

**UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA**



**CENTRO DE POSTGRADOS  
MAESTRÍA EN AGRONOMÍA  
MENCIÓN SISTEMAS AGROPECUARIOS**

**TÍTULO A OBTENER: MAGISTER EN AGRONOMÍA**

**Proyecto de Innovación**

**Efecto del extracto acuoso de hojas de *Tectona grandis* L. sobre el crecimiento de los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger***

**AUTOR: Frumencio Stalin Jaramillo Cando**

**DIRECTOR: Dr. Luis Ramón Bravo Sánchez, PhD**

**CO-DIRECTORA: Ing. Sandra Luisa Soria Re, MSc**

**Puyo- Ecuador**

**2019**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, Frumencio Stalin Jaramillo Cando, con cédula de identidad 1600514606, declaro ante las autoridades de la Universidad Estatal Amazónica que el contenido de este proyecto de innovación titulado: Efecto de los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. sobre los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*, es absolutamente original, auténtico y personal.

En tal virtud y según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente, certifico libremente que los criterios y opiniones que constan en el Proyecto de Innovación son de exclusiva responsabilidad del autor, y que los resultados expuestos pertenecen a la Universidad Estatal Amazónica.

---

Frumencio Stalin Jaramillo Cando

C.I.: 1600514606

AUTOR

## **CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL**

### **EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN DEL PROYECTO DE INNOVACIÓN CERTIFICA QUE:**

El presente trabajo: Efecto de los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. sobre los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*, bajo la responsabilidad del egresado Ing. Frumencio Stalin Jaramillo Cando, ha sido meticulosamente revisada, autorizando su presentación.

### **MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

.....  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

## AGRADECIMIENTOS

*El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.*

*A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido un orgullo y el privilegio de ser su hijos, son los mejores padres.*

*A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañandonos y por el apoyo moral, que nos brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.*

*A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.*

## DEDICATORIA

*A Dios.*

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*A mi madre OLGA CANDO*

*Por ser la persona incondicional, que sin esperar nada siempre estuvo a mi lado, el pilar fundamental en mi vida, cuando la gente hablaba que no llegaría a cumplir mis metas, ella estuvo siempre apoyándome, creyendo en mí, pero sobre todo por darme siempre su amor .*

*A mi padre PEDRO JARAMILLO*

*Por su ejemplo de perseverancia, enseñarme lo que está bien y lo que está mal , guiarme en un camino lleno de espinos , creer en mí , su carácter fuerte me enseñó que en todo momento podemos encontrar una salida , que realizando las cosas correctamente siempre los resultados aunque demorados van a ser positivos .*

*A mi hija y esposa*

*Este logro también es de ustedes, ya que ahora son las personas más importantes de mi vida, la batería que me impulsa para ser mejor día a día, aunque existan malos momentos, comprendí que siempre van a estar junto a mí.*

*A mis hermanos*

*Los momentos memorables, divertidos, de tristeza, de amor siempre ustedes están presentes, este logro es gracias a sus ejemplos a su paciencia, me enseñaron que estar juntos es lo que nos hace más fuertes, no sé qué fuese de mi vida sin ustedes.*

*A mi familia*

*La vida con ustedes es más fácil, gracias al team JARAMILLO la familia que cualquier persona quisiera tener, mi otra familia CARRILLO-CHIRIBOGA que me abrieron sus puertas me hicieron un integrante más y me permitieron compartir con ustedes tantas alegrías.*

*A mi tutor y amigo*

*Al doctor Luis Bravo, que me enseñó que un amigo puede llegar a ser una familia.*

## RESUMEN EJECUTIVO

La búsqueda de alternativas ecológicas para el control de hongos fitopatógenos que pueden inhibir la germinación de semillas de interés agrícola o afectar los productos en postcosecha ha tenido un importante auge en los últimos tiempos. Recientemente se han venido probando extractos acuosos ricos en compuestos polifenólicos y las hojas de la especie forestal *Tectona grandis* se ha descrito como una importante fuente de dichos metabolitos secundarios. En esta investigación, la extracción asistida por ultrasonidos empleada para la extracción de compuestos polifenólicos con potencial actividad antifúngica resultó eficaz para la obtención de los extractos acuosos de *Tectona grandis* L.; se obtuvieron rendimientos sobre la base de los sólidos extraíbles de 22,4 %, concordantes con estudios recientes. Se determinó el contenido de polifenoles en los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. a través de la técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu, fue de 2,92 %. Si se tiene en cuenta que la mayor parte de estos compuestos son taninos y favonoides, estos extractos pueden emplearse potencialmente como antifúngicos. Los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. fueron probados en el control de *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*. La actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. resultó adecuada para el control de *Aspergillus niger*, principalmente a la concentración de 3 µL/mL, no fue así el caso de *Rhizopus stolonifer*, para el cual no se observó control en el intervalo de concentraciones evaluados.

## ABSTRACT

The search for ecological alternatives for the control of phytopathogenic fungi that can inhibit the germination of seeds of agricultural interest or affect the products in postharvest has had an important boom in recent times. Recently, aqueous extracts rich in polyphenolic compounds have been tested and the leaves of the forest species *Tectona grandis* have been described as an important source of such a kind of secondary metabolites. In this research, the ultrasound-assisted extraction used for the separation of polyphenolic compounds with potential antifungal activity was effective for obtaining the aqueous extracts of *Tectona grandis* L.; yields of 22.4%, were obtained on the basis of extractable solids, this is concordant with recent studies. The content of polyphenols in the aqueous extracts of *Tectona grandis* L. was determined through the spectrophotometric technique of Folin-Ciocalteu, it was 2.92%. Taking into account that most of these compounds are tannins and flavonoids, these extracts can potentially be used as antifungal agents. The aqueous extracts of *Tectona grandis* L. were tested in the control of *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. The antifungal activity of the aqueous extracts of *Tectona grandis* L. was adequate for the control of *Aspergillus niger*, mainly at the concentration of 3  $\mu\text{L} / \text{mL}$ , this was not the case of *Rhizopus stolonifer*, for which no control was observed in the interval of concentrations evaluated.

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. PROBLEMA .....	2
I.2. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN .....	2
I.3. OBJETIVOS .....	2
I.3.1. OBJETIVO GENERAL .....	2
I.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
II.1. ALELOPATÍA.....	4
II.1.1 - SISTEMAS ALELOPÁTICOS.....	4
II.1.2. NATURALEZA QUÍMICA DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS .....	5
II.1.3. ALELOPATÍA SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS.....	6
II.2. DESCRIPCIÓN DE <i>Tectona grandis</i> L.....	7
II.3. CARACTERÍSTICAS DE <i>Aspergillus niger</i> Y <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	7
II.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	8
II.5. ANÁLISIS DE POLIFENOLES (TANINOS Y FLAVONOIDES).....	9
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
III.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	10
III.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	10
III.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN .....	10
III.4. PROCEDIMIENTO.....	10
III.4.1. EXTRACCIÓN ACUOSA DE POLIFENOLES DE <i>Tectona grandis</i> L. ....	10
III.4.2. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE <i>Tectona grandis</i> L. ....	11
III.4.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE <i>T. grandis</i> L. SOBRE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS <i>R. stolonifer</i> Y <i>A. Niger</i> .....	11



