

REPÚBLICA DEL ECUADOR



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TEMA:

“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Bixa orellana* L., *Carica papaya* L., *Piper aduncum* L. CONTRA PATÓGENOS VEGETALES”

Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario

Autor: Cuvi Cuvi, Jemberly Johana

Directora: Dra. Laura Scalvenzi

PUYO - ECUADOR

Mayo 2013

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Directora del informe de investigación sobre el tema: **“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Bixa orellana* L., *Carica papaya* L., *Piper aduncum* L. CONTRA PATÓGENOS VEGETALES”** de la autora Jemberly Johana Cuvi Cuvi, estudiante de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por.....

Puyo, de del 2013

AUTORÍA DEL TRABAJO

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Bixa orellana* L., *Carica papaya* L., *Piper aduncum* L. CONTRA PATÓGENOS VEGETALES**” como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y propuesta son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autor de este trabajo de grado.

Puyo, del 2013

AUTOR

.....
Jemberly Johana Cuvi Cuvi

DERECHO DE AUTOR

El autor cede sus derechos, para que la institución pueda hacer uso en lo que estime conveniente, siempre y cuando sea para fines investigativos o de consulta.

Puyo, de del 2013

AUTOR

.....

Jemberly J. Cuvi C.

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del tribunal examinador aprueban el informe de investigación, sobre el tema: **“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Bixa orellana* L., *Carica papaya* L., *Piper aduncum* L. CONTRA PATÓGENOS VEGETALES”**, de la autora de nombres y apellidos Jemberly Johana Cuvi Cuvi, estudiante de la carrera de Ingeniería Agropecuaria.

Puyo, 2013

Para constancia firman

.....

DEDICATORIA

A mis padres que a cada instante fueron la fuerza principal para culminar mi carrera.

A mis hermanos quienes me han ayudado de una u otra manera.

A mi familia en general quienes con sus oraciones fueron un pilar principal para mí.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme permitido y dado fuerzas para culminar mi carrera.

Agradezco a mis padres quienes son mi apoyo fundamental en todo.

Agradezco a mis hermanos quienes de una u otra manera estuvieron apoyando a lo largo de mi carrera de estudios.

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Laura Scalvenzi, Directora de Tesis quien con mucha paciencia me ha brindado apoyo en la elaboración del Trabajo.

A mis amigos, familia y hermanos que siempre estaban con palabras de ánimo.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
a. OBJETIVOS	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos.....	4
b. HIPÓTESIS.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 <i>Bixa orellana</i> L. (Achiote o Annatto).....	6
2.2 <i>Carica papaya</i> L. (Papaya)	9
2.3 <i>Piper aduncum</i> L. (Matico).....	10
2.4 Descripción del Reino Fungi.....	12
2.4.1 Descripción morfológica de los hongos fitopatógenos estudiados	
13	
• <i>Sclerotium</i>	13
• <i>Sclerotinia</i>	16
• <i>Alternaria</i>	18
• <i>Fusarium</i>	20
3. MATERIALES Y METODOS.....	23
3.1 Localización y duración del experimento.....	23
3.2 Condiciones meteorológicas.....	23
3.3. Materiales y equipos	24
3.4. Factores de Estudio	25
3.5. Diseño experimental	25
3.6. Mediciones experimentales	26
3.7. Manejo del experimento	26

3.7.1 Recolección e identificación taxonómica de las plantas investigadas.....	26
• <i>Bixa orellana</i> L.....	26
• <i>Carica papaya</i> L.....	27
• <i>Piper aduncum</i> L.....	29
3.7.2 Especímenes para el Herbario ECUAMZ.....	30
3.7.3 Obtención de extractos vegetales.....	36
3.7.4 Aislamiento de patógenos vegetales.....	39
3.7.7 Actividad biológica <i>in vitro</i> de los extractos de <i>Piper aduncum</i> L., <i>Carica papaya</i> L. y <i>Bixa orellana</i> L.....	41
Preparación del material de laboratorio.....	41
Evaluación de la actividad biológica de los extractos.....	41
3.8 Análisis económico.....	43
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	44
4.1 Secado de plantas para producción de extractos vegetales.....	44
4.2 Producción de extractos vegetales.....	44
4.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los extractos vegetales.....	45
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto de <i>Bixa orellana</i> L.....	45
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto de <i>Carica papaya</i> L.....	52
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del extracto de <i>Piper aduncum</i> L.....	56
5. DISCUSIÓN.....	65
6. CONCLUSIONES.....	65
7. RECOMENDACIONES.....	66
8. RESUMEN.....	67
9. SUMMARY.....	69
10. BIBLIOGRAFIA.....	70

10. ANEXOS.....	74
-----------------	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Inflorescencia de <i>Bixa orellana</i> L.	6
Figura 2 - Planta, flores, frutos y semillas de <i>Carica papaya</i> L.	9
Figura 3 - Hojas e inflorescencia de <i>Piper aduncum</i> L.	10
Figura 4 - Pudrición de la raíz causada por el hongo <i>Sclerotium</i> sp. (Izquierda). Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Sclerotium</i> sp. (Derecha)	14
Figura 5 - Esclerocios redondos (Izquierda) o irregulares (derecha)	15
Figura 6– Forma de Asco de <i>Sclerotinia</i> sp. con ascosporas	16
Figura 7 - <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> en zanahoria (Izquierda). Crecimiento <i>In vitro</i> de <i>Sclerotinia</i> sp. (Derecha)	17
Figura 8 – Desarrollo y síntomas de las enfermedades de hortalizas y flores producidas por el hongo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
Figura 9 - Desarrollo y síntomas de las enfermedades producidas por <i>Alternaria</i> sp.	19
Figura 10 - Conidios del género <i>Fusarium</i> sp.....	20
Figura 11 - Ciclo patológico de la marchitez del tomate ocasionado por <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i>	21
Figura 12 - Micelio amarillento y rosado, algodonoso característico de <i>Fusarium</i> sp.	22
Figura 13 - Ubicación de la localidad de estudio: Ciudad de Puyo, Cantón Pastaza, Provincia de Pastaza, Ecuador	23
Figura 14 - Planta de <i>Bixa orellana</i> (Achiote) con su inflorescencia y hojas secas	27
Figura 15 - Planta, flores, frutos y semillas de <i>Carica papaya</i> L.	27
Figura 16 - Planta femenina de <i>C. papaya</i> L. (A) y planta masculina de <i>C. papaya</i> (B)	28
Figura 17 – Hojas e inflorescencia de <i>Piper aduncum</i> L. (Matico)	29
Figura 18 - Disposición de las hojas de una muestra de planta sobre una cartulina de herbario. Las hojas excedentes se cortan dejando el peciolo visible (Missouri Botanical Garden, sf).....	31
Figura 19 – Prensa manual para secado de muestras botánicas.....	32

Figura 20 – A) muestra seca de <i>C. papaya</i> L. B y C) Montaje de especímenes <i>Bixa orellana</i> L., D) pesas para fijar la muestra	33
Figura 21 - Cocido del espécimen en la cartulina	34
Figura 22 – Etiqueta de <i>Carica papaya</i> L. (Papaya) para catalogación	35
Figura 23 – Especímenes botánicos montados: A) <i>P. aduncum</i> L. B) <i>B. orellana</i> L. C) <i>C. papaya</i> L.	35
Figura 24 - Percoladores de acero para el proceso de extracción.....	36
Figura 25 – Corte longitudinal de un percolador	37
Figura 26 - Extracto de <i>Piper aduncum</i> L. percolador (Izquierda), extracto de <i>P. aduncum</i> en el Rotovapor (derecha)	38
Figura 27 - A) Rotovapor con el extracto <i>B. orellana</i> L., B) Vasos de precipitación con los extractos fluidos, C) Extracto seco de <i>B. orellana</i> L.	39
Figura 28 – A) Cultivos puros de <i>Sclerotium</i> sp. B) <i>Sclerotinia</i> sp. aislados de vainas de arveja enfermas	40
Figura 29 – A) Disco del hongo fitopatógeno (5 mm), B) Siembra del hongo en medio de cultivo	43
Figura 30 - Actividad antifúngica contra <i>Fusarium</i> sp. del extracto de <i>Bixa orellana</i> L.	46
Figura 31 – A) <i>Fusarium</i> sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) <i>Fusarium</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Bixa orellana</i> (0,5 mg/mL).....	47
Figura 32 - Actividad antifúngica contra <i>Sclerotium</i> sp., de extracto de <i>Bixa orellana</i> L.	48
Figura 33 – A) <i>Sclerotium</i> sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) <i>Sclerotium</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Bixa orellana</i> (3 mg/mL)	48
Figura 34 - Actividad antifúngica contra <i>Alternaria</i> sp., de extracto de <i>Bixa orellana</i> L.	49
Figura 35 – A) <i>Alternaria</i> sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) <i>Alternaria</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Bixa orellana</i> (6 mg/mL).....	49
Figura 36 - Actividad antifúngica contra <i>Sclerotinia</i> sp., de extracto de <i>Bixa orellana</i> L.	50

