Rosmarinus officinalis* L.] y cola de caballo [*Equisetum arvense* L.] frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.”, se aísla la cepa del fitopatógeno en estudio y se obtienen los extractos de las muestras vegetales; posteriormente se evalúa *in vitro* la actividad antifúngica de los extractos a diferentes concentraciones frente a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz..

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el área de Biología de los laboratorios de Ciencias de la Vida en la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Cuenca.

3.1. AISLAMIENTO DEL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides*, EN LABORATORIO A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL DE *Solanum betaceum*, CARACTERIZANDO EL CULTIVO

3.1.1. Recolección de muestras de material vegetal de *Solanum betaceum*

*Tabla 1: Materiales usados para la recolección de muestras de *Solanum betaceum**

Materiales
Podadora
Fundas de cierre hermético

La recolección del material vegetal se efectuó en la finca agroecológica “Agruco”, ubicada en la parroquia San Joaquín / cantón Cuenca / provincia Azuay. En donde se recolectaron muestras de frutos y hojas con sintomatología típica de la enfermedad, como

se puede apreciar en la Figura 11, obteniendo muestras de diferentes ejemplares del cultivo de tomate de árbol.



Figura 11: Lesiones necrosadas típicas de la antracnosis
Fuente: Autor

3.1.2. Aislamiento del fitopatógeno en condiciones de laboratorio

Tabla 2: Equipos y materiales usados para el aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en laboratorio

Equipos	Materiales
Cámara de flujo	Bisturí
Estufa Memmert	Mecheros
Microscopio de pantalla micros	Pinzas
Austria	Asa
	Porto y cubre objetos
	Asa estéril
	Azul de metileno

Según la metodología aplicada por Valenzuela et al. (2014) el aislamiento del fitopatógeno se llevó a cabo en condiciones de laboratorio, tomando fragmentos del tejido enfermo de las muestras [Figura 12]; estos previamente fueron tratados con agua destilada estéril por un tiempo aproximado de 5 minutos y finalmente se secaron con papel estéril.



Figura 12: Selección y tratamiento de tejido enfermo de las muestras
Fuente: Autor

Cada uno de los fragmentos debidamente desinfectados fueron llevados a la cámara de flujo y sembrados directamente en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA)[Figura 13]. La incubación se realizó a 28 °C durante 5 días.



Figura 13: Siembras de las muestras en medio nutritivo PDA
Fuente: Autor

Posteriormente, se coge una porción de micelio de cada una de las colonias y se transfiere a nuevas cajas Petri contenidas con PDA, con la finalidad de obtener cepas puras, lo descrito anteriormente se puede observar en la Figura 14. Una vez obtenidos los aislamientos, las colonias se mantuvieron en PDA realizando repiques cada vez que era necesario.



Figura 14: Resiembra de colonias aisladas

Fuente: Autor

“Las colonias aisladas, fueron caracterizadas morfológicamente; tomando en cuenta caracteres macro y microscópicos de cada uno de las cepas purificadas. Los caracteres considerados fueron color y forma de la colonia, color del micelio (Figura 15a), forma y tamaño de las conidias (Figura 15b) y medición de la tasa de crecimiento”(Castro, Saquero, & Herrera, 2003:13). En la Figura 15a se observan las características macroscópicas del microorganismo; mientras que en la Figura 15b se aprecian las características microscópicas.

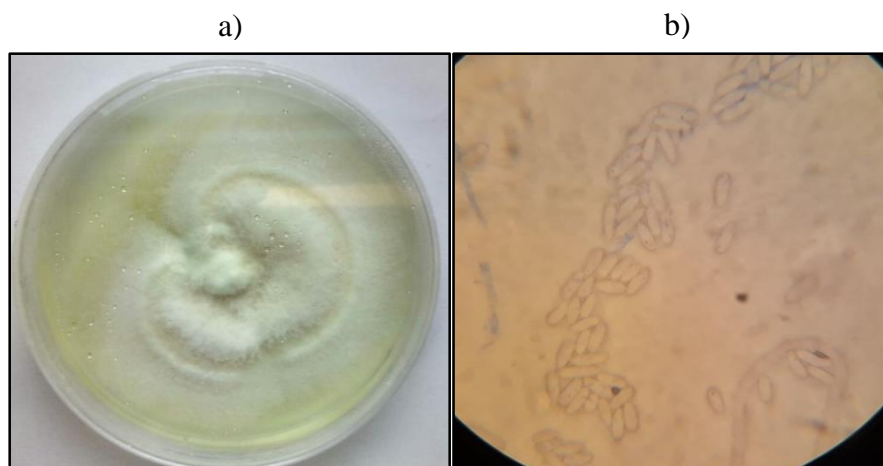


Figura 15: a) Características morfológicas y b) conidios de *C. gloeosporioides*
Fuente: Autor

3.2.OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis* L. Y *Equisetum arvense* L., MEDIANTE EL MÉTODO DE MACERACIÓN, OBTENIENDO SUS METABOLITOS SECUNDARIOS

Según Carvajal et al.(2008) este procedimiento se divide en tres etapas: procesamiento del material vegetal, obtención del extracto etanólico y realización de pruebas de identificación para cada uno de los metabolitos.

3.2.1. Procesamiento del material vegetal

Tabla 3:Equipos y materiales utilizados para la recolección y secado de las especies vegetales

Equipos	Materiales
Estufa Memmert	Podadora
Licadora Blender C816	Fundas de cierre hermético
Balanza analítica	

El material vegetal de ambas especies fue recolectado en Yucacay, cantón Gualaceo / provincia Azuay; durante el mes de marzo de 2018. Para la selección del material vegetal se optó por hojas sanas y en óptimo estado de desarrollo, separando hojas secas, tallos y eliminando partículas u objetos extraños presentes.

Posteriormente se lavó con abundante agua y se secó a temperatura ambiente durante 2 días [Figura 16a]; para asegurar la eliminación total de la humedad presente en las muestras se sometió a un secado mecánico por medio de una estufa de marca Memmert durante 2 días a una temperatura de 60 °C [Figura 16b]. Se reduce el tamaño de las muestras con ayuda de una licuadora industrial y finalmente se tamiza obteniendo partículas uniformes.

El producto resultante fue envasado en fundas de cierre hermético y almacenado en un lugar fresco y seco para su posterior uso.

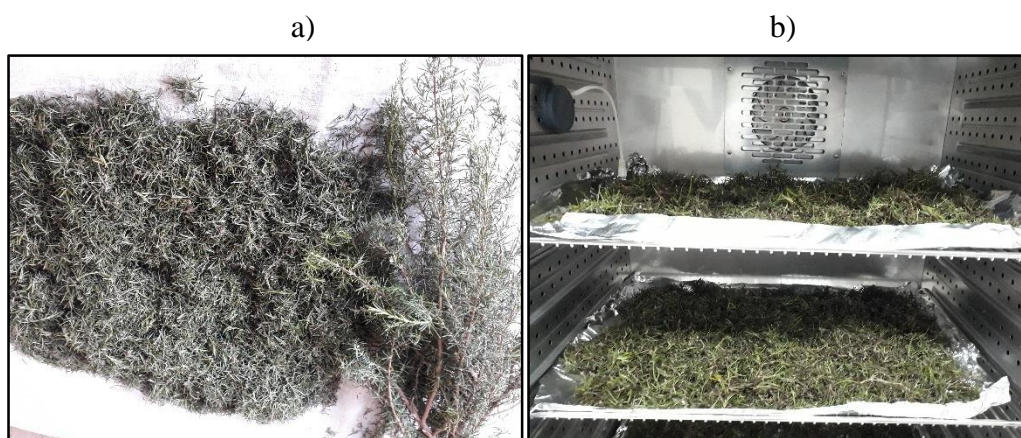


Figura 16: a) Secado natural y b) secado mecánico de *Rosmarinus officinalis* L.

Fuente: Autor

3.2.2. Obtención de extractos etanólicos de romero y cola de caballo

Tabla 4: Equipos y materiales utilizados para obtener los extractos de romero y cola de caballo

Equipos	Materiales
Bomba de vacío Millipore	Frascos ámbar 1000 mL
Balanza analítica	Frascos ámbar 60 mL
Rotavapor Tecnal TE-211	Papel filtro
Mezclador RotoMix	Vaso de vidrio 1000 mL
	Varilla de vidrio
	Kitasato 1000 mL
	Embudo Buchner

En base a la metodología utilizada por Azuero et al. (2016) el material vegetal seco y pulverizado fue sometido a un proceso de maceración, en botellas ámbar de 1000 mL [Figura 17], por un periodo de cinco días para *Rosmarinus officinalis* L. y 8 días para *Equisetum arvense* L., utilizando como solvente de extracción etanol al 96%; en un volumen suficiente para cubrir la totalidad del material vegetal.



Figura 17: Maceración de las especies vegetales
Fuente: Autor

Los envases sellados y etiquetados fueron almacenados a temperatura ambiente, bajo condiciones de oscuridad y agitación constante por medio del equipo mezclador RotoMix. Posteriormente se filtra con ayuda de una bomba de vacío Millipore, dicho equipo se puede apreciar en la Figura 18.



Figura 18: Filtración del macerado en la bomba de vacío Millipore
Fuente: Autor

A continuación, se procede a concentrar el extracto con ayuda del equipo rotavapor Tecnal TE- 211, permitiendo la recuperación del solvente, el quipo usado para este proceso se puede observar en la Figura 19 (Ochoa, Cerna, Landeros, Hernández, & Delgado, 2012).



Figura 19: Recuperación del solvente en el rotavapor
Fuente: Autor

El producto final es rotulado y almacenado en un lugar fresco y seco.

Este procedimiento se realiza para cada una de las especies vegetales.

3.2.3. Estudio de estabilidad físico-química de los extractos obtenidos

Para la determinación de la estabilidad físico-química de los extractos etanólicos de romero y cola de caballo se evaluaron parámetros como la densidad, índice de refracción y pH (Hernández, Martín & Aguilar, 2010).

Tabla 5: Equipos y materiales para la determinación de los parámetros físicos-químicos de los extractos

Equipos	Materiales
pH-Metro Mettler Toledo	Soluciones buffer (4-7)
Balanza analítica	Piseta
Refractómetro ABBE	Varilla de vidrio
	Vaso de precipitación de 10 mL
	Picnómetro

3.2.3.1. Determinación del pH

El pH fue medido para cada uno de los extractos a temperatura ambiente con un pH-metro de marca Mettler Toledo, previo a la medición el pH el equipo fue calibrado con soluciones estándar con los siguientes valores de pH 4 y 7, una vez calibrado se limpió el electrodo con abundante agua estéril y se introdujo en cada extracto para su medición (Fonseca, 2016).

3.2.3.2. Determinación del índice de refracción

El índice de refracción se midió con ayuda del equipo refractómetro, para lo cual se colocó una gota de agua destilada sobre el prisma para su respectiva calibración, a continuación se colocó una gota de cada uno de los extractos vegetales en el prisma seco, teniendo en cuenta que no se desborde del prisma, se cerró la protección y a continuación

se enfoca hasta lograr que la línea horizontal se encuentre en el centro del círculo de medición, mismo que es observado mediante el lente óptico, finalmente se registraron los datos (Reis, Lampreia, Santos, Moita, & Douhéret, 2010).

3.2.3.3.Determinación de la densidad

La densidad relativa se calculó mediante el método del picnómetro; siguiendo la metodología descrita por Hernández et al (2010), para lo cual se pesó el picnómetro de 5 mL de capacidad vacío en una balanza analítica, posterior a esto se pesa el picnómetro con agua destilada y finalmente el picnómetro con los extractos vegetales [Figura 20]. La densidad relativa de cada extracto corresponde a la diferencia de pesos del picnómetro con los extractos y con el agua destilada.

Los valores de la densidad se obtuvieron con la siguiente fórmula (Pumaylle, Quiroz, Luján, & Paz, 2012):

$$d_{H_2O}=0,99718 \left(\frac{P_2-P}{P_1-P} \right)$$

Dónde:

P = peso en g del picnómetro vacío

P_1 = peso en g del picnómetro con agua destilada

P_2 = peso en g del picnómetro con extractos vegetales



Figura 20: Medición de la densidad por el método del picnómetro

Fuente: Autor

3.2.4. Tamizaje fitoquímico

Este procedimiento se realizó con el objetivo de determinar la presencia de diferentes metabolitos secundarios, mediante reacciones específicas para diferentes familias de compuestos (Hernández et al., 2010). Las reacciones se realizaron por separado para cada uno de los extractos estudiados.