III.4.4. EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS E INSTRUMENTOS .....	12
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
IV.1. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN ACUOSA ASISTIDA POR ULTRASONIDOS DE POLIFENOLES DE <i>Tectona grandis</i> L.....	14
IV.2. ANÁLISIS DE POLIFENOLES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE <i>Tectona grandis</i> L. ....	14
IV.3. EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE <i>Tectona grandis</i> L. SOBRE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS <i>R. stolonifer</i> Y <i>A. niger</i> . ....	15
CONCLUSIONES .....	22
RECOMENDACIONES .....	23
BIBLIOGRAFÍA .....	24
ANEXOS.....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de polifenoles totales en los extractos acuosos de <i>T. grandis</i> , expresados en porcentaje respecto a la masa de sólidos pulverulentos.....	14
Tabla 2. Diámetros de crecimiento promedio obtenidos de <i>A. niger</i> y <i>R. stolonifer</i> para el extracto acuoso de <i>T. grandis</i> y el testigo (concentración = 0) durante los cinco días de experimentación. ....	15
Tabla 3. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado. ....	18
Tabla 4. Importancia de la concentración del extracto acuoso de <i>T. grandis</i> sobre el diámetro de crecimiento de <i>A. niger</i> .....	19
Tabla 5. Soluciones para tres combinaciones de los niveles categóricos de concentración de extracto y diámetro de crecimiento. ....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráficos de tendencias del crecimiento de ambos hongos con la concentración del extracto acuoso de <i>T. grandis</i> , para cada día de medición.....	16
Figura 2. Índice de Respuesta Alelopática (IRA) vs. concentración del extracto acuoso de <i>T. grandis</i> para <i>A. niger</i> . .....	16
Figura 3. Índice de Respuesta Alelopática (IRA) en función del tiempo (días) del extracto acuoso de <i>T. grandis</i> para <i>A. niger</i> . .....	17
Figura 4. Efectos estandarizados positivos y negativos de la concentración del extracto acuoso de <i>T. grandis</i> sobre el diámetro medio del hongo <i>A. niger</i> . .....	19
Figura 5. Representación gráfica de la significación de la concentración en concentración del extracto acuoso de <i>T. grandis</i> sobre el diámetro de crecimiento de <i>A. niger</i> . .....	20

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales se han convertido en el centro de atención de especialistas de todas las ramas, incluida la agricultura. La búsqueda de alternativas ecológicas para garantizar el desarrollo agrario se ha convertido en una opción viable y constituye una alternativa para los productores.

El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos significativos en la producción; no obstante, sus efectos nocivos han impactado de manera significativa en la sostenibilidad de la agricultura y en el deterioro de los suelos y las aguas.

La práctica del monocultivo y el uso indiscriminado de productos químicos han reducido la biodiversidad en los agroecosistemas, y ha ocasionado, entre otros efectos indeseados, una mayor incidencia de plagas y enfermedades. Es por eso que, desde hace varios años ha surgido el interés por el control ecológico (Zavaleta, 2000).

Existe un número significativo de plantas que producen una gran diversidad de metabolitos secundarios (agentes alelopáticos) que contribuyen a su defensa natural, pues les permite actuar como controladores de patógenos y plagas.

Ese potencial alelopático se puede explotar al rotar los cultivos, asociarlos con otros, o al incorporar residuos vegetales o extractos a partir de sus tejidos al suelo (Leicach, 2005; Coq-Huelva, 2017).

En la actualidad resulta imprescindible desarrollar alternativas que conduzcan hacia la reducción y sustitución paulatina del uso de agroquímicos, dirigida a la implementación de una agricultura orgánica que utilice las fuerzas de la naturaleza y con ello se recupere el equilibrio natural en la biota del suelo.

Uno de los problemas críticos desde el punto de vista sanitario, presente a nivel mundial, es el control de hongos fitopatógenos que atacan a las plantas cultivadas, tanto durante su germinación y desarrollo como en la postcosecha (Borras *et al.*, 1997). Se destacan, entre las especies más importantes, *Rhizoctonia solanis*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*, los que pueden ocasionar grandes pérdidas en cultivos y cosechas (Herrera, 2004).

Las enfermedades producidas por estos hongos constituyen una causa importante de los bajos rendimientos en los cultivos, principalmente leguminosas (Díaz-Castellanos, 2011) por lo que se hace necesario incluir alternativas que reduzcan las pérdidas y contribuyan a la sostenibilidad de las producciones agrícolas.

La actividad antifúngica de extractos de plantas usadas sobre diversos hongos como *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*, ha sido ampliamente estudiada (Velázquez-del Valle *et al.*, 2008; Quiroga *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005). Algunos de los productos antifúngicos utilizados actualmente (Girois *et al.*, 2005), son poco efectivos e inducen frecuentemente a resistencia microbiana (Zhang, *et al.*, 2005).

En trabajos recientes se ha dado a conocer el efecto alelopático de extractos acuosos de *Tectona grandis* L. (teca), árbol que crece abundantemente en varias regiones del Ecuador, sobre todo en la costa y en la Amazonía baja, sobre hongos fitopatógenos que inhiben la germinación de plantas cultivables como el pepino (*Cucumis sativus* L.), ají (*Capsicum annum* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), en condiciones controladas de laboratorio (Espejo, 2010) o colonizan la superficie de los productos agrícolas provocando la enfermedad conocida como pudrición blanda que ocasiona importantes pérdidas económicas en postcosecha (Velázquez-del Valle, *et al.*, 2008).

La utilización de residuos vegetales y extractos de plantas con propiedades antifúngicas, como herramienta de manejo integrado, puede tener un uso muy práctico para eliminar los agentes fúngicos que afectan las plantas cultivadas.

## **I.1. PROBLEMA**

Los extractos acuosos de las hojas de la especie forestal *Tectona grandis* L. (Teca), pueden ser fuente de sustancias que reducen el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, pero se desconoce el efecto de las especies nativas amazónicas sobre los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger*.

## **I.2. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN**

Los extractos acuosos de las hojas de *T. grandis* presentan metabolitos secundarios como taninos y flavonoides que pueden impedir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *R. stolonifer* y *A. niger*.

## **I.3. OBJETIVOS**

### **I.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antifúngico del extracto acuoso de las hojas de *T. grandis* sobre los hongos *R. stolonifer* y *A. niger*.

### **I.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el rendimiento de la extracción acuosa asistida por ultrasonidos a partir de las hojas adultas de *T. grandis* sobre la base del peso seco del material vegetal.
- Determinar el contenido de polifenoles totales en el extracto acuoso de hojas de *T. grandis* con potenciales propiedades antifúngicas.
- Evaluar el efecto antifúngico del extracto acuoso de *T. grandis*, sobre el crecimiento de *R. stolonifer* y *A. niger*.

## **CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1. ALELOPATÍA**

La alelopatía se refiere a los efectos beneficiosos o perjudiciales de compuestos químicos que, liberados por una planta, ejercen su acción sobre otro organismo vivo (Sampietro, 2002). Este concepto ha sido enriquecido a través de investigaciones y observaciones de numerosos científicos hasta extenderlo a microorganismos como hongos, bacterias y virus (González *et al.*, 2017).

El estudio de este fenómeno ha sido importante para la agricultura. Numerosas investigaciones han demostrado que las prácticas alelopáticas pueden ser la base de la sustentabilidad y sostenibilidad del sistema agrario. Este fenómeno abarca todas las ramas de la protección de las plantas cultivadas, dado el carácter plaguicida de muchos de estos compuestos.

Los estudios acerca de los procesos alelopáticos han permitido encontrar los posibles agentes capaces de ejercer los efectos observados. Muchas de sus estructuras químicas han sido esclarecidas por diferentes métodos. De esta manera se ha podido entender realmente cómo ocurren las diversas reacciones que desencadenan finalmente un efecto fisiológico sobre plantas o microorganismos.

#### **II.1.1 - SISTEMAS ALELOPÁTICOS**

En todo fenómeno alelopático existe una planta donadora que libera al ambiente, por una determinada vía (lixiviación, volatilización, descomposición de residuos, etc.), compuestos químicos provenientes de su metabolismo secundario. Estas sustancias que intervienen en el proceso se denominan compuestos o agentes alelopáticos (Sampietro 2002).

El conjunto de sustancias liberadas por la planta donadora en su ambiente natural es generalmente una mezcla de compuestos osmóticamente activos como azúcares, sales, aminoácidos, proteínas, flavonoides, taninos y ligninas, los cuales son almacenados en estructuras vacuolares dentro del citoplasma. Debido a un estrés o por acción enzimática, los mismos pueden ser expulsados al medio a través de glándulas especiales ubicadas en las hojas y los tallos (Narwal, 2012; Elzaawely, 2005).

En ocasiones, al ocurrir un estrés, las plantas donadoras de aleloquímicos pueden producir más sustancias de este tipo; además, ocurren cambios en el metabolismo secundario que provocan una mayor toxicidad de estos; por otra parte, los organismos receptores se vuelven más susceptibles a estas (Reigosa *et al.*, 2006).