Figura 37 – A) <i>Sclerotinia</i> sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) <i>Sclerotinia</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Bixa orellana</i> (3 mg/mL).....	50
Figura 38 - Actividad antifúngica contra <i>Fusarium</i> sp., de extracto de <i>Carica papaya</i> L.	52
Figura 39 – A) <i>Fusarium</i> sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) <i>Fusarium</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Carica papaya</i> L. (0,5 mg/mL).....	53
Figura 40 - Actividad antifúngica contra <i>Alternaria</i> sp., de extracto de <i>Carica papaya</i> L.....	53
Figura 41 – A) Medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) <i>Alternaria</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Carica papaya</i> (6 mg/mL).....	54
Figura 42 - Actividad antifúngica contra <i>Sclerotium</i> sp., de extracto de <i>Carica papaya</i> L.....	54
Figura 43 - Actividad antifúngica contra <i>Sclerotinia</i> sp., de extracto de <i>Carica papaya</i> L.....	55
Figura 44 – Actividad antifúngica contra <i>Fusarium</i> sp., de extracto de <i>Piper aduncum</i> L.	56
Figura 45 - A) <i>Fusarium</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Piper aduncum</i> L. (6mg/mL) B) <i>Fusarium</i> sp. en medio de cultivo sin extracto.	56
Figura 46 - Actividad antifúngica contra <i>Alternaria</i> sp., de extracto de <i>Piper aduncum</i> L.....	57
Figura 47 – A) <i>Alternaria</i> sp. en medio de cultivo sin extracto., B) Extracto de <i>Piper aduncum</i> (3 mg/mL) inhibe el crecimiento de <i>Alternaria</i> sp.	57
Figura 48 - Actividad antifúngica contra <i>Sclerotium</i> sp., de extracto de <i>Piper aduncum</i> L.....	58
Figura 49 – A) <i>Sclerotium</i> sp. en medio de cultivo sin extracto. B) <i>Sclerotium</i> sp. en medio de cultivo con extracto de <i>Piper aduncum</i> L. a una concentración de 3 mg/mL.	58
Figura 50 - Actividad antifúngica contra <i>Sclerotinia</i> sp., de extracto de <i>Piper aduncum</i> L.....	59
Figura 51 – Crecimiento del hongo <i>Fusarium</i> sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) <i>B. orellana</i> L., B) <i>C. papaya</i> L., C) <i>P. aduncum</i> L.....	61

Figura 52 – Crecimiento del hongo *Alternaria* sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) *B. orellana* L., B) *C. papaya* L., C) *P. aduncum* L..... 62

Figura 53 – Crecimiento del hongo *Sclerotium* sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) *B. orellana* L., B) *C. papaya* L., C) *P. aduncum* L..... 63

Figura 54 - Crecimiento del hongo *Sclerotinia* sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) *B. orellana* L., B) *C. papaya* L., C) *P. aduncum* L..... 64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Actividad biológica de <i>B. orellana</i> L., <i>C. papaya</i> L. y <i>P. aduncum</i> L. de acuerdo a la literatura científica	6
Tabla 2 - Peso fresco de las hojas procesadas y rendimiento en droga seca de <i>Piper aduncum</i> L., <i>Carica papaya</i> L. y <i>Bixa orellana</i> L.....	44
Tabla 3 – Peso seco, volumen extracto líquido y peso extracto seco de <i>Piper aduncum</i> L., <i>Carica papaya</i> L. y <i>Bixa orellana</i> L.....	45

1. INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país pequeño que posee un alto porcentaje de Biodiversidad mundial ya que cuenta con una gran diversidad de flora y fauna. La flora ecuatoriana es inmensamente rica ya que posee alrededor de 25.000 especies de plantas vasculares de las cuales 4.173 especies son endémicas propias del país (Estrella, 2005). Un estudio de la FAO afirma que las plantas amazónicas son muy aprovechadas en varios ámbitos de la vida humana, como es el alimenticio, el medicinal y contra los patógenos vegetales (FAO, 2011).

Las plantas poseen componentes químicos denominados principios activos que dan a las mismas ciertas propiedades por las cuales el hombre las utiliza. Los principios activos “son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo” (Muñoz, 2002). Muchos de los principios activos tienen propiedades importantes entre ellas la antimicrobiana. Esta propiedad consiste en inhibir el crecimiento de los microorganismos como bacterias y hongos.

La producción agrícola siempre ha enfrentado el problema de las patologías vegetales, originadas por microorganismos. Desde la Revolución Verde el uso de productos de síntesis para aumentar la producción (fertilizantes) y para combatir los patógenos vegetales (agroquímicos) ha tenido gran difusión. Sin embargo se ha descubierto que el mal uso de dichos productos ocasiona problemas al medio ambiente y al Hombre (Murillo *et al.*, 2012).

Desde algunas décadas se está difundiendo la agricultura orgánica que prevé el uso de productos amigables con el ambiente y con el hombre, y capaces de reducir el impacto de

los agentes patógenos. Los agricultores orgánicos sustituyen el uso de agroquímicos de síntesis con el manejo integral del agroecosistema favoreciendo la diversificación de los cultivos mediante rotaciones o cultivos en asociación, el uso de abonos orgánicos y técnicas de lucha contra los patógenos que prevén el uso de extractos vegetales de plantas (FAO, 2003).

De acuerdo a esta situación, muchos países y agricultores han priorizado el cuidado ambiental, realizando investigaciones finalizadas a descubrir nuevos compuestos bioactivos que se puedan utilizar en el Manejo Integrado de Plagas (MIP). Los productos naturales obtenidos de las plantas son usados desde la antigüedad para el control de las enfermedades vegetales. Por ello los derivados vegetales (extractos, tinturas, aceites esenciales entre otros) han sido muy estudiado científicamente, con especial énfasis a los metabolitos secundarios, los cuales están involucrados en la acción antimicrobiana y antifúngica de los derivados (Singh & Singh, 2000).

Estos productos están constituidos por compuestos de origen natural que son parte de la estrategia de defensa de la planta frente a los patógenos; de hecho dichos compuestos son los que confieren a la planta las características antimicrobianas, repelentes, antivirales, antifúngica, que le permiten sobrevivir o resistir a los ataques externos. Por ende el uso de productos agroquímicos de origen natural permite aprovechar de las características de esos compuestos y utilizarlos para proteger los cultivos y asegurar la producción, sin impacto ambiental. Se han investigado extractos vegetales de muchos tipos de plantas diferentes, aplicando criterios de selección muy variados: la literatura científica, el uso tradicional hecho por las comunidades

locales, el dar un uso alternativo a plantas consideradas malezas, etc. (Osorio, 2006).

Entre las sustancias naturales más usadas en la agricultura se encuentran las piretrinas, que son aisladas del género *Chrysanthemum*, las cuales actúan como insecticidas. Las flores secas se pulverizan y los compuestos activos (piretrinas), contenidos en las cáscaras de las semillas, se extraen. Las piretrinas extraídas se asperjan como una suspensión en agua o aceite, o como polvo. Las piretrinas atacan el sistema nervioso de todos los insectos. Uno de los métodos para combatir el uso de agroquímicos es desarrollar métodos de control alternativo, dando como prioridad el uso de extractos de plantas con el fin de investigar y presentar alternativas de combate contra las plagas y las enfermedades en los cultivos (Murillo *et al.*, 2012).

El objetivo principal de esta tesis de pregrado es contribuir a encontrar extractos vegetales de plantas tropicales de uso común y etnobotánica, que tengan propiedades antifúngicas que puedan ser utilizadas en la lucha contra los patógenos vegetales.

a. OBJETIVOS

Objetivo General

Comprobar la efectividad de extractos de plantas amazónicas contra los patógenos vegetales

Objetivos Específicos

- ✓ Generar especímenes botánicos para el Herbario ECUAMZ de las tres especies estudiadas.
- ✓ Realizar extractos hidroalcohólicos de las plantas amazónicas *Piper aduncum* L., *Bixa orellana* L. y *Carica papaya* L.;
- ✓ Aislar del medio amazónico cuatro hongos patógenos vegetales de interés agronómico;
- ✓ Estudiar la actividad biológica *in vitro* de los extractos vegetales contra hongos fitopatógenos de interés agronómico;
- ✓ De cada extracto determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) es decir la concentración más baja que inhibe el crecimiento del microorganismo después de su incubación.

b. HIPÓTESIS

Los extractos de plantas amazónicas usadas en la tradición local con fines medicinales y en la lucha contra patógenos vegetales tienen actividad biológica *in vitro* contra hongos fitopatógenos propios del medio.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Algunas plantas y sus derivados han mostrado efectos controladores hacia agentes patógenos como por ejemplo ácaros, bacterias, virus, hongos e insectos. Algunas especies de plantas son usadas con fines alimenticios y controladores de plagas en los cultivos, entre ellas se menciona el ajo (*Allium sativum*), el ají (*Capsicum frutescens*), la higuera (*Ricinus communis*) y el Neem (*Azadirachta indica*); algunas de estas plantas son usadas para la elaboración de insecticidas comerciales y en general de productos contra patógenos vegetales. Entre los derivados vegetales que se utilizan mucho en este sentido se encuentran los extractos vegetales. Estos son mezclas de compuestos químicos extraídos desde las plantas mediante el uso de diferentes solventes como el agua, el alcohol, las grasas entre otros. Otros estudios recalcan la importancia de los extractos vegetales como controladores de fitopatógenos. Mencionamos como ejemplo una investigación sobre la actividad de los extractos de *Croton rhamnifolius* var. *caudatus* (Euphorbiaceae) y de *Waltheria* sp. (Sterculiaceae) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que ha demostrado que el extracto está en capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno (Celis et al, 2008).