Tabla 6:Equipos y materiales utilizados para la caracterización cualitativa de los extractos

Equipos	Materiales
Cámara de flujo	Vaso de precipitación de 100 mL
	Pipeta de 10 mL
	Goteros
	Papel filtro
	Tubos de ensayo
	Gradilla
	Varilla de vidrio
	Pera
	Cloruro férrico
	Alcohol amílico
	Cinta de magnesio
	Ácido clorhídrico
	Reactivo de Dragendorff
	Reactivo de Baljet
	Anhidro acético
	Cloroformo
	Formaldehído
	Agua destilada

3.2.4.1. Ensayo para catequinas

Para evidenciar catequinas se usó un capilar de vidrio y se tomó una gota del extracto y se colocó sobre un pedazo de papel filtro, sobre la mancha formada por el extracto se añade carbonato de sodio y se observó bajo luz UV [Figura 21]. La formación de una mancha verde carmelita determina como positivo el ensayo (Rodríguez et al., 2011).



Figura 21: Ensayo de catequinas para *Rosmarinus officinalis*
Fuente: Autor

3.2.4.2. Ensayo para resinas

Para la prueba de resinas se tomó 2 mL del extracto y se colocó en un tubo de ensayo e inmediatamente se colocó 10 mL de agua destilada. Para la presencia de resinas debe existir un precipitado.

3.2.4.3. Ensayo para saponinas

En un tubo de ensayo se coloca una pequeña cantidad de extracto [1 mL] y se añade agua destilada [5 mL] y se agita fuertemente durante un tiempo aproximado de cinco minutos [Figura 22]. El ensayo da positivo si se observa la formación de espuma persistente por más de 2 minutos (Rodríguez, Zarate & Sánchez, 2017).



Figura 22: Saponinas presentes en *Rosmarinus officinalis* L.
Fuente: Autor

3.2.4.4. Ensayo para flavonoides

Para su detección se utilizó la prueba de Shinoda, para lo cual en un tubo de ensayo se coloca 1 mL del extracto y se añade magnesio en polvo o cinta de magnesio, seguidamente se adicionó 1 mL HCl concentrado y a los 5 minutos se agita con 1 mL de alcohol amílico [Figura 23]. Si bajo estas condiciones el alcohol amílico se colorea de amarillo, rojo, naranja o violeta se considera como positivo el ensayo (Carvajal et al., 2008).

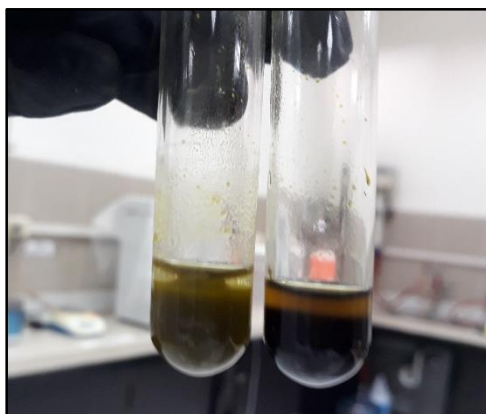


Figura 23: Ensayo de Shinoda para los extractos estudiados
Fuente: Autor

3.2.4.5. Ensayo para lactonas

En un tubo de ensayo se colocó 2 mL del extracto y se añadió 1 mL del reactivo de Baljet, para determinar como positivo el ensayo se debe observar un cambio de coloración o un precipitado rojo (Rodríguez et al., 2011).

3.2.4.6. Ensayo para antocianinas

Se toma 2 mL del extracto vegetal y se calienta en presencia de alcohol por un tiempo de 10 minutos con 1 mL de HCl, se dejó reposar hasta que baje la temperatura y se añade 1 mL de alcohol amílico y 1 mL de agua destilada; se mezcla con una varilla y se deja reposar hasta que se produzca la separación de fases, el ensayo positivo da una coloración rojiza en la fase amílica (Colina, 2016).

3.2.4.7. Ensayo para alcaloides

Se realizó mediante el ensayo de Dragendorff para lo cual se toma una parte de extracto vegetal y se re disolvió en 1 mL de HCl al 1%, a esta solución se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff [Figura 24]; para determinar como positivo el ensayo se debe observar, opalescencia, turbidez o la presencia de un precipitado naranja o rojizo (Garza et al., 2010).

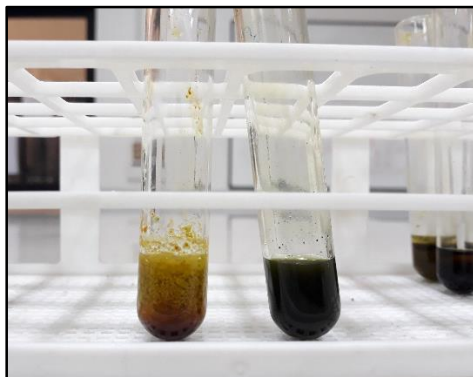


Figura 24: Ensayo de Dragendorff para los extractos de romero y cola de caballo

Fuente: Autor

3.2.4.8. Ensayo para triterpenos

Se realizó la prueba de Liebermann-Buchard, para lo cual se disuelven 2 mL del extracto con 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, con una varilla se homogeniza la muestra y se enfría a 0 °C, a continuación se añade 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se interpretó como positivo el cambio de coloración a azul, verde, rojo o anaranjado (Rodríguez et al., 2017).

3.2.4.9. Ensayo para taninos

Se toma 1 mL del extracto vegetal y se añade 1 mL de formaldehído más 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se calentó a baño maría por 10 minutos. El resultado positivo forma un precipitado rojo como se puede observar en la Figura 25 (Colina, 2016).

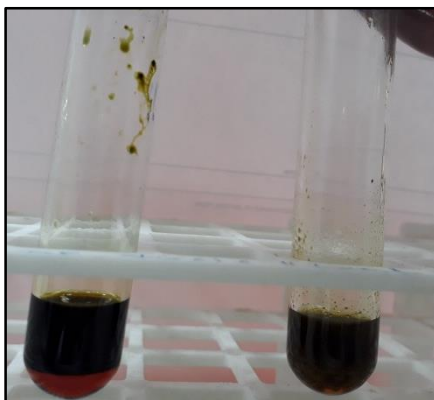


Figura 25: Ensayo para determinar taninos en los extractos
Fuente: Autor

3.2.4.10. Ensayo para fenoles

Mediante la prueba con cloruro férrico: Se tomó 2 mL del extracto y se trató con cloruro férrico al 5%, para la validación del ensayo se debe constatar el cambio de coloración a rojo vino, azul o negro. En la Figura 26 se observan los resultados obtenidos de esta prueba (Rodríguez et al., 2017).

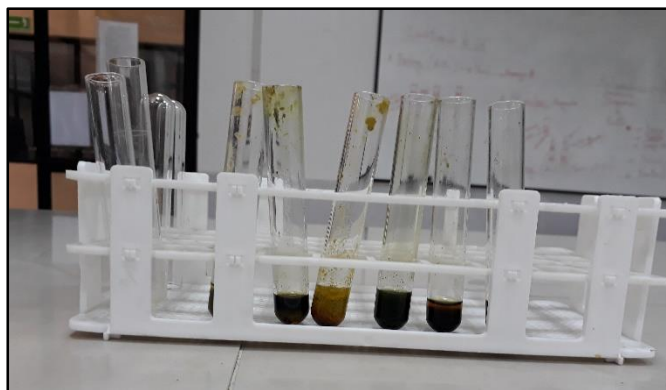


Figura 26: Ensayo para determinar la presencia de fenoles en los extractos estudiados
Fuente: Autor

3.3.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS, MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR, DETERMINANDO QUE CONCENTRACIÓN TIENE MAYOR EFECTO ANTIMICROBIANO

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión de discos utilizada por Azuero et al. (2016) y descrita por Bauer et al. (1966), empleando la cepa purificada de *Colletotrichum gloeosporioides* frente a los extractos obtenidos.

3.3.1. Preparación del inóculo

Se realizó los siguientes procedimientos:

3.3.1.1. Lavado de esporas

Tabla 7: Equipos y materiales utilizados para la obtención de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Equipos	Materiales
Cámara de flujo laminar	Vaso de precipitación de 100 mL
Estufa Mermmet (28 °C)	Embudo de vidrio
Micropipeta de 10 - 100 – 200 uL	Gasa estéril
	Tubos de ensayo
	Agua destilada estéril
	Mechero
	Jeringas

El lavado de esporas se realizó a partir una cepa purificada de *Colletotrichum gloeosporioides* cultivada en un matraz de 1000 mL durante 15 días [Figura 27].

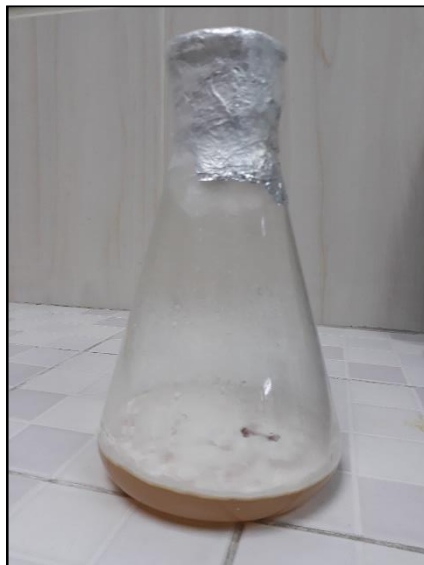


Figura 27: *Colletotrichum gloeosporioides* utilizado para el lavado de esporas

Fuente: Autor

El procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar, evitando cualquier tipo de contaminación que se pudiera suscitar en el proceso. Se realizó siete lavados con 10 mL de agua destilada estéril cada uno, se raspó la superficie del hongo con ayuda de una asa estéril y se agitó vigorosamente con la finalidad de obtener el mayor número de esporas posibles. Seguidamente se filtró a través de una gasa estéril para impedir el paso de fracciones de medio de cultivo o micelio del hongo que se desprende por la agitación (Ruiz et al., 2011). Los filtrados se almacenaron en tubos de ensayo y posteriormente se realizó el conteo de esporas.

3.3.1.2. Conteo de esporas en la Cámara de Neubauer

Tabla 8: Equipos y materiales usados para determinar la concentración de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*

Equipos	Materiales
Cámara de flujo laminar	Suspensión madre de esporas
Microscopio compuesto	Agua destilada estéril
Cámara de Neubauer	Tubos de ensayo
	Micropipeta de 10 uL
	Cubre objetos

Con ayuda de una micropipeta con capacidad de 10 uL se tomó una muestra de la suspensión madre de esporas, el conteo se realizó en la cámara de Neubauer siguiendo el procedimiento ejecutado por Salazar et al. (2012). La cámara cargada de la muestra se observó mediante un microscopio compuesto y se procedió a enfocar las cuadrículas correspondientes para realizar el conteo [Figura 28], obteniendo una concentración final de 1×10^6 esporas/mL (Taborda, 2013).

La concentración final de esporas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de esporas/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células} \times 100000}{\text{número de cuadrantes contados}}$$

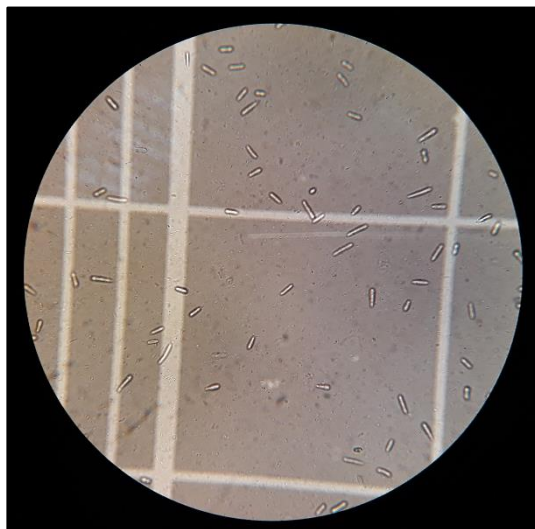


Figura 28: Conteo de esporas en la cámara de Neubauer bajo el lente de un microscopio compuesto con aumento de 40X

Fuente: Autor

3.3.2. Preparación de los extractos vegetales a diferentes concentraciones

Tabla 9: Equipos y materiales utilizados para la preparación de los extractos

Equipos	Materiales
Cámara de flujo laminar	Extractos etanólicos
	Agua destilada estéril
	Tubos cónicos de 1.5 mL
	Micropipeta de 100 uL

Se prepararon concentraciones al 30%, 60% y 100% en una relación v/v con agua destilada estéril. Previo a la preparación de las concentraciones los extractos fueron filtrados mediante filtros Millipore de 0,45 μm acoplables a jeringas, los cuales se pueden observar en la Figura 2). Las soluciones se realizaron en tubos cónicos de 1.5 mL de capacidad, para lo cual con ayuda de una micropipeta de 100 uL regulables se tomó 30 uL de extracto y 70 uL de agua destilada estéril, se agitó suavemente la mezcla hasta homogenizarla, obteniéndose una concentración al 30% del extracto. El mismo procedimiento se realizó para obtener una concentración al 60%; tomando 60 uL de extracto y 40 uL del agua destilada estéril, el extracto puro representó la concentración al 100% (Tabla 10).