La acción de los aleloquímicos es múltiple, va desde la inhibición o la estimulación de los procesos de crecimiento de las plantas vecinas, hasta la supresión de la germinación de las semillas o bien a evitar la labor de los insectos defoliadores, así como el efecto dañino de bacterias, hongos y virus (Sefidkon *et al.*, 2004; Lorenzo, & González, 2010).

En las plantas, las raíces y rizomas poseen menor cantidad de aleloquímicos que las hojas, pero en algunos casos como en *Artemisa absinthium* (Ajenjo) puede ocurrir lo contrario (Nelson, 2004). Otras plantas como *Sorghum bicolor* L., (sorgo) o *Glicine max* L. (soya) producen exudados radiculares de gran toxicidad para plantas vecinas, bacterias y hongos del suelo (López & Isabel, 2016; González & Pérez, 2017).

Los tallos contienen gran cantidad de aleloquímicos sobre todo en las zonas verdes, como la Amazonía, y en muchas ocasiones son grandes fuentes de agrotóxicos. En las especies forestales su acción está encaminada, fundamentalmente, a contrarrestar el ataque de insectos barrenadores.

Se conoce que muchos frutos contienen toxinas que inhiben el crecimiento de microorganismos, por ejemplo, los frutos de plantas del género *Terminalia* contienen gran cantidad de taninos que al caer al suelo se liberan ejercen un control natural de varios tipos de hongos.

Finalmente, las hojas son la mayor fuente de aleloquímicos, en ellas se lleva a cabo gran parte del metabolismo vegetal del cual son producto estos compuestos; es, fundamentalmente, en las hojas donde se encuentran las vacuolas que almacenan estas sustancias (Narwal, 2012).

## **II.1.2. NATURALEZA QUÍMICA DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS**

Las células vegetales son capaces de producir millones de moléculas diferentes, divididas en grupos según su función en:

**Metabolitos Primarios:** Moléculas implicadas en la estructura y función de la célula, como glúcidos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos.

**Metabolitos Secundarios:** Compuestos derivados de rutas secundarias más complejas del metabolismo celular. Se sintetizan a partir de moléculas intermediarias o “bisagras” como el acetato, mevalonato o shikimatos, entre otros (Guerriero *et al.*, 2018).

La forma más común de extracción y separación de metabolitos es el empleo de disolventes adecuados y el empleo de métodos convencionales como decocción, percolación y



maceración, o métodos modernos como la extracción asistida por ultrasonidos (Cerón *et al.*, 2009; Mariscal *et al.*, 2015; Villacís *et al.*, 2017; Lozano-Grande, 2018).

Entre los numerosos tipos de metabolitos secundarios con acción alelopática están los terpenoides, que han sido identificados y ampliamente estudiados por su potencial alelopático contra malezas de plantas de cultivo, insectos y hongos. Los más frecuentes son: alcanfor,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno y 1,8-cineol. Dentro de las plantas que los producen se encuentran las de los géneros *Salvia*, *Amaranthus*, *Eucalyptus*, *Artemisia*, y *Pinus* (Pichersky & Raguso, 2018).

La mayor cantidad de agentes alelopáticos son compuestos aromáticos, que incluyen quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos (Rivero *et al.*, 2018).

Específicamente, para los flavonoides y taninos se han descrito propiedades antimicrobianas (Shivanna & Mallikarjunaswamy, 2009). Estos se pueden clasificar en hidrolizables y condensados. Los mecanismos de acción de estos compuestos están relacionados con la oxidación de enzimas, la posible reacción con los grupos –SH e inactivación de proteínas a nivel de membrana, propiedad llamada astringencia. Los taninos hidrolizables como los ácidos: gálico, elágico, trigálico, tetragálico y quebúlico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y la mayoría de ellos están presentes en los suelos de bosques en concentraciones suficientes para inhibir organismos nitrificantes, y hongos fitopatógenos (Isaza, 2007).

### **II.1.3. ALELOPATÍA SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS**

Una de las plantas más conocidas a nivel mundial con efectos alelopáticos es *Azadirachta indica* A Juss (Neem); el aceite clarificado de este árbol actúa sobre hongos fitopatógenos del suelo como *Fusarium spp*, *Rhizoctonia spp* y *Sclerotium spp* (Chaudhary *et al.*, 2017).

Los aceites esenciales son sustancias de baja polaridad que han resultado ser promisorias para el control de enfermedades. Por su poca solubilidad en agua pueden estar mayor cantidad de tiempo en contacto con los microorganismos. Tal es el caso del aceite esencial de *Anethum graveolens* L. (eneldo), el cual es capaz de inhibir el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii* y *Macrophomina phaseolina*, incluso mejor que algunos fungicidas sintéticos (Kaur, 2010). Otras sustancias de esta naturaleza contenidas en semillas como el caso de *Swietenia humilis* inhiben el crecimiento de hongos productores de “damping off.” Además, pueden ser extraídos y aplicados al suelo para controlar microorganismos específicos como *Rhizopus stolonifer* (Angulo-Escalante *et al.*, 2009).

A través de los tiempos se han obtenido gran cantidad de extractos acuosos de plantas con actividad antifúngica, por ejemplo, el extracto de *Allium sativum* L. (ajo) ha tenido efecto inhibitorio sobre *Penicillium italicum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium spp*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium spp*. La planta *Coriandrum sativum* L. (cilantro), que comúnmente se utiliza en la cocina posee efecto inhibitorio sobre hongos fitopatógenos como *Fusarium spp*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Stompor, 2003).

Existen numerosas especies forestales capaces de inhibir el crecimiento de diferentes tipos de hongos, *Tectona grandis* (teca) por ejemplo, es una planta oriunda del Asia, está distribuida ampliamente en la región costa y en la Amazonía baja del Ecuador. El extracto acuoso de las hojas de esta planta posee un importante efecto contra hongos fitopatógenos del suelo como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, por otro lado, puede estimular el crecimiento de antagonistas de hongos fitopatógenos del suelo como *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* (Espinosa, 2007).

## **II.2. DESCRIPCIÓN DE *Tectona grandis* L.**

Nombre científico: *Tectona grandis* L.

Familia: *Lamiaceae*.

*T. grandis* es un árbol caducifolio de gran tamaño con una copa redondeada. Las hojas son elípticas u ovoides, de longitud de 30 a 60 cm. Crece en bosques frondosos húmedos y secos por debajo, con precipitaciones anuales entre 1250 y 3750 mm y una temperatura mínima de 13 a 17 °C y máxima de 39 a 43 °C (Blanco-Florez *et al.*, 2014).

La composición química de diferentes extractos, entre ellos el extracto acuoso de hojas de *T. grandis*, se ha descrito en años recientes. En los extractos acuosos se detectó la presencia de esteroides, saponinas, cumarinas, alcaloides, proteínas, aminoácidos, chalconas, diterpenos, flavonoides, taninos y fenoles, entre otros (Godghate, A. G., & Sawant, R. S., 2014).

## **II.3. CARACTERÍSTICAS DE *Aspergillus niger* Y *Rhizopus stolonifer*** ***Aspergillus niger***

*A. niger* se encuentra en el grupo de los aspergilos negros, el cual se clasifica dentro de la familia moniliaceae, orden moniliales, clase hyphomicetes, filum deuteromycota. Es importante conocer las características del grupo de *A. niger* para su identificación, las cuales son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas.

Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas. Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o dos series dependiendo de las especies, con frecuencia, profundamente coloreadas. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos, o con estriaciones longitudinales marcadas. Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café (Vega, Valdez & Rendón, 2000).

### ***Rhizopus stolonifer***

*Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, es considerado uno de los principales fitopatógenos que provocan enfermedades postcosecha, es el agente causal de la pudrición blanda de frutas y hortalizas ocasionando importantes pérdidas económicas. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza sobreviviendo de manera saprófita en el suelo y en residuos orgánicos con el potencial de invadir tejidos vegetales. Entre sus características particulares, se encuentran la formación de micelio aéreo carente de septos y la producción de esporangióforos que presentan en sus puntas esporangios esféricos donde se alojan las esporangiosporas, las cuales muestran diferentes formas: globosas, elipsoidales y angulares con superficies lisas o estrías distintivas (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006). Las esporas de *R. stolonifer* pueden sobrevivir largos períodos sin agua y soportar temperaturas elevadas, germinando sobre tejidos vegetales dañados y generando rápidamente la maceración de los tejidos y la pudrición de los frutos (Adaskaveg *et al.*, 2002). El control de las pudriciones postcosecha ocasionadas por *R. stolonifer* ha sido objeto de estudio durante varios años, empleándose desde compuestos químicos hasta métodos alternativos naturales que incluyen el uso de compuestos inocuos. Las tendencias actuales involucran el empleo de productos vegetales, antagonistas microbianos y quitosano, solas o combinadas entre sí para potenciar su efecto (Bautista-Baños *et al.*, 2006).