En la presente tesis se han investigado tres plantas típicas de la Amazonía ecuatoriana: *Bixa orellana* L., *Carica papaya* L. y *Piper aduncum* L. A continuación se da una descripción botánica de las plantas y también de sus características fitoquímicas de acuerdo a la literatura. Las especies vegetales estudiadas en esta tesis de pre-grado, han sido seleccionadas en función de sus antecedentes etnobotánicas y su disponibilidad en el medio amazónico. Las principales características de las plantas,

consideradas por su potencial bioactividad, son resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1 - Actividad biológica de *B. orellana* L., *C. papaya* L. y *P. aduncum* L. de acuerdo a la literatura científica

Nombre científico	Nombre común en Ecuador	Actividad biológica reportada
<i>Bixa orellana</i> L.	Achiote	Antibacteriano (Irobi <i>et al.</i> , 1996)
<i>Carica papaya</i> L.	Papaya	Analgésico y antiparasitario (Ríos, 2007)
<i>Piper aduncum</i> L.	Matico	Antibacteriano, propiedades insecticidas (Guerrini <i>et al.</i> , 2011)

Fuente: Elaboración propia del autor, 2013

2.1 *Bixa orellana* L. (Achiote o Annatto)

La planta *Bixa orellana* L. pertenece a la familia *Bixaceae* y está difundida dentro de las regiones intertropicales de América (Figura 1).

Figura 1 - Inflorescencia de *Bixa orellana* L.



Fuente: commons.wikipedia.org

La planta es reconocida por un amplio rango de cualidades tanto medicinales como alimenticias, cosméticas y decorativas. Cuando los españoles llegaron a América, en el XV siglo, conocieron el enorme patrimonio botánico de esta región y una de las plantas que llamó su atención fue el Achiote. Los nativos

usaban esta planta como un tinte, gracias al elevado contenido de carotenoides. Estos pigmentos se encuentran en la semilla. Muchas poblaciones amazónicas usan el colorante rojo sacado de la semilla fresca también como pintura corporal y facial y para teñir cerámica. Las nacionalidades Shuar, Achuar y Waorani del Ecuador usan el Achiote de esta forma. El Achiote tiene un uso muy difundido en el sector alimenticio, de hecho se utiliza para dar color a los quesos, el pescado, las mantecas, los dulces y en general en los platos típicos preparados en muchos países de Sur y Centro América. Además *B. orellana* L. está retomando su auge a nivel industrial en todo el mundo como colorante natural, debido especialmente a las limitaciones, cada día más restrictivas, que impone la legislación en materia de colorantes. Por cuanto se refiere al Achiote, la Organización Mundial para la Salud ha reconocido que no tiene toxicidad y por lo tanto es un valioso sustituto de los colorantes de síntesis (Lourido & Martínez, 2010).

Adicionalmente el Achiote tiene varios usos medicinales entre los cuales se subrayan el antirreumático, el cicatrizante, el antimicrobiano y el oftálmico (Ríos *et al*, 2007).

En las Filipinas se utiliza la decocción de hojas para curar las quemaduras y las enfermedades de la piel. En Camboya las hojas se utilizan para curar la fiebre, su infusión se aplica como purgante y en el tratamiento de la diarrea. En la India, en la medicina ayurvedica, el Achiote es utilizado como astringente y también en el tratamiento de los problemas hepáticos (Tamil, 2011).

Además estudios de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de *Bixa orellana* L., realizados mediante el ensayo de

difusión en disco, han demostrado que ese tiene actividad antibacteriana específicamente contra las bacterias Gram-positivas. Irobi *et al* (1996) estudió el comportamiento del extracto alcohólico de las hojas de *B. orellana* L. contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. Determinó que la MIC (Mínima Concentración Inhibitoria) del extracto correspondía a 4-16 mg/mL.

Otras investigaciones, realizadas sobre los extractos metanólicos de hojas y semilla han mostrado buenas actividades de inhibición con respecto a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y también con respecto a los hongos patógenos humanos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* (Tamil, 2011).

2.2 *Carica papaya* L. (Papaya)

Caricaceae es una familia pequeña con 33 especies distribuidas en cinco géneros, de los cuales cuatro (*Carica*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Vascasonsellia*) están en América tropical. Ver Figura 2.

Figura 2 - Planta, flores, frutos y semillas de *Carica papaya* L.



Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Carica_papaya

La especie más conocida es la papaya (*Carica papaya* L.), de la cual no se conoce su origen geográfico preciso, pero podría ser del sur de México (Moraos *et al.*, 2006).

Un estudio realizado por Chávez *et al* (2011) menciona que la actividad antifúngica del extracto de *C. papaya*, específicamente de las hojas, demostró ser un inhibidor moderado de *Fusarium spp.* y un inhibidor débil de *Colletotrichum gloeosporioides*. El extracto de la hoja exhibe el espectro de acción más amplio. La concentración del extracto fue 0.625 mg/mL de *Fusarium sp.* y 10 mg/mL de *C. gloeosporioides*, ambos iguales a aproximadamente el 20% de inhibición del crecimiento del micelio, ambos considerados patógenos vegetales de gran impacto en la producción agrícola, debido a las graves enfermedades que ocasionan, la fusariosis y la antracnosis. Otro estudio realizado por Marín *et al* (2008) demuestra que el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente ecológico de la enfermedad

Sigatoka negra del plátano, presenta susceptibilidad a las aplicaciones de extractos naturales de *C. papaya* L.

En Nigeria se han dado investigaciones acerca de la propiedad antimicrobiana de extractos de fruto, semillas y hojas de Papaya. Los extractos de fruto y semillas han registrado una significativa actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella flexneri*. La Mínima Concentración Inhibitoria para las bacterias Gram positivas fue de 0,2 - 0,3 mg/mL (Emeruwa, 1982).

2.3 *Piper aduncum* L. (Matico)

La tercera planta estudiada por la bioactividad de su extracto es el *Piper aduncum* L. (Figura 3).

Figura 3 - Hojas e inflorescencia de *Piper aduncum* L.



Fuente: luirig.altervista.org/schedenam/fnam.php?taxon=Piper+aduncum

Piper aduncum L. también conocida como Matico es un arbusto nativo del Caribe. Dentro de la familia *Piperaceae*, se destacan especies del género *Piper* por su importancia a nivel medicinal y comercial. De hecho cabe destacar que la pimienta, usada en todo el mundo, se obtiene de los frutos aromáticos secos y pulverizados de *Piper nigrum*. Numerosas especies son utilizadas en la medicina tradicional de varios países en el mundo, debido a sus propiedades antisépticas, insecticidas y

antimicrobianas. Las nacionalidades amazónicas usan varias especies del género *Piper* con diferentes finalidades: medicinal (antiinflamatorio, analgésico, antigripal) y ritual. El género *Piper* comprende alrededor de 1000 especies, que se encuentran frecuentemente en la vegetación secundaria de los bosques tropicales de América y Asia. La mayoría de las especies son de rápido crecimiento, algunos *Piper* se emplean en la medicina popular como analgésicos en el tratamiento del dolor, dolor de muela y de heridas. El aceite esencial es un insecticida, molusquicida y antibacteriano, según estudios demuestran que el aceite esencial de *Piper aduncum* tiene capacidad de inhibir por un 70% el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinérea*, a la concentración de 0,5 mg/mL (Guerrini *et al*, 2009).

Un estudio realizado por Celis (2008), demuestra que diferentes partes de plantas pertenecientes a trece familias, entre ellas la familia *Piperaceae*, utilizando diferentes concentraciones de estos extractos bajo condiciones *in vitro* se investigó la actividad antifúngica contra *Mycosphaerella fijiensis*, hongo causante de la sigatoka negra en plátanos y bananos. Como resultado obtuvieron que de 20 extractos investigados, solo de 8 especies entre ellas *Piper hispidum* y *Piper peltatum*; mostraron actividad antifúngica, específicamente en la germinación de esporas como en el desarrollo de colonias de *M. fijiensis*. Esta misma investigación detallaron derivados antifungosos cinnamoyl de las semillas y hojas de *Piper tuberculatum*. La aplicación de extractos vegetales de hojas de *Piper aduncum*, *Thymus vulgaris* y de flores de *Matricaria chamomilla* permite controlar, bajo condiciones *in vitro* y en plántulas, el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloesporoides*, causante de la antracnosis en el tomate de árbol.