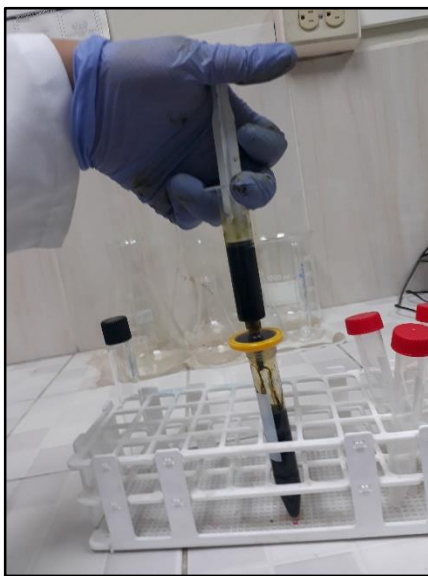


Figura 29: Filtración de los extractos mediante filtros Millipore previo a la dilución de los mismos.

Fuente: Autor

Tabla 10: Tratamientos evaluados para determinar la actividad antimicrobiana de romero y cola de caballo

Tratamientos	Descripción
R1	Extracto de romero al 30%
R2	Extracto de romero al 60%
R3	Extracto de romero al 100%
CC1	Extracto de cola de caballo al 30%
CC2	Extracto de cola de caballo al 60%
CC3	Extracto de cola de caballo al 100%
ME1	Mezcla de extractos al 30%
ME2	Mezcla de extractos al 60%
ME3	Mezcla de extractos al 100%
AD [Control negativo]	Agua destilada estéril
C [Control positivo]	Carbendazim al 80%

3.3.3. Comparación de la actividad antifúngica de los extractos mediante prueba de sensibilidad por discos

Tabla 11: Equipos y materiales para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de romero y cola de caballo frente a *Colletotrichum gloeosporioides*

Equipos	Materiales
Cámara de flujo laminar	Discos de papel filtro
	Vaso de precipitación
	Agua destilada estéril
	Micropipeta de 10 - 100 uL
	Pinza estéril
	Mechero

Se determinó la actividad antimicrobiana de tres productos: extracto de *Rosmarinus officinalis* L., extracto de *Equisetum arvense* L. y la mezcla de ambos extractos, cada producto fue evaluado a tres diferentes concentraciones [30%, 60%, 70%].

Se siguió la metodología utilizada por Basulto et al. (2011), para lo cual con ayuda de una micropipeta se tomó 20 uL del inóculo y se dispersó sobre la superficie de la caja Petri en diferentes direcciones mediante una asa Drigalski estéril para asegurar la distribución uniforme del mismo. Seguidamente se colocaron los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro debidamente embebidos con 10 uL de las concentraciones a evaluarse. Se colocó cuatro discos en cada caja Petri, distribuyéndose de la siguiente manera: dos discos embebidos con extracto, un disco embebido con agua destilada estéril y un disco embebido con el fungicida control [Figura 30]. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril

y como control positivo el fungicida Yoke cuyos principios activos son carbendazim y tebuconazole.

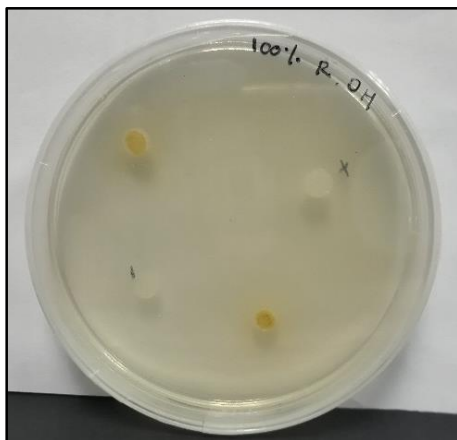


Figura 30: Distribución de los discos para evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos
Fuente: Autor

Las placas Petri fueron incubadas a 28 °C en una estufa marca Memmert por 48 horas a partir de lo cual se llevó a cabo las lecturas durante los siguientes tres días.

Las zonas claras que se forman alrededor de los discos se consideran como halos de inhibición los cuales fueron medidos, registrando el diámetro de los halos en milímetros.

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se empleó la siguiente fórmula establecida por Cruz et al. (2010).

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{diámetro del halo de inhibición del tratamiento}}{\text{diámetro del halo de control positivo}} \times 100\%$$

Los resultados de las mediciones fueron analizados mediante un modelo estadístico completamente al azar de 3 tratamientos con 3 repeticiones y 9 unidades experimentales para cada producto[E. de romero, E. de cola de caballo, mezcla de extractos] evaluado.

Tabla 12: Diseño experimental para determinar la actividad antifúngica de los extractos

Producto	Extracto etanólico de romero			Extracto etanólico de cola de caballo			Mezcla de extractos			Total
	30%	60%	100%	30%	60%	100%	30%	60%	100%	
Tratamientos										
Repeticiones										
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
Total	3	3	3	3	3	3	3	3	3	27

3.4.DETERMINACIÓN DE LA CMI DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO, DETERMINANDO SU ACCIÓN ANTIFÚNGICA

3.4.1. Preparación del caldo papa

Tabla 13: Equipos y materiales usados para la preparación del caldo papa

Equipos	Materiales
Balanza analítica	Papel filtro
Autoclave	Vaso de precipitación de 1000 mL
pH-Metro	Agua destilada estéril
	Glucosa
	Varilla de vidrio
	Cocineta

Se utilizó caldo papa como medio de cultivo para determinar la MIC de cada extracto por medio de una microplaca de 96 pocillos.

Se pesó 12,5 g de harina de papa y se disolvió en 1 litro de agua destilada, se llevó a ebullición durante 30 minutos y se filtró [Figura 31]. Posteriormente se añadió glucosa y se ajustó el pH a 5.5, El caldo fue esterilizado a 121 °C durante 20 minutos (Harrigan & McCance, 2014).



Figura 31: Filtración del caldo papa
Fuente: Autor

3.4.2. Preparación del inóculo

El procedimiento para la preparación del inóculo se llevó a cabo de la misma forma descrita en el apartado 3.3.1. [Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos obtenidos mediante difusión en agar].

3.4.3. Microdilución

Tabla 14: Equipos y materiales utilizados para la preparación de la microplaca

Equipos	Materiales
Cámara de flujo	Microplaca de 96 pocillos
Estufa Mermmet (28 °C)	Vaso de precipitación de 100 mL
	Micropipeta de 100 – 200 uL regulables
	Parafilm

El método de microdilución en caldo se llevó a cabo de acuerdo al protocolo M38-A de la CLSI (Suárez et al., 2013). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos estériles siguiendo la técnica aplicada por Moreno et al. (2016), los extractos se aplicaron a diferentes concentraciones realizando los cálculos necesarios para llegar a una concentración de 75% para R [romero] y 80% para CC [cola de caballo] y ME [mezcla de extractos]; considerando que la capacidad del pocillo es de 200 uL, mismo que debe ser cargado con caldo papa, inóculo y los extractos.

A continuación se dispuso en la microplaca las primeras 9 columnas para los extractos: [1-3: Extracto de R], [4-6 Extracto de CC], [7-9 ME]; las siguientes dos columnas [10-11] correspondieron para el fungicida al 80% y la última columna [12] únicamente para el caldo papa más el inóculo [Figura 32]. Para las concentraciones de los extractos vegetales se siguió el método de doble dilución iniciando con las siguientes concentraciones [Tabla 15]:

Tabla 15: Tratamientos aplicados en la microplaca

Columna	Descripción
Columna 1 [R]	75%, 35%, 17.5%, 8.75%, 4.37%, 2.18%, 1.09%, 0,54%
Columna 2 [R]	75%, 35%, 17.5%, 8.75%, 4.37%, 2.18%, 1.09%, 0,54%
Columna 3 [R]	75%, 35%, 17.5%, 8.75%, 4.37%, 2.18%, 1.09%, 0,54%
Columna 4 [CC]	80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%
Columna 5 [CC]	80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%
Columna 6 [CC]	80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%
Columna 7 [ME]	80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%
Columna 8 [ME]	80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%
Columna 9 [ME]	80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%
Columna 10[Control positivo]	Caldo papa + inculo + fungicida
Columna 11 [Control positivo]	Caldo papa + inculo + fungicida
Columna 12[Control de crecimiento]	Caldo papa + inculo

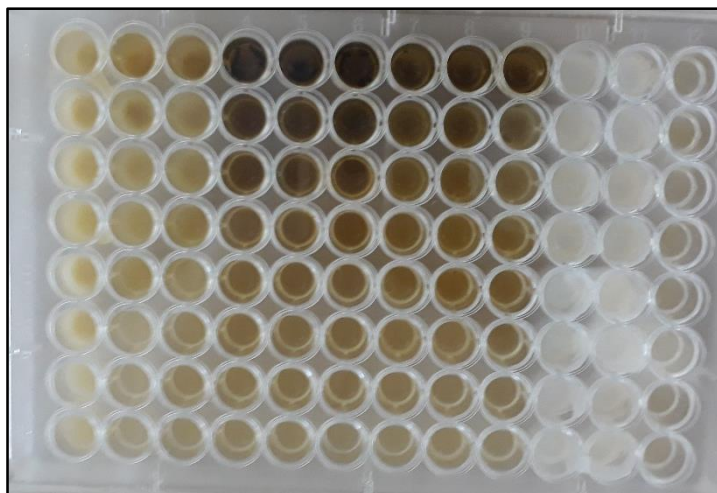


Figura 32: Preparación de la microplaca

Fuente: Autor

3.4.4.

Una vez finalizado el procedimiento se selló la placa y se incubó a 28 °C en una estufa Memmert durante cinco días para su posterior revelación con Resazurina, para lo cual se procedió a colocar 10 uL de una solución de resazurina al 0.6% en todos los pocillos de la microplaca [Figura 33]; determinando la viabilidad celular por el cambio de color de azul a rosado, en caso de existir actividad metabólica, y quedando de color azul cuando no existe dicha actividad.

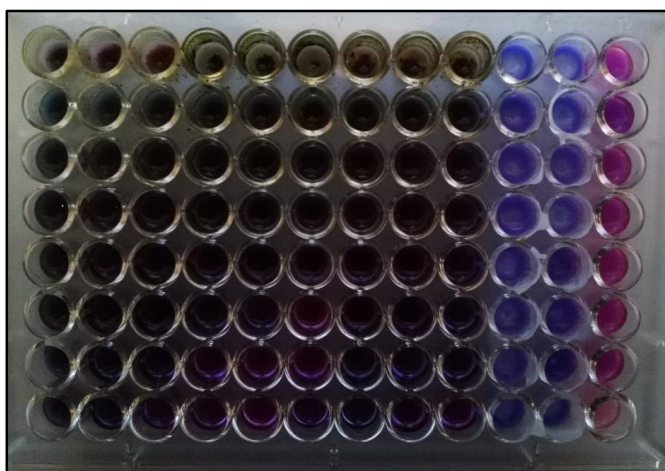


Figura 33: Revelación de la microplaca con resazurina

Fuente: Autor

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

4.1.1. Recolección de muestras de *Solanum betaceum* Cav. y aislamiento del fitopatógeno en condiciones de laboratorio

Se recolectaron cinco frutos y dos hojas con sintomatología típica de la enfermedad de diferentes ejemplares de *Solanum betaceum* Cav. en la finca agroecológica “Agruco”, de los cuales se obtuvieron cuatro fragmentos de cada órgano, mismos que fueron depositados en siete cajas Petri que contenían PDA. Transcurrido el tiempo de incubación a 28 °C se obtuvieron las colonias que fueron codificadas, y constan en la tabla a continuación [Tabla 16]:

Tabla 16: Cultivos aislados a partir de órganos de *Solanum betaceum* Cav.