## **II.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

Se han utilizado diversos métodos para evaluar la actividad antifúngica y antimicrobiana de sustancias sintéticas (Rojas *et al.*, 2005). Estos métodos se aplican mucho en el ámbito hospitalario como el caso del método de difusión de discos (Phillips, 1998; PA, 1997), el método de pozos en agar (Frobisher, 1974) y el método de dilución en tubos (turbidimétrico) (Wilcke, 1999), para hallar no solo la potencia sino también la

resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos. También se ha empleado el método radial en placas (Vizcaíno, *et al.*, 2007) y la técnica de dilución en agar, a través de la cual se determina el porcentaje de inhibición del crecimiento del microorganismo por cada compuesto. También se ha utilizado el método de difusión en gel-perforación en placa (García, *et al.*, 2002).

## **II.5. ANÁLISIS DE POLIFENOLES (TANINOS Y FLAVONOIDES)**

Para determinar los metabolitos como taninos y flavonoides se emplean, en el campo de estudio, diferentes métodos como: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y espectrofotometría UV/Vis (Kostennikova, 1983; Gutiérrez, *et al.*, 2000; De la Rosa, *et al.*, 2012;). Para determinar flavonoides en las hojas de *P. guajava* se han estudiado diferentes técnicas de análisis como: cromatografía en capa fina (CCF), de gases (CG) y de líquidos de alta eficacia (HPLC), así como la espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis), la cual ha sido una de las que más ampliamente se ha utilizado por su sencillez y su bajo costo (Kostennikova, 1997; Gutiérrez, 2003; Fernández, *et al.*, 2016).

La medida más común del contenido de fenoles totales se realiza utilizando el método de Folin–Ciocalteu, que determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo(VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro (Singleton, 1999).

## **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El proyecto fue ejecutado en las instalaciones de la Universidad Estatal Amazónica con material vegetal (hojas de Teca) recolectado en la Amazonía baja del Ecuador, provincia de Francisco de Orellana. El mismo tuvo una duración de seis meses a partir de enero de 2019.

### **III.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El presente proyecto corresponde a una investigación de tipo aplicada, fundamentada en la experimentación.

### **III.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN**

Se empleó un método de extracción de polifenoles asistida por ultrasonidos, un método cuantitativo de análisis espectrofotométrico para la evaluación de los polifenoles y una metodología conocida para la valoración de la actividad antifúngica in vitro. Se realizaron cálculos numéricos y análisis estadísticos para establecer modelos de comportamiento.

### **III.4. PROCEDIMIENTO**

#### **III.4.1. EXTRACCIÓN ACUOSA DE POLIFENOLES DE *Tectona grandis* L.**

Se lavó el material foliar con agua corriente y agua destilada; se realizó el secado en estufa a 60°C por 24 horas. Se pulverizaron las hojas secas en molino de cuchillas con una abertura de malla de 1mm.

Se utilizó la extracción asistida por ultrasonidos dada su mayor eficacia y menor tiempo de operación, para ello se pesaron 5 g de los sólidos pulverulentos de *T. grandis*, se situaron en balones de vidrio de capacidad 250 mL y se pusieron en contacto con 100 mL de agua destilada.

Se extrajo en baño ultrasónico a 30 °C, durante 30 minutos, a máxima potencia (Espinosa, 2007). Luego, se realizó la filtración a vacío de los extractos acuosos y se llevó a sequedad en evaporador rotatorio.

Finalmente se calculó el rendimiento para los extractos acuosos a partir del peso seco de la planta. Para este procedimiento se realizaron tres réplicas.

### **III.4.2. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Tectona grandis* L.**

Se determinó el contenido total de compuestos polifenólicos, dentro de los que se encuentran los taninos y flavonoides, a los que se atribuye el poder antifúngico, mediante la espectrofotometría ultravioleta visible por el conocido método de Folin–Ciocalteu (Singleton, 1999).

Para el análisis se tomaron 30 µL del extracto a analizar (dependiendo de la concentración de polifenoles), se colocaron en un matraz aforado de 10 mL, se adicionaron 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu's diluido en proporción 1:10, se colocó la mezcla en la oscuridad por 2 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 2 mL de carbonato de sodio acuoso de concentración 75 g/L. Luego de una ligera agitación se enrasaron los matraces y se dejaron estabilizar por 2 horas.

Se midió la absorbancia a  $\lambda = 760$  nm en el espectrofotómetro UV-visible.

Se calculó el contenido de polifenoles en el extracto y los resultados se expresaron en g/L de extracto acuoso, a través de la expresión basada en el modelo matemático de la curva de calibración de ácido gálico (Radice, *et al.*, 2017).

$$C = \frac{(A + 0,0028) * 0,25}{0,0734} \quad (1)$$

Donde:

C – concentración en g/L

A – absorbancia de las disoluciones de muestras

0,25 – factor de dilución

El resultado final fue expresado en gramos por cada 100 gramos (porcentaje masa/masa) de sólido pulverulento.

### **III.4.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *T. grandis* L. SOBRE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *R. stolonifer* Y *A. Niger***

Se realizó mediante cultivo de los hongos en placas Petri con medio PDA enriquecido con la mezcla homogénea del extracto acuoso obtenido. Se emplearon aislados de los hongos *R.*

*stolonifer* y *A. niger*.

Se sembró en el centro de cada placa un disco de 8 mm de diámetro del hongo y se incubó a  $30 \pm 1$  °C en condiciones de oscuridad. Se midió el diámetro de la colonia cada 24 h hasta que el testigo cubriera totalmente la placa.

Se calculó el Índice de Respuesta Alelopática (IRA) (Ruhua *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006), para comprobar el efecto producido por el extracto sobre los hongos, según las expresiones:

$$IRA = \frac{M}{T} - 1 \quad (2)$$

$$IRA = 1 - \frac{T}{M} \quad (3)$$

Cuando el crecimiento de la muestra (M) es mayor o igual al del testigo (T), se aplica la primera fórmula, en el caso contrario se aplicará la segunda. Si el índice es mayor que cero, se evidencia la existencia de una estimulación en el crecimiento micelial; si el mismo es menor que cero, el extracto produjo inhibición del desarrollo fungoso. Si  $T=M$ ,  $IRA=0$ .

Se realizó el análisis de varianza de los resultados del diámetro de crecimiento a través del programa “Design Expert” y se dibujaron curvas de comportamiento mediante el software Microsoft Excel. Este experimento se realizó con cinco réplicas.

#### **III.4.4. EQUIPOS, MATERIALES, UTENSILIOS, REACTIVOS E INSTRUMENTOS**

- Balanza analítica ADAM. Alemania
- Balanza técnica THOMAS Scientific. TSXB4200C. Estados Unidos.
- Baño ultrasónico. BRANSON. Estados Unidos.
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 100 – 1000  $\mu$ L. Alemania
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 10 – 100  $\mu$ L. Alemania
- Autoclave. Shanan. China
- Plancha de calentamiento. Boeco. Alemania
- Estufa. Barnstead. Estados Unidos.
- Bomba de vacío. GE Motors & Industrial System. Estados Unidos.
- Evaporador rotatorio. Büchi. Alemania.
- Agua destilada
- Reactivo de Folin Ciocalteau. MERCK. Alemania

- Espátulas de laboratorio
- Viales de plástico. Eppendorf 1 mL
- Cristalería común de laboratorio, incluido material volumétrico
- Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.
- Molino de cuchillas. Malla 1 mm. Thomas-Weley. Estados Unidos.
- Medio de cultivo PDA
- Cepas de los hongos *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*.
- Material foliar de *Tectona grandis* L.



## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN ACUOSA ASISTIDA POR ULTRASONIDOS DE POLIFENOLES DE *Tectona grandis* L.

La extracción asistida por ultrasonido se ha seleccionado en lugar de las formas tradicionales de extracción por maceración o por Soxhlet, pues se aumenta el rendimiento y se acorta el tiempo de extracción, debido al incremento de la transferencia de masa, además del mayor acceso del disolvente al material celular deshidratado y pulverizado. El colapso de las cavidades cercanas a la pared celular, conocido como cavitación, provoca la ruptura del tejido y libera el contenido celular al medio de extracción (Palma *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010).

En este caso el rendimiento calculado fue de 22,4 %, teniendo en cuenta que la masa promedio de sólidos pulverulentos fue de 5,01 g y la masa de extracto seco fue como promedio 1,12 g, superior al 17,34 % obtenido en trabajos anteriores por extracción con Soxhlet (Kanath & Shabaraya, 2017).

### IV.2. ANÁLISIS DE POLIFENOLES EN LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Tectona grandis* L.

En la tabla 1 se observan los resultados cuantitativos de polifenoles totales en los extractos acuosos obtenidos, determinados por el método de Folin-Ciocalteau.

Tabla 1. Resultados de polifenoles totales en los extractos acuosos de *T. grandis*, expresados en porcentaje respecto a la masa de sólidos pulverulentos.

Réplica	C (mg/L)	C media (mg/L)	C (%)
1	23,26		
2	23,58	23,40	2,92
3	23,36		

Fuente: Elaboración propia

Este resultado concuerda con el 2,23 % obtenido en una investigación anterior para extractos foliares de *T. grandis* por extracción asistida por ultrasonidos (Koffi, 2015).

### IV.3. EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Tectona grandis* L. SOBRE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *R. stolonifer* Y *A. niger*.

Los resultados obtenidos para los diámetros promedio de crecimiento en función de la concentración, durante los cinco días de experimentación, para ambos hongos fitopatógenos, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Diámetros de crecimiento promedio obtenidos de *A. niger* y *R. stolonifer* para el extracto acuoso de *T. grandis* y el testigo (concentración = 0) durante los cinco días de experimentación.

Conc. ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Tiempo (días)	Diámetro promedio (mm)	
		<i>A. niger</i>	<i>R. stolonifer</i>
0	1	10,6	54,8
0	2	22,3	90
0	3	34,6	90
0	4	53,2	90
0	5	80,9	90
0,5	1	9,9	61,5
0,5	2	20,7	90
0,5	3	32,2	90
0,5	4	50,2	90
0,5	5	80,5	90
1,5	1	8,6	57,7
1,5	2	17,5	87,5
1,5	3	28,9	90
1,5	4	49	90
1,5	5	79,3	90
3	1	8,0	55,2
3	2	13,3	84,8
3	3	20,6	90
3	4	36,1	90
3	5	66,5	90

Fuente: Elaboración propia

A simple vista se puede apreciar que las cajas que contenían el hongo *R. stolonifer* fueron cubiertas completamente al segundo día de medición para el testigo y para la concentración más baja; para las dos restantes concentraciones se observó el mismo comportamiento a partir del tercer día. Esto evidencia un pobre control de dicho microorganismo por el extracto, o la necesidad de aplicar una mayor concentración. Para *A. niger* se observa un comportamiento diferente, lo cual se puede visualizar en la figura 1.

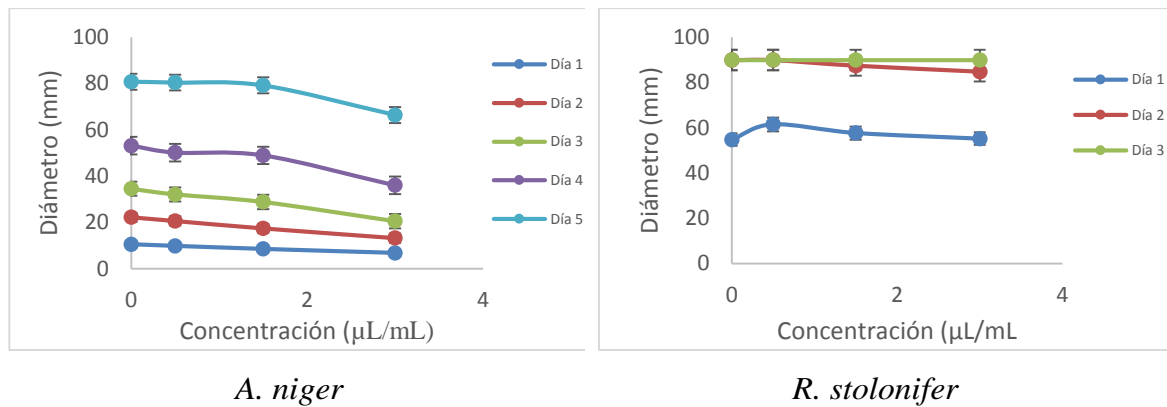


Figura 1. Gráficos de tendencias del crecimiento de ambos hongos con la concentración del extracto acuoso de *T. grandis*, para cada día de medición.

Fuente: Elaboración propia

Para *R. stolonifer*, hasta el día 3, que ya estaban cubiertas todas las placas, no se evidencia una variación significativa del diámetro de crecimiento respecto a la concentración, sin embargo, para *A. niger* sí se observa una variación significativa, según las barras de error colocadas en las líneas de tendencia para la máxima concentración (3 µg/mL).

Una vez calculado el Índice de Respuesta Alelopática (IRA) para *A. niger* se observó el comportamiento gráfico mostrado en la figura 2.

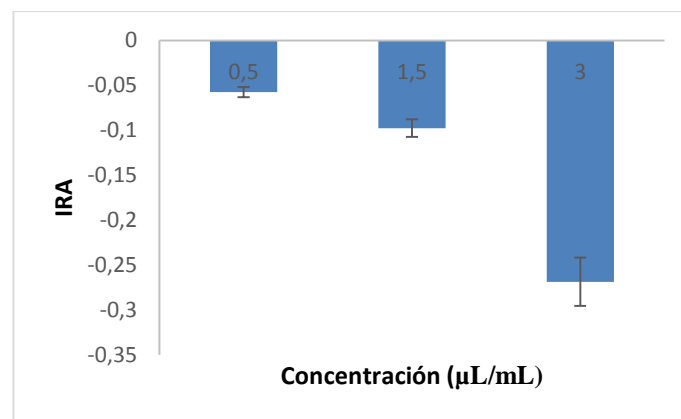


Figura 2. Índice de Respuesta Alelopática (IRA) vs. concentración del extracto acuoso de *T. grandis* para *A. niger*.

Fuente: Elaboración propia

En general, a medida que se eleva la concentración del extracto de *T. grandis*, se puede evidenciar una mayor inhibición en el crecimiento micelial de *A. niger*. Este es un factor de mucha importancia en los sistemas alelopáticos, pues muchos de estos agentes provocan diferentes efectos en función de la concentración (Duke, 2010). Varios

estudios fundamentan esta relación; algunas plantas poseen metabolitos que comienzan a manifestar el efecto de su actividad a partir de determinado nivel de concentración, al que comienza a afectar irreversiblemente la integridad celular (Estrada, 2015; Thomas, 2007; Tharayil, 2009; Lorenzo & González, 2010).

Los valores de IRA < 0 en todos los casos, demuestran que existe inhibición del crecimiento de *A. niger* a todas las concentraciones ensayadas. Las barras de error indican que la inhibición aumenta significativamente con la concentración.

Si se analiza el comportamiento inhibitorio respecto a los días de medición (Figura 3), puede verse que la concentración 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  se muestra sin variación significativa hasta el tercer día; hacia el quinto día se observó la colonización casi completa de la caja.