2.4 Descripción del Reino Fungi

La disciplina científica que estudia a los hongos se llama micología. Los hongos son microorganismos unicelulares o pluricelulares, con células eucariotas que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes. Los hongos constituyen un Reino a parte de la Naturaleza, el Reino Fungi. Dentro de este Reino se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Los hongos tienen unas características morfológicas y fisiológicas que los distinguen de los seres vivos. Los hongos tienen células eucarióticas, la mayor parte de ellos tiene pared celular que contienen quitina, celulosa o ambas, producen esporas para la reproducción, tiene reproducción sexual o asexual, y existen casos donde se dan ambas formas (Rivera, 1999).

Morfológicamente los hongos se caracterizan por tener un cuerpo vegetativo, llamado micelio y un cuerpo fructífero que produce esporas, las mismas que representan la forma de propagación de estos microorganismos. Adicionalmente a las esporas, los hongos producen conidios que son formas de reproducción asexuada.

La mayoría de los hongos son saprofitos, es decir se alimentan de restos muertos de plantas y animales, mientras otra parte está formada por parásitos obligados, es decir organismos que necesitan del huésped vivo para poder sobrevivir. Los hongos saprófitos se alimentan degradando la materia orgánica mediante la secreción de enzimas y posteriormente absorben los nutrientes generados. Los hongos son causantes de la putrefacción y descomposición de toda materia orgánica, por ende su papel en el ecosistema es muy relevante ya que de ellos dependen los ciclos de los elementos químicos. Algunos hongos son parásitos de organismos vivos y causan graves

enfermedades en plantas y animales. En el sector de la producción agrícola cada año se registran graves pérdidas de materia prima agrícola debido a las enfermedades de origen fúngico. Los hongos fitopatógenos son objeto de numerosos estudios de investigación, a fin de encontrar formas para poder controlarlos (Agrios, 2008).

Los hongos fitopatógenos son un grupo de hongos que atacan a las plantas en diferentes estados vegetativos y provocan enfermedades. Hoy en día se conocen aproximadamente 8000 especies de hongo fitopatógenos, de hecho cabe destacar que toda planta es atacada, por lo menos una vez en la vida, por un hongo y a su vez los fitopatógenos pueden atacar uno o más tipos de plantas. El ciclo biológico de los hongos fitopatógenos se da parcialmente dentro de la planta huésped y parcialmente en el suelo y/o en restos muertos vegetales. Cuando las condiciones ambientales y del huésped son adecuadas, el hongo se insidia en la planta dando origen al proceso patológico.

2.4.1 Descripción morfológica de los hongos fitopatógenos estudiados

En esta tesis de pregrado se estudiará el efecto inhibitor de extractos de plantas amazónicas sobre cuatro hongos fitopatógenos de amplia difusión: *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp.

- ***Sclerotium***

El género *Sclerotium* es un género de hongo que provoca la pudrición de la raíz y del tallo en muchas plantas (Figura 4). Es un hongo imperfecto y su forma sexuada pertenece al género *Aethalia*.

Su clasificación taxonómica es:

Clase: Agonomycetes
Orden: Agonomycetales
Género: *Sclerotium*

Figura 4 - Pudrición de la raíz causada por el hongo *Sclerotium* sp. (Izquierda). Crecimiento *in vitro* de *Sclerotium* sp. (Derecha)

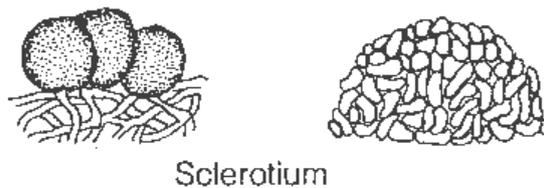


Fuente: Elaboración propia del autor, 2013.

El hongo *Sclerotium* sp. produce enfermedades de ahogamiento de plantas, canchros del tallo y pudriciones de la raíz. También ataca en la post-cosecha provocando pudriciones; este hongo se desarrolla especialmente en climas cálidos. Las enfermedades causadas por este hongo afectan a hortalizas, flores, plantas para forraje y malezas. La infección provocada por *Sclerotium* sp. empieza con una lesión café oscuro que aparece sobre el tallo suculento y debajo de la superficie del suelo; los síntomas que se observan son amarillamiento o marchitez de las hojas inferiores. Con el paso del tiempo los síntomas avanzan a las hojas de la parte superior de la planta. A medida que el tiempo transcurre y en condiciones de elevada humedad, el hongo se propaga con mayor rapidez hacia las raíces de la planta destruyendo el sistema radical. El micelio de la parte infectada, crece sobre el suelo hasta las plantas vecinas produciendo

nuevas infecciones. El hongo *Sclerotium* sp. infecta bulbos o raíces carnosas, donde produce una pudrición aguanosa; sobre los tejidos infectados, el hongo produce numerosos esclerocios pequeños de tamaño uniforme que son redondos o irregulares y blancos cuando inmaduros, pero de color café oscuro y negro cuando llegan a su madurez (Figura 5).

Figura 5 - Esclerocios redondos (Izquierda) o irregulares (derecha)



Fuente: Agrios, 2008

El hongo *Sclerotium* sp. se disemina a través del agua, del suelo infectado, mediante herramientas contaminadas, plántulas infectadas y en forma de esclerocios mezclados con semillas.

El hongo de género *Sclerotium* ataca directamente los tejidos, produciendo una masa de micelio, además mata y desintegra dichos tejidos al secretar ácido oxálico, así como también enzimas pectinolíticas, celulolíticas y otras enzimas antes de que penetre al hospedante. Una vez que el hongo se establece en la planta forma micelio y esclerocios con gran rapidez, especialmente cuando hay suficiente humedad y temperatura alta. Controlar al hongo *Sclerotium* sp. es difícil; algunas medidas que se toman son la rotación de cultivos, el barbecho profundo de la tierra, enterramiento de los esclerocios del hongo con los restos vegetales, etc. (Agrios, 2008).

- ***Sclerotinia***

Es un hongo imperfecto que pertenece a la familia de *Sclerotiniaceae*; provoca la pudrición de la raíz y de los tallos.

Clasificación taxonómica:

Clase: Discomycetes

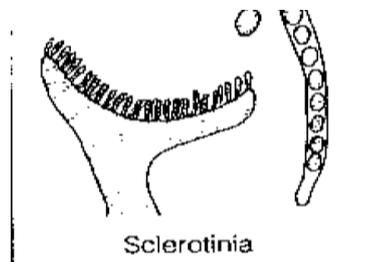
Orden: Helotiales

Género: *Sclerotinia*

El hongo *Sclerotinia* sp. causa las pudriciones de la corona y los tizones de casi todos los tipos de plantas suculentas, principalmente florales y hortalizas, así como la pudrición de la corona y raíz de los pastos, una enfermedad conocida como mancha de dólar. Los síntomas que produce *Sclerotinia* sp. varían un poco con el hospedante o la parte afectada de él y las condiciones del medio ambiente. Las plantas más afectadas por este género son las leguminosas (fréjol, maní, haba) así como también algunas solanáceas (papa, tomate, berenjena), etc.

El síntoma primario más característico y evidente de las enfermedades provocadas por *Sclerotinia* sp. es la aparición, sobre la planta infectada, de un micelio vellosito y blanco en el que en poco tiempo se desarrollan grandes estructuras compactas de resistencia, llamados esclerocios.

Figura 6– Forma de Asco de *Sclerotinia* sp. con ascosporas



Fuente: Agrios, 2008.

Los esclerocios son estructuras de conservación de algunos hongos y están constituidos por una masa de hifas protegidas por una pared de melanina. La forma de los esclerocios puede ser redonda, alargada, irregular y la coloración varía de marrón a negra. Los esclerocios son de color blanco en una fase inicial, pero más tarde se ennegrecen y endurecen superficialmente. Su diámetro puede ser de 0,5 a 1 mm (Agrios, 2008).

En las primeras etapas de desarrollo, el follaje muestra muy pocos signos del ataque del hongo, hasta que el hongo se desarrolla totalmente sobre el tallo y lo pudre. El follaje localizado arriba de la lesión se marchita y muere. En algunos casos la infección se inicia sobre una hoja y avanza después hacia el tallo. Las hojas de las plantas como la lechuga, el apio y la remolacha se colapsan y mueren rápidamente a medida que el hongo infecta las bases del tallo y las hojas inferiores.

En órganos vegetales carnosos como las raíces, *Sclerotinia* desarrolla una masa fungosa algodonosa y blanca sobre la superficie. Los tejidos invadidos aparecen más negros que los sanos y se vuelven blandos (Figura 7).