Cultivo inicial	Cultivo madre	Colonia aislada
F1	PF111	PF111
F2	PF23	PF231
		PF232

		PF233
F3	PF31	PF311
F4	PF43	PF431
		PF432
		PF433
		PF434
F5	PF53	PF531
		PF532
		PF533
H1	PH14	PF141
		PF142
		PF143
		PF144
H2	PH22	PF221
		PF222

4.1.2. Identificación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Se identificó la posible presencia de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en las colonias aisladas a partir de los frutos de *Solanum betaceum* Cav., correspondiente al código PF431.

4.1.2.1. Pruebas macroscópicas de las características fúngicas

Para la identificación macroscópica se tomó en cuenta las estructuras que se pueden observar a simple vista y que permiten la diferenciación de otros microorganismos. El análisis se llevó a cabo de acuerdo a Valenzuela et al. (2014) utilizando claves taxonómicas para la identificación de hongos según Sutton (1980). En la Tabla 17 se detallan las características macroscópicas típicas de *Colletotrichum gloeosporioides* que se comprobaron en la presente investigación.

Tabla 17: Características macroscópicas de la colonia de *Colletotrichum gloeosporioides*

Características	Descripción
-----------------	-------------

Diámetro de la colonia	6.5-7 cm
Crecimiento	Lento [Máximo crecimiento 15 días]
Coloración de la colonia	Blanco amarillento o crema con centro anaranjado
Coloración reversa de la colonia	Amarillento con centro salmón oscuro
Borde de la colonia	Ondulado
Forma miceliar	Masas conidiales aglomeradas y algodonoso
Color miceliar	Anaranjado en forma de gotas

Las características mencionadas en la tabla anterior concuerdan con la investigación realizada por Rojo et al. (2017) “Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control”, en donde describen las características relevantes de la colonia de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., siendo su crecimiento micelial en forma radial con margen ondulado y con una coloración blanquecina con masas conidiales anaranjadas en el centro de la colonia.

Estas características son similares a las reportadas por Trinidad et al. (2017) en su estudio “Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México”, debido a que alude las características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., mismas que son semejantes a las descritas en este estudio, entre las cuales se puede mencionar: la coloración de la colonia blanco – crema, su crecimiento lento, el micelio compacto y algodonoso [Figura 34], las masas conidiales color salmón tendiendo a negro y distribución concéntrica.

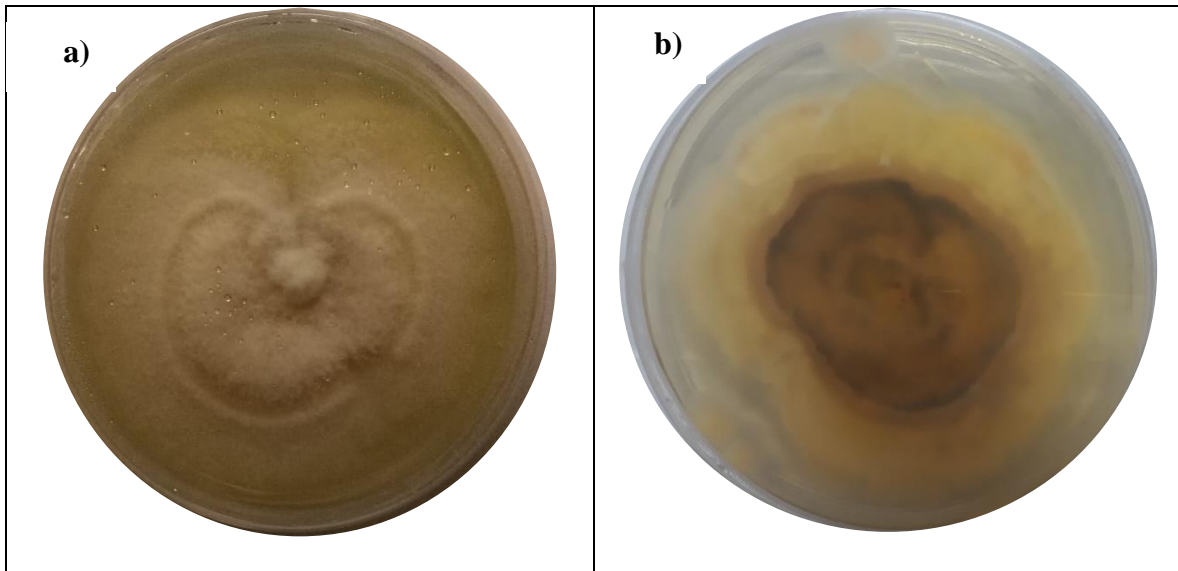


Figura 34: a) Características morfológicas de la colonia de *Colletotrichum gloeosporioides*; b) Características de la parte reversa de la colonia de *Colletotrichum gloeosporioides*

Fuente: Autor

Aunque la coloración de la colonia se mantiene en los primeros días de incubación, estos pueden variar a salmón oscuro según como aumente la edad del cultivo; esta variación en cuanto al color ha sido reportado por Castro et al. (2003) en su investigación: “Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* spp. como el agente causal de la antracnosis en ñame *Diocorea* sp.”, quienes indican que la variación de la morfología de las colonias está en dependencia del medio o sustrato, así como también las diferentes condiciones a las que se someta el cultivo.

Investigaciones realizadas señalan el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. como rápido, sin embargo en este estudio el crecimiento del microorganismo fue relativamente lento, información que es respaldada por Santacruz (2013) en su investigación “Caracterización morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum* spp. causante de la antracnosis en fruto de ají y pimentón *Capsicum* spp. en el Valle del Cauca”. El autor señala que bajo las mismas condiciones de temperatura, luminosidad, humedad y

tiempo de incubación, algunas colonias obtuvieron su máximo crecimiento, es decir, colmaron la totalidad del diámetro de la caja Petri, mientras que otras solamente registraron 6.25 cm, alcanzando su máximo crecimiento días después.

4.1.2.2. Pruebas microscópicas de las características fúngicas

Los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. se caracterizan por tener una forma cilíndrica. Para la medición del tamaño de los conidios se escogió al azar un total de 50 conidios registrando los siguientes valores: 13,42 um para la longitud y 4,6 um para el ancho; obteniendo valores similares a los descritos por Rojo et al. (2017) “Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control”; en el cual los autores mencionan que el tamaño de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* es de 13.56-14.24 x 4-4.02 um, siendo cilíndricos, información que se corrobora en esta investigación.

Estudios realizados por Castro et al. (2003) consideran que el tamaño de los conidios puede variar dependiendo las condiciones en campo o bajo condiciones controladas, sin embargo en la presente investigación el tamaño de los conidios de los aislamientos son semejantes; presentando mediciones de longitud y ancho similares, considerándose como un factor importante para la caracterización.

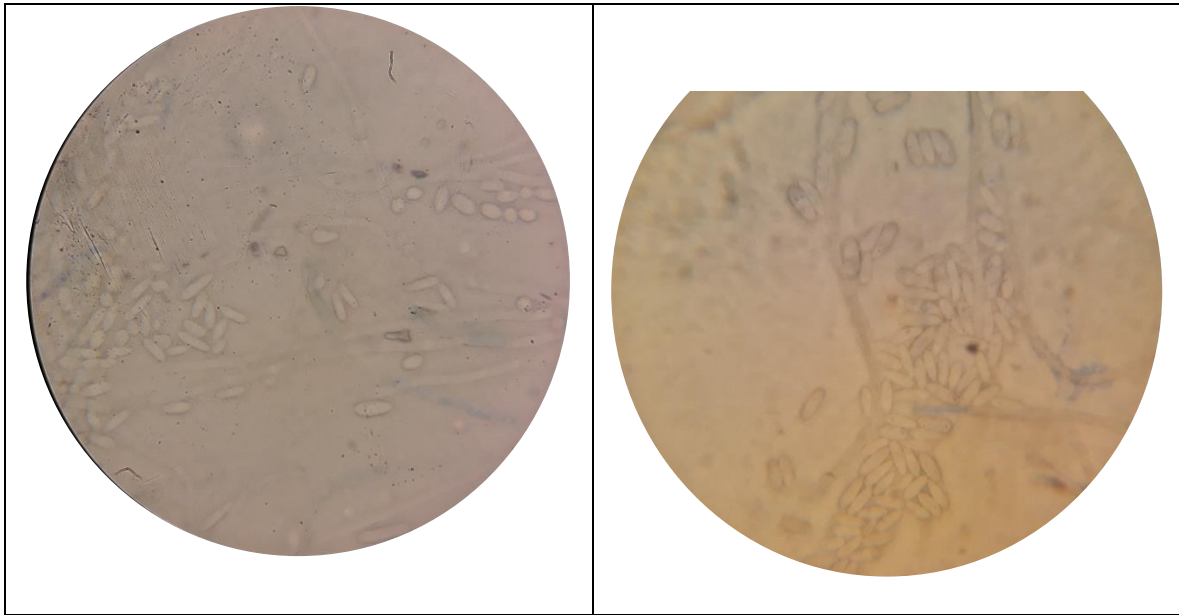


Figura 35: Conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. bajo el lente 40X de un microscopio compuesto
Fuente: Autor

Según Contreras (2006) en su estudio “Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Mangifera indica* L) y tallos de mora (*Rubus glauncus* Benth) con síntomas de antracnosis”, el tamaño de los conidios para *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. varía entre 12-17 x 3.5 – 6 um, por lo tanto, los valores mencionados en la presente investigación en cuanto al tamaño de los conidios se encuentran dentro de los parámetros mencionados por Contreras (2006).

4.2.OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis* L.

Y *Equisetum arvense* L.

Siguiendo la metodología propuesta por Azuero et al. (2016), las plantas fueron recolectadas en el cantón Gualaceo, 2 kg de planta fresca para el romero y 1 kg para la cola de caballo. Reduciéndose la cantidad de materia prima una vez finalizado el procedimiento de desecación, obteniendo 800 g de romero pulverizado y 300 g de cola de caballo; mismos que fueron macerados en etanol al 96% en una relación 1:3 para ambas especies, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. [Obtención de extractos etanólicos de romero y cola de caballo]. En la Tabla 18 se detallan las cantidades en gramos de materia prima usadas para la maceración y el volumen de extracto concentrado obtenido.

Tabla 18: Cantidad de materia prima usada y volumen obtenido en la extracción por maceración

Especies	Masa en gramos de planta (g)	Volumen del macerado filtrado (mL)	Volumen de extracto concentrado (mL)
Romero	800	1200	30
Cola de caballo	300	2900	25

4.2.1. Análisis de la estabilidad físico-química de los extractos etanólicos de

Rosmarinus officinalis L. y *Equisetum arvense* L.

Para cada parámetro evaluado se obtuvieron tres mediciones, siendo el promedio considerado como el resultado, los cuales se detallan en la Tabla 19.

Tabla 19: Parámetros físicos-químicos y caracteres organolépticos evaluados para cada extracto

Análisis	Parámetro evaluado	Resultados	
		Romero	Cola de Caballo
Físicos	Índice de Refracción	1.347	1.373

	Densidad Relativa	0.901	0.959
Químicos	pH	4.36	5.16
Organolépticos	Aspecto	Espeso-Grumoso	Líquido
	Color	Verde claro	Verde oscuro
	Olor	Característico	Característico

El olor en ambos extractos es característicos de cada especie y el pH ligeramente ácido.

En la Tabla 19 se expresan los resultados del análisis de los parámetros físico-químicos de las especies estudiadas. Los resultados para la densidad e índice de refracción de *Rosmarinus officinalis* concuerdan los resultados reportados por Estrada (2010) en su trabajo experimental “Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*)” obteniendo los siguientes valores 0.97 y 1.37 para la densidad e índice de refracción respectivamente, siendo muy similares a los valores obtenidos en esta investigación.

Para *Equisetum arvense* L. se obtuvieron los siguientes resultados: pH 5.16, índice de refracción 1.37 y densidad relativa 0.95; estos valores son similares a los conseguidos por Orozco (2013) en su investigación “Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado en base a los extractos de Molle (*Schinus molle*), Cola de Caballo (*Equisetum arvense* L.), Linaza (*Linum usitatissimum*) en ratones (*Mus musculus*)”, sin embargo difieren en el pH, ya que el obtenido en su investigación fue de 4.85 y en la presente investigación fue de 5.16.