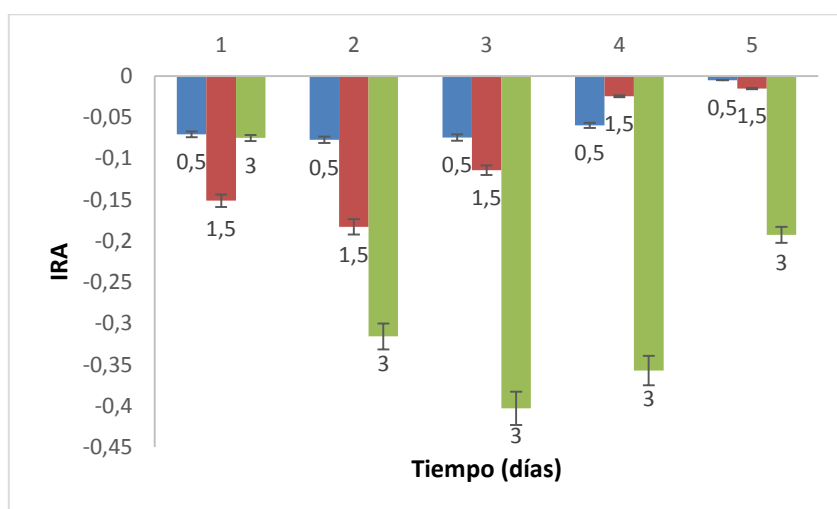


Figura 3. Índice de Respuesta Alelopática (IRA) en función del tiempo (días) del extracto acuoso de *T. grandis* para *A. niger*.

Fuente: Elaboración propia

La concentración 1,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  tiene su máximo valor de inhibición al segundo día, y al quinto día se manifiesta de manera similar a la concentración 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

A la concentración de 3  $\mu\text{L}/\text{mL}$  la mayor inhibición se observa al tercer día, aunque al cuarto día la disminución no es significativa, teniendo en cuenta las barras de error; al quinto día disminuye el poder inhibitorio, probablemente por desactivación de los componentes del extracto, sin embargo, la inhibición es significativamente superior que a las dos concentraciones más bajas.

En numerosas investigaciones con extractos acuosos o hidroalcohólicos de plantas se ha demostrado que estos poseen actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos debido a la presencia de taninos y flavonoides (compuestos polifenólicos). Pueden ponerse como

ejemplo los estudios desarrollados sobre varias cepas de género *Fusarium* con varios extractos de *Cestrum nocturnum* L., que produjeron inhibición micelial del mismo (Bautista-Baños *et al.*, 2018).

En un estudio realizado con extractos de *Larrea tridentata*, ricos en compuestos polifenólicos, se comprobó que los diferentes extractos obtenidos de esta planta son capaces de inhibir el desarrollo fungoso de 17 fitopatógenos de interés económico dentro de los cuales se relacionan: *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium sp.*, (Lira-Saldívar, 2003). El material pulverulento obtenido de las hojas de esta misma planta afectó el crecimiento micelial de algunos de estos hongos, tanto en condiciones in vitro como de campo (Hernández-Castillo *et al.*, 2008).

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de varianza comparativo entre los diámetros de crecimiento iniciales (primer día) y los finales (quinto día), para el hongo *A. niger*, realizado a todas las concentraciones de *T. grandis*, incluyendo el testigo (concentración cero), mediante el programa Design Expert. Los resultados se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) realizado.

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	Valor p Prob > F	
Modelo	1223,3	3	407,77	19,11	< 0,0001	significativo
A-Concentración	1223,3	3	407,77	19,11	< 0,0001	
Error Puro	768,2	36	21,34			
Correlación Total	1991,5	39				

Fuente: Elaboración propia

Como se puede apreciar, el modelo resultó significativo y adecuado para predecir el comportamiento de los valores numéricos. La distribución de los puntos evidencia la idoneidad de dicho modelo para cubrir el intervalo de los datos analizados (Bravo, 2007).

Nótese en la figura 4, que los valores de  $R^2$  ajustado (0,58) y  $R^2$  predicho (0,52) son cercanos. En la Figura 5 se puede considerar la estimación de los efectos estandarizados positivos de la concentración del extracto acuoso de *T. grandis* sobre el diámetro medio del hongo *A. niger*, teniendo en cuenta que la variable concentración resultó significativa (Whitcomb & Oehlert, 2007).

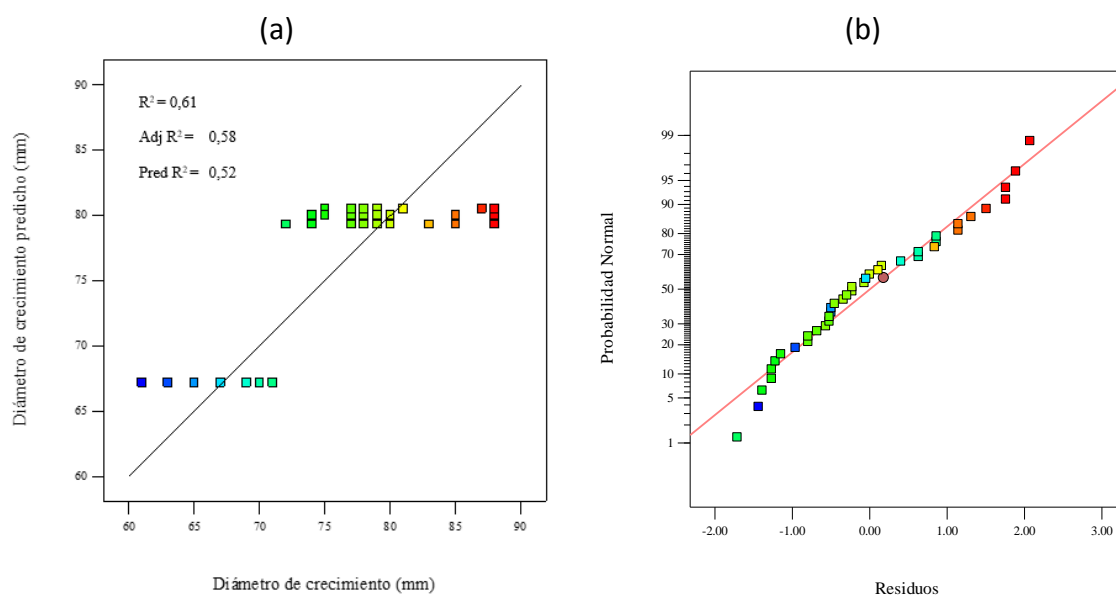


Figura 4. Efectos estandarizados positivos y negativos de la concentración del extracto acuoso de *T. grandis* sobre el diámetro medio del hongo *A. niger*

Fuente: Elaboración propia

Lo anterior se aprecia numéricamente en la tabla 4, donde se puede notar la importancia de la concentración del extracto acuoso de *T. grandis* sobre la inhibición del crecimiento micelial del hongo *A. Niger*.

Tabla 4. Importancia de la concentración del extracto acuoso de *T. grandis* sobre el diámetro de crecimiento de *A. niger*.

Parámetro	Alcance	L. inferior	L. superior	Importancia
A: Concentración	En el intervalo	0	3	3
Diámetro (mm)	mínimo	61	88	5
Error estándar del diámetro	ninguno	1,46078	1,46078	3

Fuente: Elaboración propia

Es importante destacar que los valores numéricos siguieron una distribución normal, por lo que los efectos que no fueran significativos tenderán a formar una línea recta, mientras que los significativos aparecerán alejados de la línea de normalidad; tal es el caso de la concentración en la figura 5.

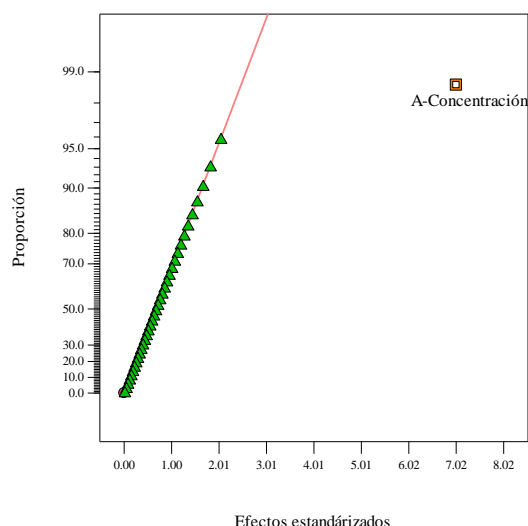


Figura 5. Representación gráfica de la significación de la concentración en concentración del extracto acuoso de *T. grandis* sobre el diámetro de crecimiento de *A. niger*.