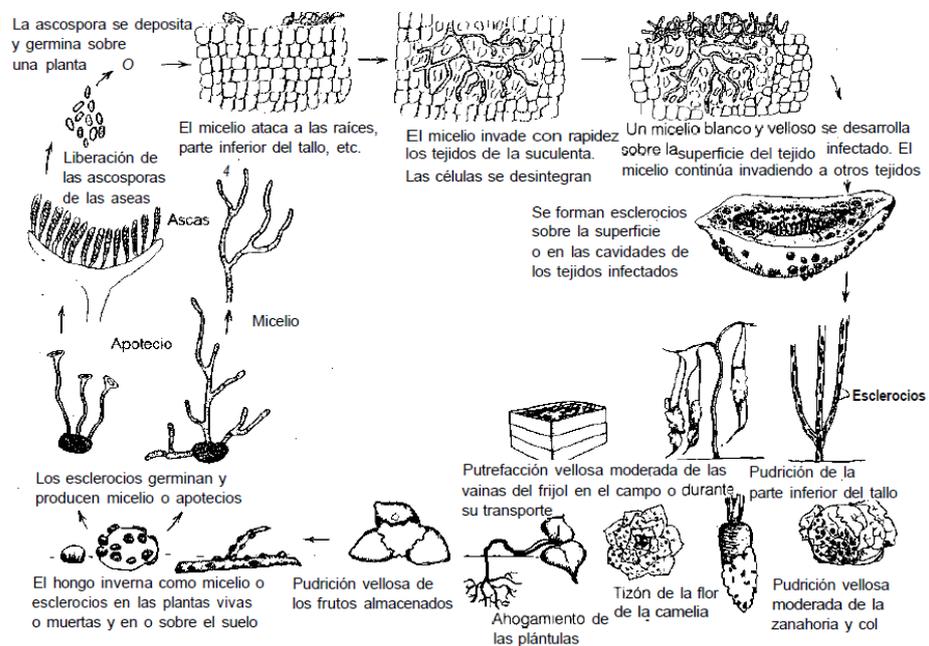
Figura 7 - *Sclerotinia sclerotiorum* en zanahoria (Izquierda). Crecimiento *In vitro* de *Sclerotinia* sp. (Derecha)



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013

También los frutos carnosos (pepino, calabaza, berenjena, etc.) y las vainas de las leguminosas son atacados por *Sclerotinia*. El hongo produce una pudrición húmeda que se extiende desde la punta del fruto hasta el resto del órgano, el cual se pudre y se degrada por completo. El micelio blanco del hongo y sus esclerocios negros se observan a menudo sobre la superficie y el interior de las vainas de frutos afectados (Figura 8) (Agris, 2008).

Figura 8 – Desarrollo y síntomas de las enfermedades de hortalizas y flores producidas por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*



Fuente: Agris, 2008.

- **Alternaria**

Dentro de los hongos imperfectos se encuentra el género *Alternaria*; este género consta aproximadamente de 50 especies entre fitoparásitas o saprófitas. El género *Alternaria*, además de vegetales, es capaz de colonizar y degradar numerosos otros sustratos como papel, cuero, pinturas o alimentos.

Su taxonomía es la siguiente:

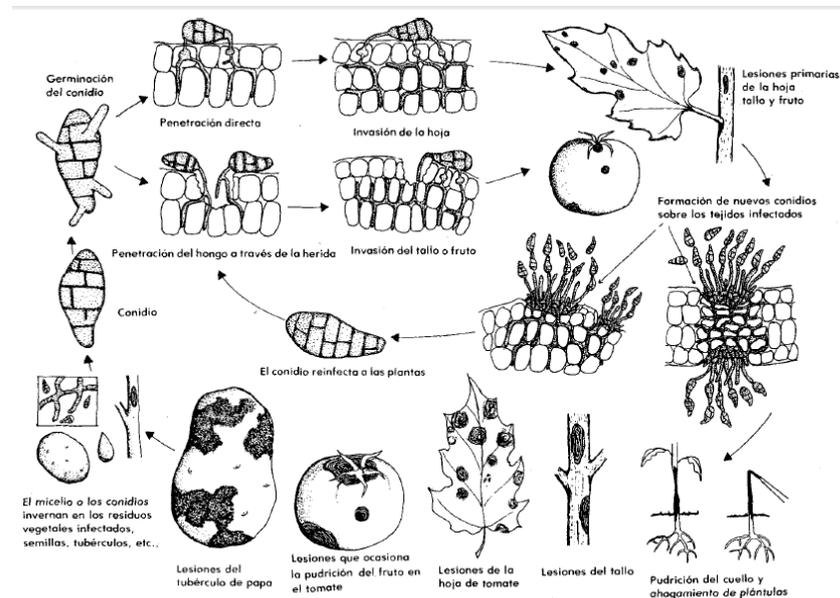
Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Género: *Alternaria*

Las enfermedades causadas por *Alternaria* sp. tienen como síntomas manchas y tizones foliares y también pueden dar origen el ahogamiento de las plántulas. En las hojas se presentan pequeñas manchas de color café rodeadas por un halo amarillo. De hecho este hongo ataca principalmente el follaje de las plantas anuales y/o perennes mediante conidios que se forman en hifas libres individuales o agrupadas; en las zonas infectadas se producen conidios, los cuales son diseminados por el viento, la lluvia, el agua y los insectos (Figura 25) (Agrios, 2008).

Figura 9 - Desarrollo y síntomas de las enfermedades producidas por *Alternaria* sp.



Fuente: Agrios, 2008.

- ***Fusarium***

Fusarium sp. es un hongo Deuteromicete (imperfecto), patógeno, que provoca el marchitamiento de los vasos vasculares (Agrios, 2008).

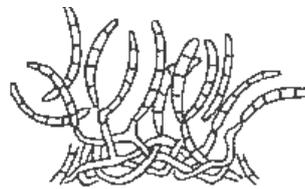
Su caracterización taxonómica es la siguiente:

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Género: *Fusarium* sp.

Figura 10 - Conidios del género *Fusarium* sp.

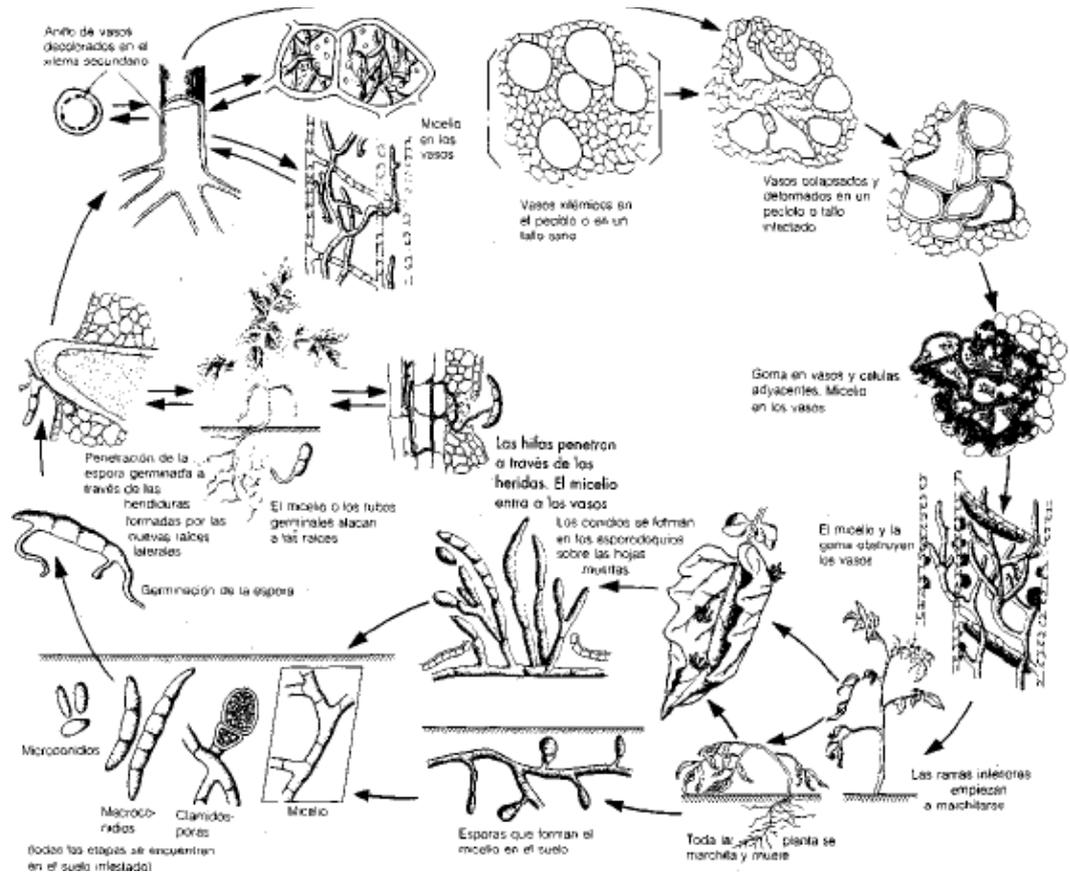


Fusarium

Fuente: Agrios, 2008.

Los marchitamientos vasculares son enfermedades que se encuentran ampliamente distribuidas y son muy destructivas. Estas se manifiestan en un marchitamiento, empardecimiento y muerte de hojas en vástagos suculentos de algunas plantas. El hongo ataca a los tejidos xilemáticos de las plantas. Las plantas herbáceas mueren después de poco tiempo de la infección mientras las plantas perennes pueden vivir algunos años. Los síntomas de la enfermedad son amarillamiento parcial de las hojas, enanismo y disminución en el crecimiento de la planta, hasta alcanzar un marchitamiento generalizado (Agrios, 2008). Un ejemplo de ciclo patológico de *Fusarium* sp, se muestra en la Figura 11.