Proaño (2013) en su investigación “Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de Romero (*Rosmarinus officinalis*), Matico (*Piper aduncum*) y Cola de Caballo (*Equisetum arvense*) en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*)” reportó resultados

similares a los expuestos en este trabajo para los parámetros físico-químicos evaluados en ambas especies, a excepción del pH en el extracto de romero que fue mayor en esta investigación.

Las lecturas de los valores de pH de los dos extractos vegetales fluctúan entre 4.36 y 5.16 encontrándose dentro de rangos ácidos, lo cual los mimos, así como lo menciona Ramírez et al. (2018) en su investigación “Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hoja de *Guazuma ulmifolia* Lam. contra fitopatógenos”.

4.2.2. Ensayos para el análisis fitoquímico de los extractos

El tamizaje fitoquímico se realizó con la finalidad de determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en los extractos, por medio de pruebas de identificación de cambio de coloración o la formación de precipitados que establecen la presencia o ausencia de metabolitos secundarios específicos (Proaño, 2013). Se efectuaron los siguientes ensayos, realizándose por duplicado para cada extracto.

Tabla 20: Análisis fitoquímico de las especies evaluadas *Rosmarinus officinalis* y *Equisetum arvense*

Grupo Fitoquímico / Ensayo		Extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i>	Extracto etanólico de <i>Equisetum arvense</i>
Catequinas	Ensayo con Na ₂ CO ₃	+++	+
Resinas	Ensayo con agua destilada	++	+
Saponinas	Ensayo de espuma	+++	++
Fenoles	Ensayo con FeCl ₃	+	+
Quinonas	Ensayo de Borntrager	-	-
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	+++	++

Lactonas	Ensayo con reactivo Baljet	+++	++
Antocianinas	Ensayo con alcohol amflico	-	++
Alcaloides	Ensayo de Dragendorff	++	+
Triterpenos	Ensayo de Liebermann-Buchard	++	+++
Taninos	Ensayo con HCl concentrado	+	+

Simbología: +++ Abundante, ++ Evidente, + Escaso, - Ausente

ROMERO [*Rosmarinus officinalis* L.]

En la Tabla 20 se describen los resultados de los principales metabolitos secundarios evaluados en los extractos etanólicos de romero y cola de caballo, obteniendo resultados positivos para diferentes grupos fitoquímicos.

Para el caso de *Rosmarinus officinalis* L. los resultados expuestos anteriormente, son parecidos con los resultados del análisis de algunos grupos químicos detallados por Estrada (2010) en su trabajo experimental “Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*)”, a excepción del grupo químico quinonas, ya que en su estudio la presencia de este metabolito secundario fue ligeramente positivo y en este estudio no se observó presencia alguna de este compuesto. Otra diferencia significativa es la presencia del metabolito secundario saponinas debido a que el análisis mediante la prueba de espuma realizada en este trabajo resultó altamente abundante, sin embargo Estrada (2010) propone que la presencia de saponinas en el extracto de romero es ligeramente positivo. En los demás grupos fitoquímicos evaluados no existe una variación relevante que se pueda mencionar.

Resultados semejantes a los detallados en esta investigación los propone Pomagualli (2018) en su trabajo experimental “Actividad antimicrobiana del extracto alcohólico y aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “Romero” frente a la cepa *Pseudomona aeruginosa*”, en el ensayo que realizó para los grupos químicos quinonas y antocianinas resultó negativo al igual que en este estudio, existiendo mucha similitud en los resultados para los demás grupos químicos.

Lo detallado en la Tabla 20 se respalda con la información que proporciona Proaño (2013) en su trabajo experimental “Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de Romero (*Rosmarinus officinalis*), Matico (*Piper aduncum*) y Cola de Caballo (*Equisetum arvense*) en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*)” en donde el autor expone que los componentes mayoritarios presentes en el extracto de romero son los siguientes: alcaloides, flavonoides, quinonas, saponinas, lactonas y triterpenos. Los demás grupos fitoquímicos como resinas, fenoles, taninos se encuentran en menores cantidades, sin embargo no dejan de ser menos importantes, puesto que cada uno de ellos cumplen una función específica en el normal funcionamiento de la planta, o bien dentro del campo en el que se aplican los productos obtenidos; siendo estos extractos o aceites esenciales.

COLA DE CABALLO [*Equisetum arvense* L.]

Según el análisis cualitativo realizado, el extracto etanólico de cola de caballo presenta los siguientes compuestos que fueron evidenciados fácilmente: saponinas, flavonoides, lactonas, antocianinas y triterpenos. Mientras que las resinas, catequinas, fenoles, alcaloides y taninos se evidenciaron ligeramente.

De acuerdo con la investigación realizada por Alonzo, Letrán y Sánchez (2009): “Actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre hongos fitopatógenos”, el género *Equisetum* posee una cantidad considerable de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos, ácido aconitínico y ácido salicílico; lo cual se comprueba en este estudio, puesto que se observa la presencia de cada uno de ellos. Cabe destacar que la presencia de metabolitos secundarios no va a depender únicamente del género sino también de la familia e incluso especie (Robles et al., 2016).

Lo mencionado anteriormente concuerda con lo expuesto por Calsin (2017) “Actividad antimicrobiana *In vitro*” del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* uropatógenos” quien concluye que la planta “Cola de caballo” contiene muchos minerales entre los que destaca el sílice, magnesio y cromo, ácidos como el salicílico y esquisético, glucósidos, saponinas, flavonoides y taninos.

De igual forma Al – Snafi (2017) “The pharmacology of *Equisetum arvense* - A review”, el análisis fitoquímico preliminar demostró que la planta contiene gran cantidad de alcaloides, carbohidratos, fitoesteroles, saponinas, ácido ascórbico y silícico, fenoles, taninos, flavonoides y triterpenos; muchos de los cuales se pueden observar en los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Equisetum arvense* L detallados en la Tabla 20.

Orozco (2013) reportó resultados similares a los que se presenta en este trabajo, en el cual realizó el análisis fitoquímico de tres tipos de extractos de *Equisetum arvense*: etéreo, alcohólico y acuoso; siendo el extracto alcohólico el que presenta mayor similitud con los

resultados obtenidos en esta investigación, a excepción de los taninos que en esta investigación se evidenciaron ligeramente.

Se deben tener en cuenta los factores que pueden influir en el proceso de extracción de los metabolitos secundarios, así como el órgano de la planta utilizado, tipo de extracción, tipo de solvente y el método por el cual se analizan los principales grupos fitoquímicos, mismos que pueden influir directamente en los resultados obtenidos. Estos factores son muy importantes, ya que pueden ser la causa por la cual algunos de los resultados de los trabajos mencionados difieren de los resultados expuestos en este trabajo experimental.

4.3.COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DISCOS

Se realizó el lavado y conteo de esporas para la preparación del inóculo según lo descrito en el apartado 3.3.1. [Preparación del inóculo], obteniendo una concentración final de 10^6 esporas/mL equivalente a 1 110 000 células.

Las mediciones de los halos de inhibición se realizaron durante cuatro días, en la Tabla 21 se detallan los halos de inhibición generados por los diferentes tratamientos a diferentes concentraciones, teniendo en cuenta también los halos de inhibición formados por el

control positivo, considerando que previamente se calculó el promedio de los halos formados por cada tratamiento.

Tabla 21: Diámetros en mm de los halos de inhibición generados por los tratamientos evaluados sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

Extracto	Tratamiento	Promedio de halos de inhibición [mm]
Romero	R1	6.38
	R2	6.55
	R3	7.40
Cola de caballo	CC1	6.33
	CC2	6.5
	CC3	6.79
Mezcla de extractos	ME1	6.62
	ME2	6.9
	ME3	7.15

En la Tabla 21, los tratamientos R3 y ME3 son los que generaron un mayor halo de inhibición con un diámetro de 7.40 y 7.15 mm respectivamente; mientras que los tratamientos CC1 y R1 generaron halos de inhibición menores con un diámetro de 6.33 y 6.38 respectivamente. En general se puede decir que el tratamiento con cola de caballo no posee actividad fungicida significativa contra *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., debido a que el máximo halo de inhibición generado fue de 6.79 mm, mientras que el más efectivo resultó ser el tratamiento con *Rosmarinus officinalis* L. al 100% generando un halo de inhibición de 7.40 mm.

Para conocer la efectividad de los tratamientos evaluados sobre el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., se calculó el porcentaje de inhibición de cada uno de ellos mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{diámetro del halo de inhibición}}{\text{diámetro del halo de control}} \times 100$$

Los resultados del porcentaje de inhibición se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22: Porcentaje de inhibición del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*

Extracto	Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	Diámetro de control positivo (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
Romero	R1	6.38	25	25.52
	R2	6.55	25	26.2
	R3	7.4	25	29.59
Cola de caballo	CC1	6.33	25	25.33
	CC2	6.5	25	25.99
	CC3	6.79	25	27.16
Mezcla de extractos	ME1	6.62	25	26.45
	ME2	6.9	25	27.63
	ME3	7.15	25	28.59

Como se puede observar en la Tabla 22 el mayor porcentaje de inhibición obtenido es 29.6 y 28.6 %, los cuales corresponden a los tratamientos de R3 y ME3 respectivamente, en comparación a los tratamientos R2 y CC2 con un porcentaje de inhibición de 26.2 y 26 respectivamente.

Silva et al. (2009) en su investigación “*In vitro* effect of plant compounds on the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolated from passion fruit” en la cual evaluaron el efecto *in vitro* de extractos acuosos, hidrolatos y aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L., *Cordia verbeacea* DC., *Solanum sisymbriifolium* Lam., *Phyllanthus corcovadensi*, *Eclipta alba* Hass y *Curcuma longa* L. sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado del maracuyá, utilizando la metodología de dilución vertieron 100 uL de los compuestos y extendieron sobre la caja Petri que contenía el microorganismo. Consiguiendo resultados relevantes únicamente con los tratamientos con aceite esencial, obteniendo una inhibición al 100% del crecimiento micelial del

microorganismo; a diferencia de los extractos acuosos que presentaron escasa actividad fungicida.

En esta investigación se evidencia que el porcentaje de inhibición de todos los tratamientos no supera el 30%, presentando una actividad antifúngica leve; de igual forma los halos de inhibición formados fueron sumamente pequeños, lo cual concuerda con la investigación mencionada anteriormente. Esto puede ser debido a la baja concentración o ausencia de los principios activos con actividad antimicrobiana en relación a la concentración de principios activos presentes en los aceites esenciales, según Silva et al. (2008) esto puede suceder debido a que el proceso de extracción (maceración), no ha sido eficiente para la extracción de principios activos antifúngicos, o durante el proceso ocurrió la pérdida de uno de ellos.

Rozwalka et al. (2008) en su publicación “Extracts, decoctions, and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Gromerella cingulata* isolates from guava fruits”, cuya investigación consistió en la evaluación de la actividad antifúngica de diversas especies vegetales entre las cuales se encontraban el romero y cola de caballo sobre el crecimiento micelial de *Gromella cingulata* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Algunos extractos incluyendo la cola de caballo no presentaron ningún efecto inhibitorio frente a estos fitopatógenos, mientras que el extracto de romero presentó una disminución significativa del crecimiento micelial de *Gromella cingulata*, siendo este el estado sexual de *Colletotrichum gloeosporioides*. Lo mencionado anteriormente se corrobora en esta investigación, puesto que ninguno de los tratamientos con *Equisetum arvense* fueron eficaces para inhibir el crecimiento de

Colletotrichum gloeosporioides en condiciones *in vitro*, a diferencia del extracto de *Rosmarinus officinalis* que presento el 29.6% de inhibición.

Con la finalidad de comparar la eficacia de los tratamientos aplicados sobre el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., se procede a realizar el análisis estadístico [SPSS], empleando un Test de Normalidad para determinar si se cumple el supuesto de normalidad.