Fuente: Elaboración propia

Adicionalmente, el análisis estadístico arroja tres soluciones para las posibles combinaciones de los niveles categóricos de cada factor (Tabla 5). La seleccionada se corresponde con la máxima concentración de 3  $\mu\text{g/mL}$  y corresponde a un diámetro máximo de crecimiento de 67,2 mm.

Tabla 5. Soluciones para tres combinaciones de los niveles categóricos de concentración de extracto y diámetro de crecimiento.

Orden	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diámetro (mm)	Error estándar	Importancia	
1	<u>3</u>	<u>67,200</u>	<u>1,461</u>	<u>0,770</u>	<u>Seleccionado</u>
2	1,5	79,300	1,461	0,322	
4	0,5	80,500	1,461	0,278	

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, cabe recalcar que los compuestos polifenólicos extraídos de *T. grandis* en medio acuoso se caracterizan por tener importantes efectos antioxidantes y son inhibidores de algunos enzimas de rutas oxidativas (Ortiz-Torres *et al.*, 2009).

De igual manera, muchos de ellos pueden acomplejar algunos metales como el hierro. Estos mecanismos pueden disminuir las especies reactivas del oxígeno en la planta, pero tal capacidad también está relacionada con la inhibición en el desarrollo de diferentes microorganismos, debido a la inactivación de procesos a nivel de membrana que

dependen de estos componentes.

Por lo anteriormente dicho, debe tenerse en cuenta, ante una aplicación en campo, que los extractos acuosos ricos en compuestos polifenólicos de *T. grandis* pueden incidir negativamente sobre el desarrollo de la biota del suelo pues pueden ser capaces de reducir el crecimiento de bacterias nitrificantes y hongos del género *Fusarium* (Barberi *et al.*, 2005).

Por tanto, a la hora de proponer algunas soluciones útiles a la práctica agrícola que pueden permitir introducir el resultado de este proyecto de innovación debe manejarse con cuidado el posible riego de los suelos directamente con los extractos. Una manera factible de controlar hongos fitopatógenos que puedan inhibir la germinación de semillas puede ser su inmersión en los extractos acuosos de *T. grandis* obtenidos por maceración de las hojas secas (Tierra-Tingo 2009) o proceder a una peletización de dichas semillas (Terreros & Karen, 2014).



## **CONCLUSIONES**

La extracción asistida por ultrasonidos resultó eficaz para la obtención de los extractos acuosos de *Tectona grandis* L.; se obtuvieron rendimientos sobre la base de los sólidos extraíbles de 22,4 %, concordantes con estudios recientes.

El contenido de polifenoles en los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. fue de 2,92 %; teniendo en cuenta que la mayor parte de estos compuestos son taninos y flavonoides, estos extractos pueden emplearse potencialmente como antifúngicos.

Los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. no resultaron eficaces para el control de *Rhizopus stolonifer* en el intervalo de concentraciones evaluados.

La actividad antifúngica de los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. resultó adecuada para el control de *Aspergillus niger*, principalmente a la concentración de 3 µL/mL.

## RECOMENDACIONES

- Evaluar concentraciones superiores a 3  $\mu\text{g/mL}$  de los extractos acuosos de *T. grandis* obtenidos sobre el hongo *R. stolonifer*.
- Evaluar la influencia de la inmersión de semillas de interés agrícola en los extractos acuosos de *T. grandis*, en condiciones semicontroladas para el control de *A. niger*.

## BIBLIOGRAFÍA

Adaskaveg, J. E., Förster, H., & Sommer, N. F. (2002). Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. *Postharvest technology of horticultural crops*, 3311, 163-195.

Angulo-Escalante, M. A., Armenta-Reyes, E., García-Estrada, R. S., Carrillo-Fasio, J. A., Salazar-Villa, E., & Valdéz-Torres, J. B. (2009). Extractos de semilla de *Swietenia humilis* Zucc. con actividad antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(2), 84-92.

Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop protection*, 25(2), 108-118.

Baños, S. B., Necha, L. L. B., Lauzardo, A. N. H., Velázquez-del Valle, M., Tejacal, I. A., & Sánchez, D. G. (2018). Polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* L. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *Fusarium spp.* | *UDO Agrícola*, 8(1).

Barberi, F.; Ueda, T.; Prado, B. (2005). Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeossoi*. *Cáncer*. vol. 100(4): 397 - 401.

Blanco-Florez, J., Fernando-Trugilho, P., Tarcisio-Lima, J., Gherardi-Hein, P. R., & Moreira da Silva, J. R. (2014). Characterization of young wood *Tectona grandis* L. f. planted in Brazil. *MADERA Y BOSQUES*, 20(1), 11-20.

Borras, O.; Pérez, M.; Nogueira, J. (1997). Empleo de *Trichoderma* sp en el control de la pudrición piña causada por *Phytophthora nicotianae* var parasitica en segmentos de tallos. *Cuadernos de fitopatología*. vol. 54: 148 - 149.

Bravo, L., Goya, L., & Lecumberri, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40(3), 393-405.

Cerón Salazar, I. X. (2009). Separación de metabolitos de los aceites esenciales de eucalipto y cidrón por destilación molecular. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales).

Chaudhary, S., Kanwar, R. K., Sehgal, A., Cahill, D. M., Barrow, C. J., Sehgal, R., & Kanwar, J. R. (2017). Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Frontiers in plant science*, 8, 610.

Daniel Coq-Huelva, Angie Higuchi, Rafaela Alfalla-Luque, Ricardo Burgos-Morán and Ruth Arias-Gutiérrez. (2017) Co-Evolution and Bio-Social Construction: The Kichwa Agroforestry Systems (Chakras) in the Ecuadorian Amazonia. *Sustainability*, 9, 1920; doi:10.3390/su9101920.

De García, C. L., & Rojas, N. (1995). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 3(42-48.), 21.

De La Rosa, C. A., & Osorio, O. (2012). Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de *Glycine max* (soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. *Revista Colombiana de Ciencias de la Salud* (39-43.), 1.

Díaz-Castellanos, M. (2011). Incidencia de *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en villa clara. bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Departamento de agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara.

Duke, S. O. (2010). Allelopathy: current status of research and future of the discipline: a commentary. *Allelopathy Journal*, 25(1), 17-30.

Elzaawely, A. A. (2005). Allelopathic activity and identification of allelochemicals from *Rumex japonicus* Houtt. *Allelopathy J.*, 16, 209-216.

Espejo Quispe, Félix; Espinosa Ruíz, Ray; Puente Isidrón, Mayra; Rodríguez García, Mireya; Cupull Santana, René. (2010) Efecto alelopático de los extractos acuosos de *Tectona grandis* L. y *Tagetes erecta* L. sobre la germinación de cultivos de interés agrícola. *Revista Centro Agrícola*. ene-mar, Vol. 37 Issue 1, p69-74.

Espinosa, R. (2007). Efecto alelopático negativo de los metabolitos secundarios presentes en *Terminalia catappa* L., *Tagetes erecta* L. y *Tectona grandis* L. sobre los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc (Tesis en opción al título de Máster en Agricultura Sostenible, Departamento de Agronomía, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba).

Estrada, E., Ordóñez, P., & Morales, O. (2015). Validación de la actividad antifúngica del tubérculo de *Xanthosoma robustum* y determinación de metabolitos secundarios responsables de la actividad. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 17(1).

Fernández, W. O., & Sánchez, L. R. (2016). Desarrollo y Validación de Técnicas Espectrofotométricas para la Determinación de Flavonoides Totales, Basada en Quercetina, en las Hojas de *Psidium guajava* L. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología* 3(276-289) 5.

Frobisher M, H. R. (1974). *Fundamentals of Microbiology*, Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 390.

García J.A. (2002). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los Antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología*.

Girois, S. B., Chapuis, F., & Deculier, E. (2005). Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. microbiol. infect dis.*, 2(24), 119-130.

Godghate, A. G., & Sawant, R. S. (2014). Phytochemical analysis of leaves of *tectona grandis* linn. *Int J Pharm Bio Sci*, 5(1), 355-359.