Figura 11 - Ciclo patológico de la marchitez del tomate ocasionado por *Fusarium oxysporum f. lycopersici*



Fuente: Agrios, 2008.

El patógeno continúa desarrollándose y propagándose internamente en forma de micelio o conidios a través de los vasos xilémicos hasta que muere toda la planta.

Este tipo de hongo se caracteriza por producir colonias de crecimientos rápido. Su micelio es generalmente aéreo, abundante, algodonoso y con coloración variable de blanco a rosado durazno (Figura 12) (Agrios, 2008).

3.3. Materiales y equipos

A continuación se describen los materiales y equipos utilizados referentes a cada objetivo específico anteriormente definido:

3.3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1 (Montar especímenes botánicos para el Herbario ECUAMZ de las tres especies estudiadas.): tres muestras de cada planta seleccionada fueron secadas y etiquetadas para la respectiva identificación y conservadas en el Herbario de la UEA (CIPCA). El secado necesitó de papel periódico, cartulinas, tablas de madera y secadora;

3.3.2 OBJETIVO ESPECIFICO 2 (Obtener extractos hidroalcoholicos de las plantas amazónicas seleccionadas): los extractos hidroalcoholicos se realizaron utilizando: menstruo formado por alcohol etílico y agua destilada, percoladores de acero, vasos de precipitación, filtros de papel, rotovapor;

3.3.3 OBJETIVO ESPECIFICO 3 (Aislar del medio amazónico tres patógenos vegetales de interés agronómico): los patógenos vegetales se aislaron de plantas/frutos de interés agronómico. La técnica consistió en tomar muestras de microorganismo mediante el uso de un asa estéril y repicarlo en medio agarizado en cajas Petri. El material necesario fue: material de vidrio (cajas Petri, tubos de ensayo, botellas microbiológicas, Erlenmeyer, vasos precipitación), insumos (PDA, Parafilm, agua destilada). Los equipos necesarios han sido: microscopio, autoclave, incubadora, cabina de flujo laminar, refrigerador;

3.3.4 OBJETIVO ESPECÍFICO 4 (Estudiar la actividad biológica *in vitro* de los extractos vegetales contra hongos fitopatógenos de interés agronómico): la bioactividad *in vitro* de los extractos se realizó inoculando los fitopatógenos en medio agarizado por lo cual se utilizó el material entre paréntesis (cajas Petri, tubos, botellas microbiológicas, Erlenmeyer, vasos precipitación, PDA, Parafilm, agua destilada). Los equipos necesarios fueron: autoclave, cámara de flujo laminar, refrigerador;

3.3.5 OBJETIVO ESPECÍFICO 5 (De cada extracto determinar la concentración mínima inhibitoria-MIC): la MIC se determinó analizando el efecto de diferentes concentraciones del extracto vegetal sobre el crecimiento del hongo, por lo cual se utilizó el mismo extracto.

3.4. Factores de Estudio

Los factores de estudio fueron (i) la propiedad antifúngica de cada extracto de planta amazónica y, en caso de existencia de dicha propiedad, (ii) la cuantificación de la mínima concentración de extracto que inhibe el crecimiento de los fitopatógenos considerados.

3.5. Diseño experimental

Las pruebas de actividad antifúngica de los extractos vegetales sobre los cuatro hongos fitopatógenos se evaluaron por cada uno de los tres extractos, a tres concentraciones diferentes más el control, en un diseño completamente al azar (DCA). Por cada tratamiento se ha calculado el valor promedio del diámetro de la colonia fúngica, por cada repetición, y la desviación estándar.

3.6. Mediciones experimentales

Las variables consideradas en la investigación se midieron de la siguiente manera:

- Propiedad antifúngica: presencia/ausencia de la propiedad antifúngica;
- Mínima Concentración Inhibitoria (MIC): concentración de extracto que inhibe el crecimiento del patógeno, expresada en mg/mL.

3.7. Manejo del experimento

Los experimentos realizados en la presente tesis constaron de 5 fases sucesivas correspondientes a los 5 objetivos específicos.

A continuación se describe como han sido manejados los experimentos.

3.7.1 Recolección e identificación taxonómica de las plantas investigadas

La selección de las plantas objeto de estudio se realizó analizando literatura etnobotánica y científica sobre aquellas usadas en la medicina tradicional y en la lucha contra los patógenos vegetales. Las plantas seleccionadas fueron: *Piper aduncum* L., *Carica papaya* L. y *Bixa orellana* L.

- ***Bixa orellana* L.**

La planta *Bixa orellana* L. (Figura 14) pertenece a la familia Bixaceae y es una especie arborescente de las regiones intertropicales de América, cultivada en varios países entre ellos Ecuador, donde se la conoce como Achiote. La planta adulta puede medir entre 6 y 20 metros de altura y el promedio de la edad de vida es de 50 años aproximadamente.

Figura 14 - Planta de *Bixa orellana* (Achiote) con su inflorescencia y hojas secas



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Las flores del Achiote son de color blanco o rosado-blanco. Las semillas tienen un tamaño aproximado de 5 mm y son de color rojizo-naranja y se desarrollan dentro de una cápsula dehiscente espinosa; dentro de cada cápsula crecen aproximadamente 50 semillas. Dependiendo del color de las flores, la vaina es verde o rojo. Las semillas tienen el mismo color (Lorence, 2012).

- ***Carica papaya* L.**

Carica papaya L. es una planta arbórea, pertenece a la familia *Caricaceae*, posee un crecimiento rápido que puede alcanzar los 10 m de altura y una vida promedio entre 15 y 30 años (Figura 15).

Figura 15 - Planta, flores, frutos y semillas de *Carica papaya* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

La papaya es una planta dioica por tener los órganos reproductores femenino y masculino en plantas diferentes. De hecho la Papaya tiene plantas femeninas y plantas masculinas (Figura 16). Como cultivo, la papaya se caracteriza por un alto rendimiento y precocidad de algunas variedades, ya que comienza la producción a escala antes del primer año (Chávez, 2011).

Figura 16 - Planta femenina de *C. papaya* L. (A) y planta masculina de *C. papaya* (B)



Fuente: foroantiguo.infojardin.com, 2013.

Tiene hojas palminervias y sus frutos son apreciados en todo el mundo por su sabor y propiedades nutritivas; su peso varía, puede pesar entre 100 g y 10 kg; su forma es redonda-ovalada hasta oblonga, el color de su pulpa es blanco amarillento, amarillo profundo, anaranjado o amarillo rojizo (Augstburger *et al.*, 2000).

- ***Piper aduncum* L.**

Dentro de la familia *Piperaceae*, se destacan especies del género *Piper* por su importancia a nivel medicinal y comercial. (Figura 17).

Figura 17 – Hojas e inflorescencia de *Piper aduncum* L. (Matico)



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Las características botánicas de *Piper aduncum* L. son una altura aproximada de 4 m, tallo de color verde, nudos hincados. Las hojas poseen peciolo corto y su lámina es ovada, mide aproximadamente 15 x 9 cm, la inflorescencia es erecta y mide aproximadamente 4 mm de grosor y 12 cm de largo, es curvada y de color blanco (Mejía y Renjifo, 2000). Sus semillas son de color marrón a negro, miden aproximadamente de 0,7 a 1,25 mm de largo (Starr, 2003).

Los extractos se realizaron con las tres plantas seleccionadas. Las plantas fueron recolectadas del jardín botánico de la UEA ubicado en el campus Puyo. Muestras de las mismas se recogieron para preparar los especímenes botánicos para el Herbario ECUAMZ de la UEA.

3.7.2 Especímenes para el Herbario ECUAMZ

La obtención de los especímenes para el herbario se realizó de acuerdo a la metodología para colecciones de plantas vasculares, desde la colecta en el campo hasta el montaje de los especímenes de las tres especies en estudio.

Para obtener una muestra botánica representativa es importante realizar una correcta recolección de las muestras de plantas. Se necesitó podadora de mano, fundas, cámara fotográfica, cuaderno de campo, lápiz HB y GPS.

Las muestras botánicas recolectadas deben tener esencialmente órganos vegetativos (ramas con hojas) y órganos reproductivos (flores y frutos) y solo el achiote se pudo recolectar con el fruto. El tamaño del espécimen no debe exceder las dimensiones de la cartulina de montaje, es decir 40 x 30 cm.

De cada individuo de cada especie se tomaron tres muestras o duplicados, los ejemplares se colocaron dentro de papel periódico cuidando que se observe haz y envés de las hojas. A Cada ejemplar se le asignó un número botánico o de colección de la autora, colocado en la parte inferior derecha. Los datos de campo se anotaron en el cuaderno o libreta de campo, donde se registraron datos importantes de localidad (país, la provincia, el cantón, coordenadas de GPS, Coordenadas, Altitud, Tipo de bosque, fecha, colectores) y de la planta viva, preferentemente de aquellas características que no se aprecian cuando la muestra está seca. Se describió también el hábitat donde se encontró el vegetal, el tipo de suelo y las asociaciones con otras especies. Los datos importantes a resaltar en cuanto a las características de la planta es la condición en que se encuentra el espécimen como su hábito, forma de crecimiento, tamaño del vegetal, posición de los órganos y otras estructuras de interés

taxonómico como el color, la textura, el olor y el sabor, dificultad para quebrar ramas y dureza de corteza. Se anota todos los datos que describan las estructuras de la planta como raíz, tallo, flores y frutos.