Tabla 23: Test de Normalidad obtenido mediante el programa estadístico SPSS

	Pruebas de Normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Valor p	Estadístico	gl	Valor p
%	,145	27	,151	,926	27	,056

Inhibición

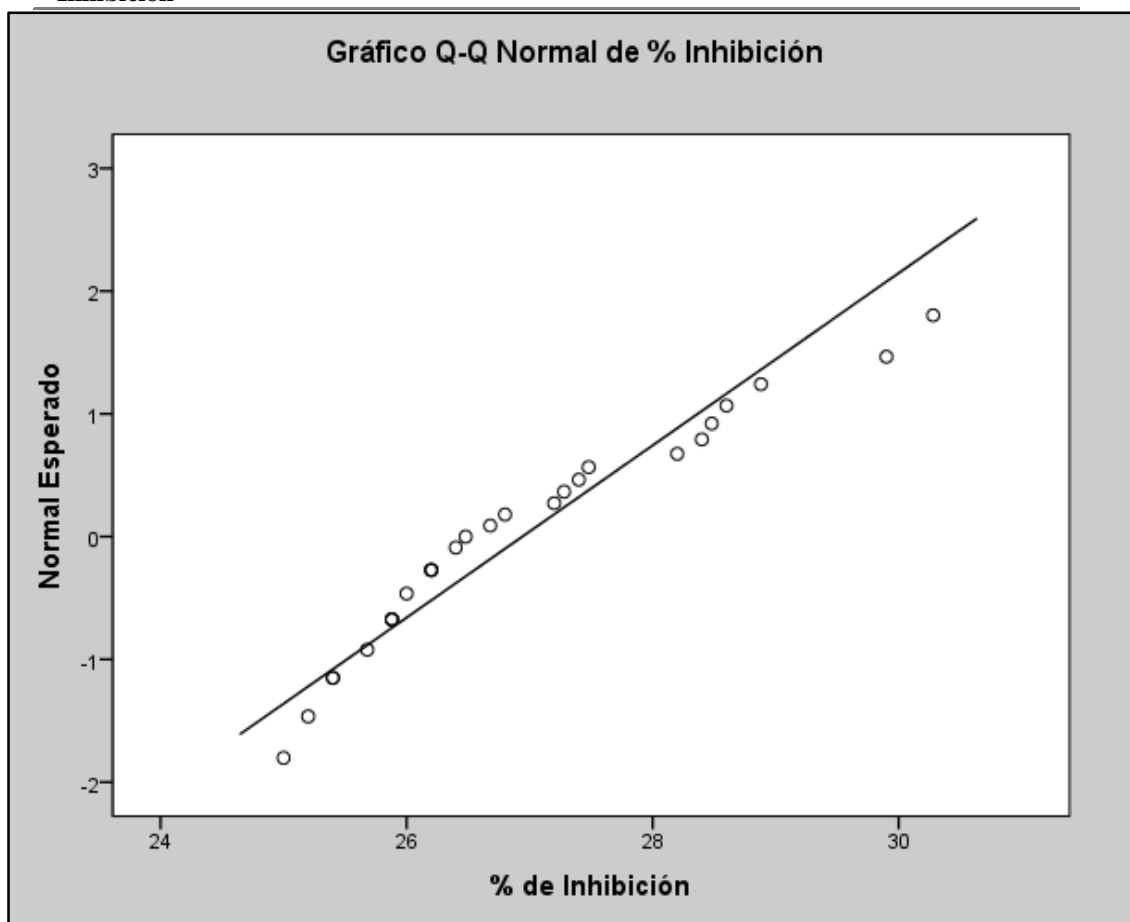


Figura 36: Gráfica de Normalidad

Fuente: Autor

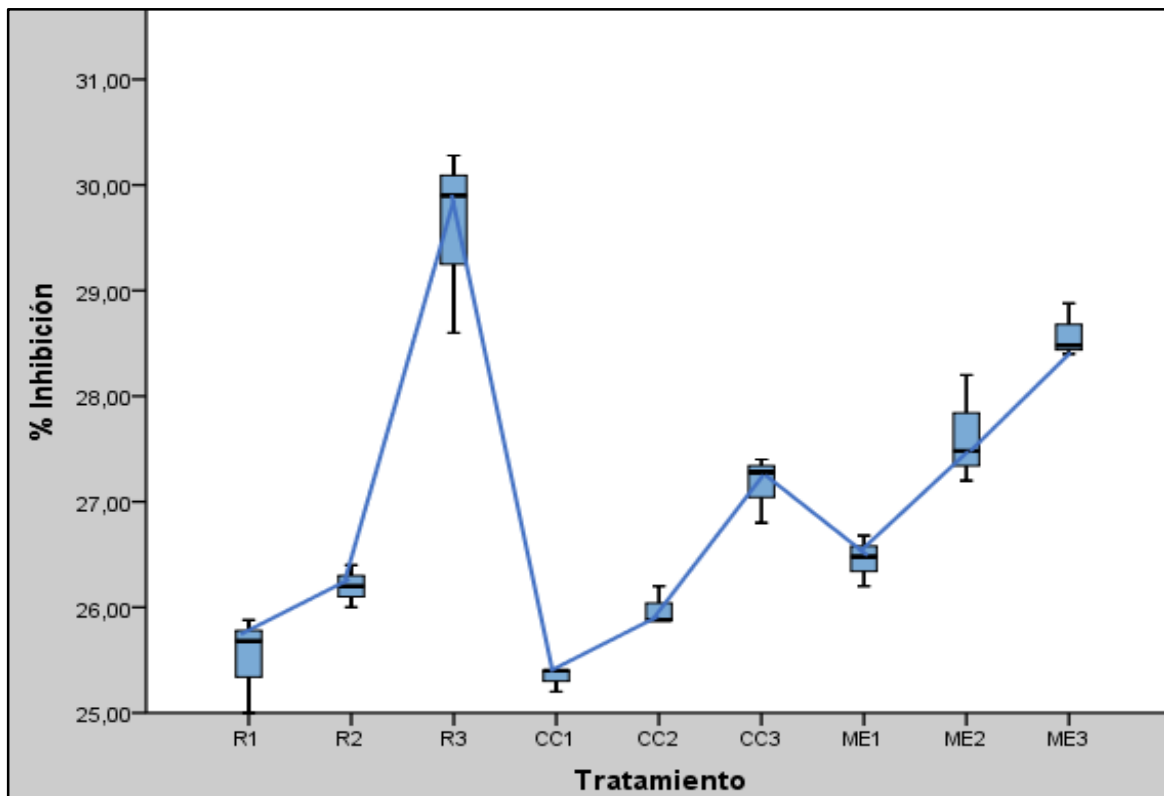
En la Tabla 23 el valor $-p > 0,056$, resultado de la prueba de Shapiro – Wilks, es mayor al valor de la significancia 0,05; por ende, el supuesto de normalidad se cumple existiendo así una distribución normal, lo que permite realizar el análisis de varianza ANOVA [SPSS] aplicando un Diseño Completamente al Azar.

Tabla 24: Análisis ANOVA sobre el porcentaje de inhibición de extractos etanólicos sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

Fuente	G L	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Val or p
Tratamientos	8	50,222	6,2777	35,28	0,0001
Error	18	3,203	0,1780		
Total	26	53,425			

En la Tabla 24 se puede observar los resultados obtenidos del análisis de varianza ANOVA, en donde el valor de p 0,0001 es menor al valor de significancia 0,05, razón por la cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna que establece que los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. y *Equisetum arvense* L. poseen poca capacidad antimicrobiana frente a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., siendo en esta investigación el tratamiento con romero el más eficaz con un halo de inhibición de 7.4 mm y un porcentaje de inhibición de 29.6 %.

En la Figura 37 se puede observar que el tratamiento R3 presenta el mayor porcentaje de



inhibición del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en condiciones *in vitro*, en relación a los demás tratamientos, es decir existen diferencias significativas entre sus medias, ocasionando que ninguna de ellas se puedan traslapar.

En cuanto a los tratamientos con una concentración al 25% [R1, CC1, ME1] se puede observar que presentan diferencias entre sus medias [25.52, 25.33, 26.45], siendo el tratamiento de la mezcla de los dos extractos el más efectivo en este grupo; de igual forma sucede con los tratamientos al 60%, siendo más efectivo el tratamiento ME2 con una media de 27.2 en comparación con el tratamiento R2 [26.20] y CC2 [25.99]. Para los tratamientos con una concentración al 100% el más efectivo resultó ser el tratamiento R3 con una media de 29.59.

Se realizó una prueba de Tukey para establecer el tratamiento que presenta mayor significancia para la inhibición del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Tabla 25: Prueba de Tukey realizada para el porcentaje de inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides*

Figura 37: Diagrama de cajas de los porcentajes de inhibición de los EE de R, CC y ME

Fuente: Autora

R1	3	25.52	A				
CC2	3	25.99	A	B			
R2	3	26.20	A	B			
ME1	3	26.45	A	B	C		
CC3	3	27.16		B	C		
ME2	3	27.63			C	D	
ME3	3	28.59				D	E
R3	3	29.59					E

En la Tabla 25 se puede observar que el tratamiento R3 es significativamente diferente de los demás tratamientos, siendo este el más eficaz para el control *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. De igual forma se puede decir que ME3 es significativo, ya que se evidencia que su media es semejante al tratamiento R3, por lo tanto el control del microorganismo estudiado se debe realizar a concentraciones puras, es decir, se debe aplicar el extracto al 100% para obtener resultados favorables.

4.4.DETERMINACIÓN DE LA CMI DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Para determinar la CMI de los extractos etanólicos frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. se realizó un ensayo mediante una microplaca de 96 pocillos, en donde se distribuyó por triplicado cada tratamientos a diferentes concentraciones [R - 75%; CC – 80%; ME – 80%]. Las CMI alcanzadas por cada uno de los extractos fueron a una concentración de 18.75 % para *Rosmarinus officinalis*, 20 % para *Equisetum arvense* y 40 % para la mezcla de extractos.

Estos valores se obtienen con la revelación de la microplaca mediante resarzurina, en donde se determina que la tinción dada por este reactivo en cada pocillo es un indicador de viabilidad celular, siendo azul para los microorganismos no viables y rosada para los viables.

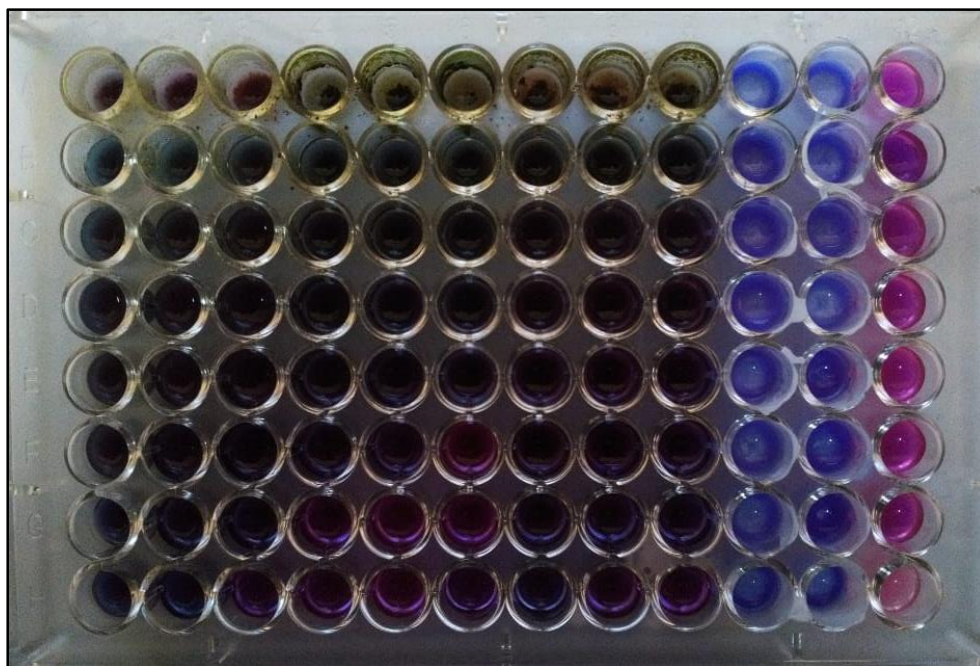


Figura 38: Revelación de la microplaca mediante resazurina tras dos horas de incubación
Fuente: Autor

En la figura 37 se puede observar el cambio de coloración que presenta cada pocillo, considerando que se aplicó el método de doble dilución, iniciando con un concentración de 75 % para el extracto de romero y 80 % el extracto de cola de caballo y mezcla de extractos.

Las tres primeras columnas [1-3] corresponden al tratamiento R [Romero], en donde se observa que el cambio de coloración [azul] ocurre a partir de la tercera fila [Fila C]; es decir a partir de la concentración 18,75 %; de igual forma para el extracto de cola de caballo [CC] que corresponde a las tres siguientes columnas [4-6] ocasionándose el cambio de coloración en la tercera fila [Fila C], es decir a una concentración de 20 %; para la mezcla de extractos se utilizó las columnas 7-9 y el cambio de coloración se evidencia a partir de la concentración 40 %, correspondiente la segunda fila [Fila B].