González, C. L. C., & Pérez, E. M. (2017). Efecto alelopático de un extracto acuoso de *Sorghum halepense* (L.) Pers. sobre dos dicotiledóneas. *Revista Científica Agroecosistemas*, 5(2), 25-31.

Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J., Apone, F., Abdel-Salam, E., Qahtan, A., Siddiqui, K. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6), 309.

Gutiérrez Y, M. M. (2003). Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajava* L. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, 1(20-35), 38.

Hernández-Castillo, F. D., Lira-Saldívar, R. H., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M. E., Padrón-Corral, E., & Hernández-Suárez, M. (2008). Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* sp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton* (Buenos Aires), 77, 241-252.

Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Trejo-Espino, J. L. (2006). Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of Rhizopus rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1).

Herrera, L. (2004). Los hongos fitopatógenos de los suelos tropicales y subtropicales. Tesis Doctoral. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Isaza, J. H. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*, 1(33).

Kaur, G. J., & Arora, D. S. (2010). Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family Umbelliferae-Current status. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 087-094.

Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858.

Kanath, K. K., & Shabaraya, A. R. (2017). Comparison of antibacterial activity of leaves extracts of *Tectona grandis*, *Mangifera indica*, and *Anacardium occidentale*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9, 36-39.

Koffi, E. N., Cissé, I., Kassi, A. B., Lozano, P. R., Adima, A. A., Assidjo, E. N., & Bekro, Y. A. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Tectona grandis* leaves, using experimental design. *European Journal of Medicinal Plants*, 10(3), 1-10.

Kostennikova, Z. (1997). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoids in calendula tincture. *Farmatsiya*, 6(83-6.), 33.

Leicach, S. (2005). Alelopatía, estrategias defensivas de las plantas. *Ciencia Hoy*. vol. 15(89).

Lira Saldívar, R. H. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (DC) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2).

López, S., & Isabel, Y. (2016). Efecto alelopático del anamú (*Petiveria alliaceae* L.) sobre los hongos antagonistas *Trichoderma viride* Pers y *Trichoderma harzianum* Rifai (Doctoral dissertation, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía.).

Lorenzo, P., & González, L. (2010). Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Revista Ecosistemas*, 19(1).

Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., & Martínez-Ayala, A. L. (2018). Plant sources, extraction methods, and uses of squalene. *International Journal of Agronomy*, 2018.)

Mariscal-Lucero, S. d.-C.-M.-S. (2015). Evaluación de fenoles y limonoides en hojas de *Cedrela odorata* (Meliaceae) de una plantación experimental establecida en Tezonapa Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 2(545-558), 63.

Narwal, S. S. (2012). *Allelopathy in crop production*. Scientific publishers.

Nelson, E. (2004). *Biology, Ecology and Allelopathy*. Ecology Journal. Revisado, 30.

Ortiz-Torres, H.; Sánchez, W.; Murillo-Perea, E.; Méndez-Arteaga, J. (2009). Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad. *Revista Tumbaga* vol. 4: 43-58.

Pa, W. (1997). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Approved Standard M2-A6. En <http://www.nccls.org/es/source/orders/free/m2-a8.pdf>.

- Palma, M., Piñeiro, Z., Rostagno, M., & Barroso, C. (2006). Ultrasound-Assisted Extraction of Compounds From Foods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4, 135-138.
- Phillips, I. (1998). The subtleties of antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* (5 - 12), 42.
- Pichersky, E., & Raguso, R. A. (2018). Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist*, 220(3), 692-702.
- Quiroga, E. N., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2001). Screening antifungal activities of selected medical plants. *J. Ethnopharmacol.* 1(74), 89-96.
- Radice, M., Bravo, L., Perez, M., Cerda, J., Tapuy, A., Riofrío, A., ... & Chiurato, M. (2017). Determinación de polifenoles en cinco especies amazónicas con potencial antioxidante. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 6(1), 55-64.
- Reigosa, M. J., Pedrol, N., & González, L. (Eds.). (2006). *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. Springer Science & Business Media.
- Rivero, C. L., Quiñones-Gálvez, J., Martínez, A. T. P., Ortiz, C. C. C., Paneca, M. R., Valdéz, G. A. C., Ruiz, Y. K. C. (2018). Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. *Biotecnología Vegetal*, 18(1).
- Ruhua, W., Zhou, B., & Zhang, F. (2005). Allelopathic Effects of Roots Extracts of Eggplants on Verticillium wilt (*Verticillium dahliae*). *Allelopathy Journal*, 15(1), 74-84.
- Sampietro, D. A. (2002). Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales "Dr. Antonio R. Sampietro" Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho. En: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia.htm>. Última visita, 15-05-2019.
- Sefidkon, F., Salehyar, S., Mirza, M., & Dabiri, M. (2004). The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 579-581.
- Shivanna, M. B., & Mallikarjunaswamy, G. E. (2009). Fungal diseases and their effect on phytochemical constituents of medicinally important *Terminalia* species in Bhadra Wildlife Sanctuary, Karnataka, India. *Indian Phytopathology*, 62(1), 37-43.



- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Stompor, E. (2003). The Fungal Activity of Spice Plants Aqueous Leachates Phytopathogen. *Allelopathy Journal*, 10(1), 57-63.
- Terreros, A., & Karen, C. (2014). Peletización de semillas de trébol con *Pseudomonas* sp. aisladas de la rizosfera de maca, y evaluación de su efecto en la emergencia de semillas.
- Tierra, L. E. (2009). Evaluación de diferentes niveles de fitohormonas (citoquininas, giberelinas y etileno) en la producción de forraje y semillas de la *Poa palaustris* (Pasto poa) (Tesis de grado, Facultad de Ciencias Pecuarias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador).
- Tharayil, N. (2009). To survive or to slay. *Plant Signaling and Behavior*. vol. 4(7): 580-583.
- Thomas, J. K. (2007). Control Biológico de Enfermedades en Vegetales. *Rev. Cultura Organica*. vol. 34(2): 5-8.
- Vega, A. S., Valdez, L. F., & Rendón, A. C. (2000). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Red Universidad Eafit*.
- Velázquez-del Valle, M. G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Guerra-Sánchez, M. G., & Amora-Lazcano, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 49-55.
- Villacís-Aldaz, L. A.-G.-M.-T.-M. (2017). Actividad anti fúngica (in vitro) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1(59-64), 5.
- Vizcaíno, R. L. (2007). Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L. *Scientia et technica*, 1, 33.
- Wang, Z. H., Christie, P., Chen, Q. B., Liu, X. X., Xie, L. L., Bai, C. J., & Li, X. L. (2006). Allelopathic potential and chemical constituents of volatile oil from *Praxelis clematidea*. *Allelopathy Journal*, 18(2), 225-235.

Wilcke, J. (1999). Antimicrobial therapy. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary and Medicine. En <http://cpharm.vetmed.vt.edu/vm8784/ANTIMICROBIALS/Principles.htm>.

Whitcomb, P., & Oehlert, G. W. (2007). Graphical selection of effects in general factorials. In Fall Techn Conf (Vol. 612, p. 2036).

Zavaleta, E. (2000). "Alternativas de Manejo de las Enfermedades de las Plantas Medicinales." Terra. En: [http://www.rediris.org.com/alter\\_enf/50106.htm](http://www.rediris.org.com/alter_enf/50106.htm)

Zhang, J. D., Cao, Y. B., & Xu. (2005). In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. Biol Pharm Bull, 12(28), 2211-2215.

Zhang, M., Ling, B., Kong, C., Liang, G., & Rong, Y. (2005). Allelopathic Effects of Lantana (*Lantana camara* L.) on water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms). Allelopathy Journal, 15(1), 125-130.

Zhu, X. F., Zhang, H. X., & Lo, R. (2005). Antifungal activity of *Cynara scolymus* L. extracts. Fitoterapia., 1(76), 108-111.

## ANEXOS

Resumen fotográfico de los procedimientos realizados

Fotografía 1. Recepción del material vegetal



Fotografía 2. Molinado del material foliar seco



Fotografía 3. Sólidos pulverulentos obtenidos de *T. grandis*



Fotografía 4. Extracción asistida por ultrasonidos



Fotografía 5. Evaluación de la actividad antifúngica



Fotografía 6. Crecimiento de *A. niger* en medio PDA