La primera fase para obtener un espécimen botánico es la recolección de una muestra de la planta estudiada.

Por cada planta objeto de estudio se recolectó una muestra formada por una porción de tallo y una muestra de la flor, cuando presente. Las hojas se dispusieron de forma tal que se evidencie su haz y envés; las hojas en exceso fueron eliminadas cortándolas a nivel del pecíolo, a fin de dejar evidencia de la posición original de la hoja. En la Figura 18 se puede observar el corte que se realiza en caso de exceso de hojas.

Figura 18 - Disposición de las hojas de una muestra de planta sobre una cartulina de herbario. Las hojas excedentes se cortan dejando el pecíolo visible (Missouri Botanical Garden, sf)



Fuente: Agrios, 2008.

Este proceso tiene como fin mostrar las características botánicas de la planta.

Para poder montar los especímenes botánicos de las plantas estudiadas fue necesario previamente prensarlas y secarlas. El proceso de prensado de las muestras frescas se realizó mediante la utilización de una prensa manual constituida por dos tablas de madera de 40 X 30 cm, que forman respectivamente la base y la tapa de la prensa (Figura 19).

Figura 19 – Prensa manual para secado de muestras botánicas



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

El orden de posicionamiento de las diferentes piezas, a partir de la base, fue: tabla de madera, cartón, cartón secante, lámina de aluminio, cartón secante, muestra vegetal en papel periódico numerado, cartón secante, lámina de aluminio, tabla o prensa de madera. Sucesivamente la pila de muestras fue prensada utilizando una correa especial, puesta alrededor de la prensa y ajustada lo suficiente para prensar las muestras sin dañarlas (Figura 19).

Luego, previa exposición a los rayos solares, se colocó en el secador a una temperatura entre 60°C y 70°C por un tiempo variable entre 18 y 24 horas.

Una vez que el espécimen estuvo completamente seco se colocó en una cartulina especial para herbarios, libre de ácido (43 X 32 cm, 300 g) y se hizo adherir con goma y cinta engomada (Figura 20).

Figura 20 – A) muestra seca de *C. papaya* L. B y C) Montaje de especímenes *Bixa orellana* L., D) pesas para fijar la muestra



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Luego de realizar el montaje de los especímenes en las cartulinas, se dispusieron unas pesas que permitieron al espécimen adherirse a la cartulina. Este proceso duró 3 días. Una vez secos los especímenes, se realizó el pegado de estructuras sueltas como partes sin pegamento, etc. Seguidamente con el uso de hilo dental blanco y aguja se realizó el cocido de algunas partes de la muestra, específicamente de la rama principal o estructuras vegetales gruesas, con el fin de que la muestra no se mueva de la cartulina (Figura 21).

Figura 21 - Cocido del espécimen en la cartulina



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Cada espécimen botánico se acompañó de una etiqueta, cuyo fin es identificar taxonómicamente a la planta e indicar todos los datos importantes referentes a la planta misma.

Para la elaboración de las etiquetas, se utilizó la información anotada en el cuaderno de campo. Siguiendo un modelo de etiquetado del Herbario ECUAMZ, y se realizó una etiqueta por cada duplicado o repetición de las tres especies objeto de estudio. La etiqueta contiene los siguientes datos: nombre del Taxón, país, provincia, localidad, elevación, coordenadas, colector, número de colección, fecha, condición de especímenes, tipo de bosque, tipo de suelo, información del espécimen, número de duplicados y familia. Un ejemplo se observa en la Figura 22.

Figura 22 – Etiqueta de *Carica papaya* L. (Papaya) para catalogación

ECUADOR

CARICACEAE

Carica papaya L.

Det. Jemberly Cuvi, 2012

Pastaza: Puyo Cantón

Sendero Eco turístico del Jardín Botánico Amazónico de la Universidad Estatal Amazónica. Bosque Pluvial Premontado. Suelos de orden Inceptisoles, suborden Andepts y gran grupo Hydrandept, no posee materiales sulfídicos, bajas cantidades de arcilla (8%). Especie colectada en el Km 2^{da} vía al Tena, aproximadamente a 1 km del ingreso principal de la Universidad.

1°27'8.25"S 77° 59.713'W 963 msnm

Especie arbórea, altura 3 m y 30 cm de dap. Planta masculina. Tallo de color café y verde, corteza lisa, nudos de 3 mm de alto cada 3 cm. Sus hojas son palmíticas lobadas, con 7 nervaduras principales. Su inflorescencia es en corimbo.

26 Febrero 2013

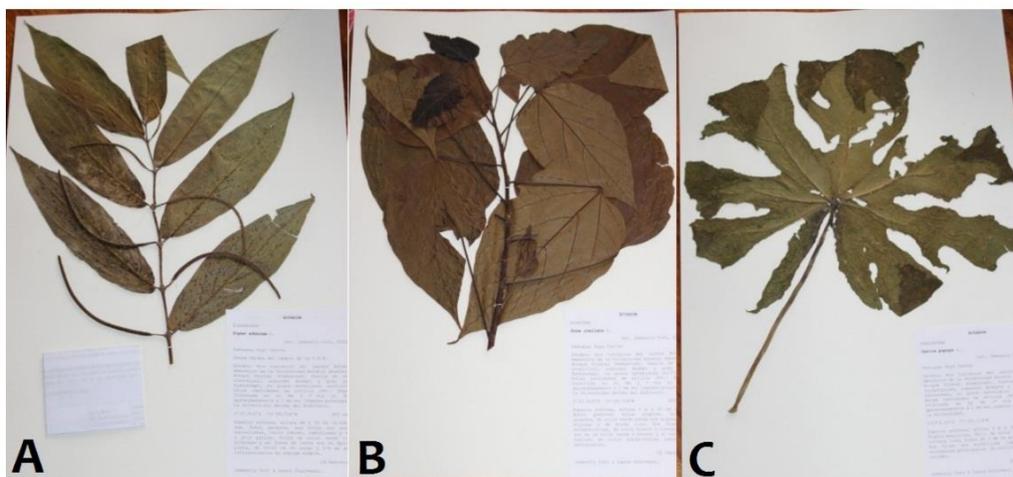
Jemberly Cuvi & Laura Scalvenzi 01

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
HERBARIO AMAZÓNICO DEL ECUADOR (ECUAMZ)

Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Los especímenes botánicos forman parte del Herbario ECUAMZ de la UEA (Figura 23).

Figura 23 – Especímenes botánicos montados: A) *P. aduncum* L. B) *B. orellana* L. C) *C. papaya* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

3.7.3 Obtención de extractos vegetales

La recolección de las hojas de Matico, Papaya y Achiote se realizó manualmente con la ayuda de una podadora, en el jardín botánico de la UEA. Se recolectaron hojas de plantas adultas libres de enfermedades. Del Matico se recolectaron 1,5 kg de hojas frescas, de la Papaya 1,4 kg y del Achiote 1,5 Kg. Posteriormente en el laboratorio se lavaron las hojas, se pesaron y se dejaron secar a temperatura ambiente por el lapso de un día, al fin eliminar parte del agua mediante evaporación natural.

Posteriormente las hojas se secaron en la estufa a una temperatura de 40°C, por el lapso de 2 semanas. De esta forma se obtuvo la droga seca que luego se procedió a triturar manualmente hasta alcanzar partículas de tamaño de 2 – 3 mm.

Los extractos vegetales se realizaron mediante el método de la percolación, que consiste en el paso lento de un disolvente a través de una droga seca, con la finalidad de separar ciertos componentes químicos presentes dentro de la droga.

Para obtener los extractos se usaron percoladores de acero inoxidable. El percolador es un aparato de forma cilíndrica, de aproximadamente 60 cm de alto y 20 cm de diámetro, con una abertura en la parte superior, que permite la carga y descarga del material vegetal, y una llave en la parte cónica inferior, para la salida del extracto líquido (Figura 24).

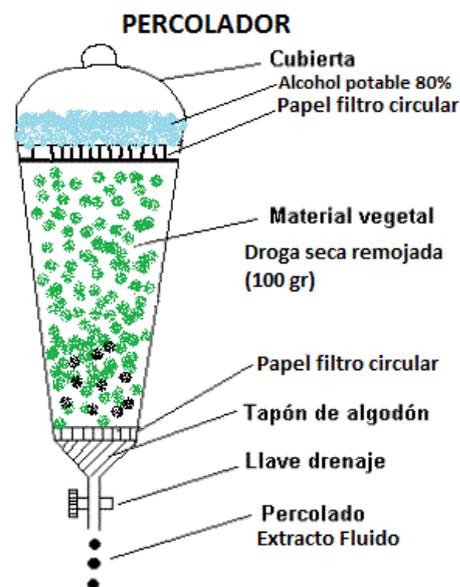
Figura 24 - Percoladores de acero para el proceso de extracción



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

El menstruo utilizado en la percolación, es decir el disolvente, fue una solución hidroalcohólica al 80%. Los extractos fueron obtenidos respetando la proporción 1:5 entre droga y menstruo. La primera fase de la percolación consistió en mojar 100 gr de hojas secas con 100 mL de menstruo por 30 minutos; el proceso de remojo consiste en la hidratación de las células para luego facilitar la extracción de los compuestos por percolación. Terminada la fase de remojo de la droga, se procedió a cargar el percolador colocando los siguientes materiales en el orden indicado: 1) algodón para cubrir el orificio de salida, 2) papel filtro circular, 3) droga seca remojada (100 g), 4) papel filtro circular, 5) alcohol potable al 80% hasta cubrir el papel filtro (Figura 25).