Martínez (2017) en su trabajo “Evaluación del efecto bactericida del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) *in vitro* en cepa certificada de *Escherichia coli*”. En esta investigación el autor determinó la CMI del extracto de romero frente a una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, en la cual experimentó concentraciones del 20, 40, 60 y 80 %, resultando eficaces las concentraciones al 60 y 80 %, corroborando mediante la siembra directa de una alícuota del pocillo correspondiente a dichas concentraciones sobre agar MacConkey, determinando que estas concentraciones corresponde a la CMI que elimina el 99,9% del número original de bacterias. Los resultados de esta investigación son superiores a los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental; dado que la concentración que se determinó como CMI fue la correspondiente a 18,75 %, comprobándose de igual forma por la siembra directa de una alícuota de este pocillo sobre medio PDA, evidenciándose la ausencia del microorganismo estudiado.

Kukric et al. (2013) en su estudio “Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L” determinó la eficacia del extracto etanólico de *Equisetum arvense* frente a *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* utilizando la técnica de microdilución en caldo demostró que la CMI para *E. coli* fue de 44.5 %, para *S. aureus* la CMI fue 11.14 % y para *B. cereus* fue de 89.10 %.

La cola de caballo ha sido muy estudiada en el campo de la salud humana, sin embargo existen muy pocos estudios del uso de esta planta en el campo de la agricultura. Así lo menciona Alonzo et al. (2009) quienes probaron la actividad antifúngica de diferentes extractos y tinturas de seis especies vegetales, incluyendo *Equisetum arvense* frente a fitopatógenos de importancia económica, entre los cuales se encontraba *Colletotrichum gloeosporioides*. No obstante los resultados no fueron favorables frente a este

microorganismo, debido a que ninguna de las concentraciones aplicadas inhibió el crecimiento micelial del hongo. Estos resultados son diferentes de los obtenidos en esta investigación, ya que se determinó que la CMI de este extracto fue del 20%.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Tras finalizar la presente investigación se concluye que:

Los resultados reflejados en este trabajo experimental demuestran que el uso de plantas para el control de fitopatógenos es un campo ampliamente estudiado, el cual brinda muchos beneficios pero también presenta algunos obstáculos. Debido a que la composición química y cantidad de principios activos son factores que varían de acuerdo a la especie, la edad de la planta y el tejido utilizado, así como también los factores ambientales y el hábitat en el que se desarrolle la especie. Esto explica la discrepancia en cuanto a resultados de las investigaciones que diversos autores han realizado utilizando la misma especie vegetal o incluso la misma metodología.

La identificación y caracterización macroscópica y microscópica de *Colletotichum gloeosporioides* Penz. se realizó en condiciones de laboratorio de forma exitosa.

Los resultados del análisis físico-químico de los extractos vegetales concuerdan con los resultados reportados en varias investigaciones.

El tamizaje fitoquímico de los extractos vegetales demuestra que los principales grupos químicos de *Rosmarinus officinalis* L. son catequinas, saponinas, flavonoides y lactonas; mientras que para *Equisetum arvense* L. son triterpenos, saponinas, flavonoides y lactonas.

La capacidad antimicrobiana de los extractos de *Rosmarinus officinalis* L. y *Equisetum arvense* L. se comprobó mediante pruebas de sensibilidad por discos, realizándose con los siguientes tratamientos R, CC, ME a diferentes concentraciones [30%, 60%, 100%]; de los cuales solo las concentraciones puras presentaron un porcentaje de inhibición de 29.59 % para el caso del tratamiento R3 y 28.59 % para el tratamientos ME3.

La CMI alcanzada por el extracto de romero, aplicando el método de microdilución a concentraciones de 75%, 37.5%, 18.75%, 9.37%, 4.68%, 2.34%, 1.17% y 0.58% fue de 18.75%; mientras que para el extracto de cola de caballo y mezcla de extractos a concentraciones de 80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1.25% y 0.63%, fue de 20% para la cola de caballo y 40% para la mezcla de extractos.

Los resultados obtenidos por medio del análisis estadístico, acepta la hipótesis alterna que establece que los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Equisetum arvense* son poco eficientes para el control *in vitro* del crecimiento miceliar de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

5.2.RECOMENDACIONES

Se recomienda:

Probar diferentes métodos de extracción o solventes de extracción, así como también diferentes formas de aprovechamiento del material vegetal [fresco], ya que estos factores serían claves para la obtención de principios activos.

Considerar que la temperatura de extracción de los metabolitos secundarios debe ser la adecuada [60 °C es la temperatura recomendable para la mayoría de metabolitos secundarios], ya que a temperaturas elevadas se pueden evaporar algunos componentes.

Trabajar en condiciones estériles durante el desarrollo de todo el proceso, principalmente en el aislamiento y caracterización del microorganismo.

Probar la capacidad inhibitoria de extractos vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *in situ*, controlando factores ambientales como la temperatura, humedad, luminosidad, etc.

Realizar formulaciones de bioplaguicidas a partir de especies vegetales con alto potencial para controlar plagas o enfermedades en diferentes cultivos, dado que estos productos poseen gran acogida en el mercado actual.

Comparar la capacidad inhibitoria de extractos y aceites esenciales o incluso la mezcla de ambos de una misma especie, determinando la efectividad de cada uno de ellos.

BIBLIOGRAFÍA

Achour, M., Mateos, R., Ben, M., Mtiraoui, A., Bravo, L. & Saguem, S. (2018). A Comprehensive Characterisation of Rosemary tea Obtained from *Rosmarinus officinalis* L. Collected in a sub-Humid Area of Tunisia: Compounds from *Rosmarinus officinalis* tea. *Phytochemical Analysis*, 29(1), 87-100. <https://doi.org/10.1002/pca.2717>

Acosta, P. G., Riofrío, T., Rojas, J., Villanova, S., Plazas, M., & Prohens, J. (2016). Phenological growth stages of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an emerging fruit crop, according to the basic and extended BBCH scales. *Scientia Horticulturae*, 199, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.045>

Albert, L. A. (2008). Panorama de los Plaguicidas en México.

Alonzo, G. I., Letrán, H. M. & Sánchez, J. N. (2009). Actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre hongos fitopatógenos. Universidad de San Carlos Guatemala, Guatemala.

Al-Snafi, A. E. (2017). The pharmacology of *Equisetum arvense* - A review. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 07(02), 31-42. <https://doi.org/10.9790/3013-0702013142>

Arguello, J. A. M. (2011). Introducción de la finalidad extra fiscal en el Impuesto al Valor Agregado que grava a la transferencia e importación de agroquímicos, como medida fiscal para la protección del medio ambiente, la salud y la seguridad alimentaria (Tesis). Quito: USFQ, 2011.

Arif, T., Bhosale, J., Kumar, M., Mandal, T., Bendre, R., Lavekar, J. & Dabur, R. (2009). Natural products: Antifungal agents derived from plants. *11*, 7, 621-638.

Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D. & D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador, *9*(20), 11-18.

Baldino, L., Scognamiglio, M. & Reverchon, E. (2018). Extraction of rotenoids from *Derris elliptica* using supercritical CO₂: Extraction of rotenoids from *Derris elliptica* using supercritical CO₂. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.5764>

Basulto, F. S., Plaza, R. D. & Fernández, J. S. (2011). Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de Papaya Maradol, *13*.

Benbelaid, F., Abdoune, M., Khadir, A. & Benfahou, M. (2013). Drying effect on yield and antimicrobial activity of essential oils, *3*(1), 93-101.

Bessa, C., Gomes, P. S., Costa-Rodrigues, J., Almeida Palmas, R., Vieira, L., Ferraz, M. P. Fernandes, M. H. (2012). *Equisetum arvense* hydromethanolic extracts in bone tissue regeneration: in vitro osteoblastic modulation and antibacterial activity. *Cell Proliferation*, *45*(4), 386-396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00826.x>

Bolívar, K., Sanabria, M. E., Rodríguez, D., de Camacaro, M. P., Ulacio, D., Cumana L. J. & Crescente, O. (2009). Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(1), 175–181.

Cáceres, I., Colorado, R., Salas, E., Castellanos, M., N, L. & Hernández, L. (2013). Actividad Antifúngica *in vitro* de Extractos Acuáticos de Especies contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 105-112.

Calsin, H. Y. M. (2017). Actividad antimicrobiana “In vitro” del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* uropatógenos.

Camel, V. (2014). Extraction Methodologies in Plants: General Introduction. En R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 1-26). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9902>

Cannon, P., Damm, U., Jhonson, P., & Weir, B. (2012). *Colletotrichum* - current status and future directions. 73, 181-213.

Carrión, J. A. & García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica. Universidad de Cuenca, Cuenca.

Carvajal, R. L., Uribe, Y. H., Sierra, M. N. & Rueda, N. D. (2008). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia Forestal*, 12(0), 161. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2009.1.a11>

Castro, L. M. P., Saquero, M. J. & Herrera, J. D. B. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp., 13.

Cavero, S., Jaime, L., Martín, P. J., Señoráns, F. J., Reglero, G. & Ibañez, E. (2005). In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *European Food Research and Technology*, 221(3-4), 478-486. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1139-y>

CLSI. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución.

Coellar, J. F. (2009). Plan de comercialización de tomate de árbol de árbol en fruta mediante la Dirección de Desarrollo Económico Productivo y de Gestión Ambiental del Gobierno del Azuay, dirigido a la población ecuatoriana residente en España. Universidad del Azuay, Cuenca.

Colina, A. C. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.

Comas, N. R. E. (2014). Contribución a la estandarización del proceso de obtención a escala de laboratorio de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L. Universidad Nacional de Colombia.

Contreras, Camili. (2006). Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum spp.* obtenidos de frutos de Lulo (*Solanum quitoense* Lam), Tomate de árbol de árbol (*Solanum betacea* Sendt), Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss),

Mango (*Mangifera indica L*) y tallos de Mora (*Rubus glaucus Benth*) con síntomas de antracnosis. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota.

Contreras, Cármen, & Ruíz, J. D. (2012). Estudio comparativo de dos métodos de extracción para el aceite esencial presente en la cáscara de Pomelo (*Citrus maxima*). Universidad de Cartagena.

Cruz, A., Rodríguez, N. & Rodríguez, C. (2010). Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*, 8.

Damm, U., Cannon, P., Groenewald, J. & Crous, P. (2014). The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops., (79), 49-84.

Damm, U., Cannon, P., Lui, F., Barreto, R., Guantimosim, E. & Crous, P. (2013). The *Colletotrichum orbiculare* especies complex: Important pathogens of field crops and weeds, (61), 29-59.

Damm, U., Cannon, P., Woundenberg, J. & Crous, P. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. (73), 37-113.

Dean, R., Van, J., Hammod, K., Di, P., Spanu, P., Rudd, J. Foster, G. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *13*, 414-430.

Derita, M., Castelli, M. V., & Sortino, M. (2015). Método de dilución en agar (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas). Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Recuperado

de

https://www.researchgate.net/publication/281811872_Metodo_de_dilucion_en_agar

Dilas, S., Knez, Ž., Četojević-Simin, D., Tumbas, V., Škerget, M., Čanadanović-Brunet, J. & Četković, G. (2012). In vitro antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract formulations: Biological activity of rosemary extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2052-2062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03069.x>

Dua, V., Pant, C. & Sharma, V. (1996). Determination of level of HCH and DDT in oil, water and whole blood from bioenvironmental and insecticide sprayed areas of malaria control. 33, 1, 7-15.

Edwards, S. E., Rocha, I. da C., Williamson, E. M. & Heinrich, M. (2015). Rosemary: *Rosmarinus officinalis* L. En *Phytopharmacy* (pp. 328-331). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118543436.ch93>

Elgorriaga, A., Escapa, I. H., Rothwell, G. W., Tomescu, A. M. F. & Rubén, N. (2018). Origin of Equisetum : Evolution of horsetails (Equisetales) within the major euphyllophyte clade Sphenopsida. *American Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1125>

Endréu, T. (2011). Costa Rica: mayor consumidor de plaguicidas por hectárea en el mundo.

Estrada, S. P. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Chimborazo - Ecuador.

Farías, A. M., Rostagno, M. A., Coaquira, J. J. & Meireles, M. A. A. (2015). Supercritical fluid extraction of polyphenols from lees: overall extraction curve, kinetic

data and composition of the extracts. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1).
<https://doi.org/10.1186/s40643-015-0073-5>

Feicán, C. G., Encalada, C. R. & Becerril, A. E. (2016). Descripción agronómica del cultivo de tomate de árbol de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

Fonseca, C. E. A. (2016). Evaluación in vitro de la acción antimicrobiana del aceite esencial de Sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) frente a patógenos de enfermedades respiratorias (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus phyogenes* ATC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 y *Streptococcus mutans* ATCC: 25175. Universidad Politécnica Salesiana, Quito.

Gañán, L., Álvarez, E. & Castaño, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol de árbol. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.192>

García, C. & Rodríguez, G. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa, 8, 12.

Garza, R. A., Verde, M. J., Morales, M. E., Oranday, A., Rivas, C. & Núñez, M. A. (2010). Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre, 11.

Giraldo, N., Bustamante, S. L., Pinzón, Y. A. & Buitrago, G. (2016). Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)”.

<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57720>

González, S. I. R., Báez, O. L. & Zaragoza, S. E. (2016a). Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*, 7(8), 1879-1891.

González, S. I. R., Báez, O. L. & Zaragoza, S. E. (2016b). Antifungal activity of hidrodestillates and oils on *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum gloeosporioides*, 7(8), 13.

Harrigan, W. F. & McCance, M. E. (2014). Laboratory methods in microbiology.

Hernández, S. E., Martín, C. Y. & Aguilar, N. B. (2010). Estudio de la estabilidad físico-química e identificación fitoquímica de extractos etanólicos de *Trichilia hirta* (Meliaceae), 22(1), 22-26.

INEC. (2013). Módulo ambiental del uso de plaguicidas en la agricultura.

Irmak, S., Solakyildirim, K., Hesenov, A. & Erbatur, O. (2010). Study on the stability of supercritical fluid extracted rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. *Journal of Analytical Chemistry*, 65(9), 899-906. <https://doi.org/10.1134/S1061934810090030>

Jesionek, W., Móricz, A., Alberti, A., Ott, P., Kocsis, B., Horváth, G. & Choma, I. . (2015). TLC- direct bioautography as a bioassay guided method for investigation of antibacterial compounds in *Hypericum perforatum* L., 98(4), 239-247.

Jiménez, H., Álvarez, A., Mejía, J. & Ochoa, A. (2012). Caracterización molecular de accesiones de ñame (*Dioscorea alata* L.) de la región caribe colombiana. 15, 2, 323-330.

Khakestani, M., Jafari, S. H., Zahedi, P., Bagheri, R. & Hajiaghaee, R. (2017). Physical, morphological, and biological studies on PLA/nHA composite nanofibrous webs containing *Equisetum arvense* herbal extract for bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(39), 45343. <https://doi.org/10.1002/app.45343>

Kukric, Z., Topalić, L., Pavičić, S., Žabić, M., Matoš, S. & Davidović, A. (2013). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. Recuperado 5 de Octubre de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/267030539_Total_phenolic_content_antioxidant_and_antimicrobial_activity_of_Equisetum_arvense_L

Landero, M., Lara, F., Andrade, P., Aguilar, L. & Aguado, R. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp., 7, 1189-1198.

López, L. M. T. (2002). Formas de administración más habituales de plantas medicinales, 21(2), 122-125.

Maita, S. (2011). Manejo del «Ojo de Pollo» o Antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en el cultivo de tomate de árbol de árbol (*Solanum betaceum* Cav). Universidad Católica de Ecuador, Cuenca - Ecuador.

Martínez, J. A. (2017). Evaluación del efecto bactericida del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) *in vitro* en cepa certificada de *Escherichia coli*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato.

Mateu, I., Aguilera, A., Boisset, F., Currás, R., Guara, M., Laguna, E., Pedrola, J. (2013). Geographical patterns of genetic variation in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in

the Mediterranean basin: Geographical Variation in *Rosmarinus*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(4), 700-712. <https://doi.org/10.1111/boj.12017>

Moreno, P., Gamboa, M., Heredia, G., Canto, B., Rodríguez, C., Medina, I. & Peraza, L. (2016). Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos de micromicetos tropicales contra fitopatógenos, 85, 7-14.

Narváez, J. M., Morillo, C. J., Chamorro, B. L. & Mora, D. (2015). Los plaguicidas y la afección a la salud de los agricultores de la Parroquia de Urbina-Carchi. Congreso Científico Internacional UNIANDES, Tulcan- Ecuador.

Ochoa, Y. M., Cerna, E., Landeros, J., Hernández, S. & Delgado, J. C. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium spp.* *Phyton* (Buenos Aires), 81(1), 69–73.

Ojeda, I. M. (2016). Análisis de oportunidades de negocio para el tomate de árbol de árbol del cantón Patate, con miras de exportación. Universidad Católica de Ecuador, Ambato.

Orozco, M. A. (2013). Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de Molle (*Schinus molle*), Cola de Caballo (*Equisetum arvense L.*), Linaza (*Linum usitatissimum L.*) en ratones (*Mus musculus*). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.

Orozco, M. S. (2006). Patogenicidad, variabilidad morfológica, y genética de *Colletotrichum acutatum Simmonds* de cítricos en México. Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México.

Pannek, J., Gach, J., Boratyński, F. & Olejniczak, T. (2018). Antimicrobial activity of extracts and phthalides occurring in Apiaceae plants: Antimicrobial activity of phthalides. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.6098>

Pérez, E. Y. & Maila, M. V. (s. f.). El cultivo de tomate de árbol de árbol.

Pérez, L. M., Saquero, M. J., & Beltrán, J. D. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de biotecnología*, (1).

Pomagualli, F. Y. (2018). Actividad antimicrobiana del extracto alcohólico y aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “Romero” frente a la cepa *Pseudomona aeruginosa*. Universidad Regional Autónoma de los Andes, Ambato.

Proaño, J. P. (2013). Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de Romero (*Rosmarinus officinalis*), Matico (*Piper aduncum*) y Cola de Caballo (*Equisetum arvense*) en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba - Ecuador.

Pumaylle, K. O., Quiroz, L. R. P., Luján, D. L. B. & Paz, R. J. S. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*, 12.

Ramírez, G. J. G., Gil, A. A. & Morales, O. J. G. (2017). Etiology of tree tomato (*Solanum betaceum* CAV) diseases. *Revista de Protección Vegetativa*, 32(1), 33-51.

Ramírez, H. E., Virgen, G., Vargas, J. D. J., Salcedo, E. & Barrientos-Ramírez, L. (2018). Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hoja de *Guazuma ulmifolia* Lam.

contra fitopatógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(27), 114-124.
<https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i27.285>

Ramirez, L. S. & Marín, D. (2009). Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin, 42.

Reis, J. C. R., Lampeira, I. M. S., Santos, Â. F. S., Moita, M. L. C. J. & Douh ret, G. (2010). Refractive Index of Liquid Mixtures: Theory and Experiment. *ChemPhysChem*, 11(17), 3722-3733. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000566>

Revelo, M. J. A., Pérez, A. Y. E. & Maila,  . M. V. (2016). El Cultivo de tomate de árbol de  rbol, 45, 56-89.

R vloba, M., Gams, W. & Seifert, K. (2011). Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. 68, 163-191.

Robles, G. M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez, L. M., Rodríguez, F. F., Morales, J. A., Guerrero, M. P. J., Del Toro, S., C. L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER), 18(3), 3-8.

Rodríguez, Asela, M., Suárez, S. & Estrada, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.

Rodríguez,  . S., Cárdenas, E., Hernández, S., Gutiérrez, A. & Mayek, N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(3), 898-905.
<https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000300029>

Rodríguez, González, G. M., Verde, M. J., Morales, M. E., Rivas, C., Oranday, A., Treviño, J. F. (2011). Bioprospección de la actividad antimicótica de extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Retusus ariuscarpus*, 13.

Rodríguez, Zarate, A. G. & Sánchez, L. C. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*, 15(27), 119. <https://doi.org/10.22490/24629448.1963>

Rojo, B. I., Álvarez, R. B., García, R. S., León, F. J., Sañudo, B. A. & Allende, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1703-9>

Rozwalka, L. C., Lima, M. L. R. Z. D. C., Mio, L. L. M. de, & Nakashima, T. (2008). Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. *Ciência Rural*, 38(2), 301-307. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000200001>

Ruiz, Chan, W., Gutiérrez, A. P., Cristóbal, J., Tun, J. M. & Munguía, R. (2011). Crecimiento, esporulación y germinación *in vitro* de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*, 4.

Ruiz, J. R. (2013). Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.

Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A. & Gómez, L. (2012). Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp. aislado de banano (*Musa* spp.) de altura en la zona de Turrialba

y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *AGRONOMÍA COSTARRICENSE*, 16.

Sánchez, L. G., Vargas, R. A. & Jiménez, P. (2015). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de dos morfotipos de *Raphanus raphanistrum* L. sobre tres hongos fitopatógenos. *I*, 27, 3-10.

Santacruz, D. C. (2013). Caracterización morfológica, patogénica, y molecular de especies de *Colletotrichum spp.* causantes de la antracnosis del fruto del ají y pimentón *Capsicum spp.* en el valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Silva, A. C. da, Sales, N. de L. P., Araújo, A. V. & Caldeira, C. F. (2009). Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(spe), 1853-1860. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542009000700026>

Silva, P. A., Oliveira, D. F., Carvalho, D. A. & de Carvalho, G. A. (2008). Evaluation of the antifungal activity by plant extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. *Ciênc. Agrotec.* 32(2), 9.

Sim, Y. & Shin, S. (2014). Antibacterial activities of the essential oil from the leaves and rhizomes of *Cnidium officinale* Makino. 26(6), 452-457.

Sotelo, R. H. (2016). Estado del arte en el uso potencial de extractos vegetales del género *Piper* para el control de plagas agrícolas. ECAPMA - Universidad nacional abierta y a distancia, Colombia.

Suárez, M., Bautista, I., Rivera, A., Medina, J. de la C., Guerrero, O. & González, O. (2013). Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de Papaya CV. Maradol (*Carica papaya* L.), *14*(2), 115-124.

Taborda, L. A. (2013). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Colletotrichum musae* en banano y *Botrytis cinerea* en fresa. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Tandazo, Y. J. V., Ruiz, G. X., Rojas, J. R., Capa, M. E. D., Prohens, J., Alejandro, J. D. & Acosta, P. G. (2017). The impact of an extreme climatic disturbance and different fertilization treatments on plant development, phenology, and yield of two cultivar groups of *Solanum betaceum* Cav. *PLOS ONE*, *12*(12), e0190316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190316>

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Saraiva, J. & Nunes, N. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *43*(1), 587-595.

Tirado, D. F., Montero, P. M. & Acevedo, D. (2015). Estudio Comparativo de Métodos Empleados para la Determinación de Humedad de Varias Matrices Alimentarias. *Información tecnológica*, *26*(2), 03-10. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200002>

Torres, C., Tapia, R., Higuera, I., Martin, M. R., Nextipacan, G. A. & Pérez, B. D. (2015). Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. *99*, 1590-1595.

Tounekti, T., Vadel, A. M., Ennajeh, M., Khemira, H. & Munné, S. (2011). Ionic interactions and salinity affect monoterpene and phenolic diterpene composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(3), 504-514. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000213>

Trinidad, E., Ascencio, F. de J., José, U., Ramírez, J. C., Ragazzo, J. A., Calderón, M. & Bautista, P. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México, 12.

Udayanga, D., Manamgoda, D., Lui, X., Chukeatirote, E. & Hyde, K. (2013). What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits, 61, 165-179?

Valarezo, O. & Muñoz, J. (2012). Insecticidas de uso agrícola en el Ecuador.

Valenzuela, N. L., Ángel, D. N., Ortiz, D. T., Rosas, A., Santos, M. O. & García, O. (2014). Potencial antifúngico de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(1), 047–062.

Villacís, L. A., León, O., Santana, R., Mangui, J., Carranza, G. & Pazmiño, P. (2017). Actividad anti fúngica (in vitro) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(1), 59–64.

Wedge, D. ., Klun, J. A., Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Baser, K. H. C. & Zhang, J. (2009). Bioactivity guided fractionation and GC/MS fingerprinting of *Angelica sinensis* and *Angelica archangelica* root components for antifungal and mosquito deterrent activity. 57(2), 464-470.

Yang, T., Di, W., Qing, A. & Da, W. (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: modeling, optimization and stability of extracts during storage. *21*, 706-715.

Zermane, A., Meniai, A.-H. & Barth, D. (2010). Supercritical CO₂: Extraction of Essential Oil from Algerian Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Chemical Engineering & Technology*, *33*(3), 489-498. <https://doi.org/10.1002/ceat.200900381>