Figura 25 – Corte longitudinal de un percolador



Fuente: Elaboración propia del autor, 2013.

Posteriormente se tapa el percolador y se deja reposar hasta el siguiente día.

Luego de 24 horas se empezó a percolar, abriendo la llave del percolador y dejando caer aproximadamente 3 mL por minuto. Se utilizaron para el estudio de bioactividad los primeros 500 mL. El extracto líquido se colocó en frascos ámbar con tapa rosca. Obtenidos los tres extractos líquidos se procedió a obtener los extractos secos en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito, mediante un rotovapor (Tecnall T-210). El rotovapor es un equipo que permite la evaporación rápida de solventes de una disolución, haciendo que quede el soluto. La evaporación ocurre mediante una destilación a vacío. Cada extracto estuvo en el rotovapor aproximadamente 4 horas a una temperatura de 50°C y un periodo rotativo de 2 (Figura 26).

Figura 26 - Extracto de *Piper aduncum* L. percolador (Izquierda), extracto de *P. aduncum* en el Rotovapor (derecha)



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

El extracto obtenido con el Rotovapor aun contenía agua, lo que impedía tener el extracto seco, indispensable para comenzar con las pruebas *in vitro*; por lo tanto se procedió a colocar en vasos de precipitación el extracto fluido obtenido, con el fin de realizar el proceso de evaporación natural del agua. El extracto se colocó en la estufa a una temperatura de 40°C

aproximadamente una semana, dando como resultado el extracto seco (Figura 27).

Figura 27 - A) Rotovapor con el extracto *B. orellana* L., B) Vasos de precipitación con los extractos fluidos, C) Extracto seco de *B. orellana* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

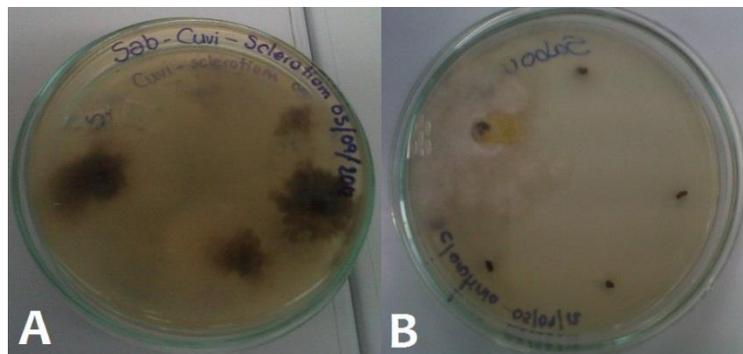
3.7.4 Aislamiento de patógenos vegetales

Las pruebas *in vitro* de actividad antifúngica de los extractos vegetales se realizaron sobre cuatro géneros diferentes de patógenos vegetales: *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp. El aislamiento de hongos se realizó en el laboratorio de Biología de la UEA. Las cepas de los hongos *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp., fueron aisladas de vainas de arveja (*Pisum sativum* L. var. *sativum*) enferma procedente de agricultores de Ambato. El protocolo que seguimos en el aislamiento de hongos fue el de Andreotti, E. 2002-2004. El proceso de aislamiento se realizó bajo condiciones de esterilidad, utilizando una cabina de flujo laminar. Inicialmente se esterilizó el material a utilizarse (cajas Petri, tubos de ensayo, asas, pinzas, etc.) y se limpió el área de trabajo con alcohol.

Las vainas de arveja enferma fueron esterilizadas químicamente en la parte externa, mediante remojo en etanol al 70% por 1

minuto, luego en hipoclorito al 5% por 5 minutos y finalmente en agua destilada para enjuagar, durante 10 minutos. Después de haber esterilizado externamente el material vegetal, se procedió a aislar el patógeno. Con el uso de una aguja se extrajeron pequeñas partículas del hongo (esclerocios). Posteriormente se inoculó el hongo en tubos de ensayo con medio de cultivo sólido PDA. Sucesivamente se realizaron repiques hasta obtener el hongo en cultura pura (Figura 28).

Figura 28 – A) Cultivos puros de *Sclerotium* sp. B) *Sclerotinia* sp. aislados de vainas de arveja enfermas



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Las cepas de los hongos *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp., fueron aisladas respectivamente desde el suelo y desde plantas de col (*Brassica oleraceae*) enfermas, en los laboratorios de Ingeniería en Alimentos de la Universidad del Azuay, en la ciudad de Cuenca.

3.7.7 Actividad biológica *in vitro* de los extractos de *Piper aduncum* L., *Carica papaya* L. y *Bixa orellana* L.

Preparación del material de laboratorio

Para investigar la actividad *in vitro* de los extractos vegetales se preparan los materiales de laboratorio y los medios de cultivo necesarios. El material de vidrio utilizado correspondió a cajas Petri, varillas de vidrio, botellas de microbiología, Erlenmeyer, vasos de precipitación de 500 mL y tubos de ensayo. Estos materiales han sido esterilizados mediante calor seco usando una estufa (BINDER) a una temperatura de 180°C por el lapso de 2 horas.

Adicionalmente se preparó el medio de cultivo para hongos Sabouraud Dextrose Agar w/Chloramphenicol, agregándole 65 gr por 1000 mL de agua y se aplicó el método de esterilización con calor húmedo mediante el uso de un autoclave (SHENAN SA modelo LDZX- 50FDS) a una temperatura de 121°C para 20 min.

Además se realizó la limpieza de la cabina laminar (BIOMEDIS) con alcohol potable al 80% con el fin de evitar al máximo la contaminación.

Evaluación de la actividad biológica de los extractos

La evaluación de la inhibición de cada extracto, contra los hongos fitopatógenos, se realizó por medio de la medición del diámetro de crecimiento de la colonia del hongo, crecido en contacto con el extracto a estudiar.

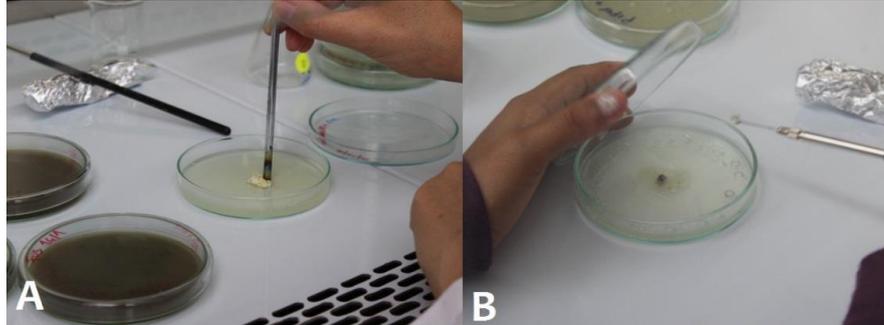
Para determinar la actividad antifúngica de cada extracto, se colocaron diferentes concentraciones del mismo dentro del medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar (with Chloramphenicol), cuando todavía estaba en estado líquido el

medio de cultivo, después de haber sido sacado de la autoclave, se dejó enfriar hasta la temperatura de 45°C y posteriormente se agregó la correspondiente concentración de extracto. De esta forma nos aseguramos que las características fitoquímicas de los extractos no se alterarán por vía de la temperatura del medio de cultivo. A continuación se indican las concentraciones de cada extracto estudiado: *Piper aduncum* L. (0,5 – 1,5 – 3 – 6 mg/mL); *Carica papaya* L. (0,5 – 1,5 – 3 mg/mL) y *Bixa orellana* L. (0,5 – 1,5 – 3 mg/mL). Para la investigación se consideraron las concentraciones mencionadas, tomadas desde otras investigaciones (Irobi *et al.*, 1996).

Con la balanza eléctrica (OHAUS) pesamos la cantidad de extracto a utilizar y la colocamos en el medio de cultivo todavía líquido; la mezcla se realizó con la ayuda de un plato magnético agitador (IKA C-MAG HS 10). Posteriormente se colocó el medio de cultivo en las cajas Petri y se dejó enfriar por 15 minutos; después de este lapso de tiempo el medio de cultivo agarizado se volvió sólido. Luego se etiquetaron las cajas con el nombre del hongo, el extracto, la fecha y las repeticiones (3 repeticiones por hongo, por concentración). Todo el proceso descrito se realizó bajo condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo laminar (BIOMEDIS). Después de haber preparado el material, se procedió a realizar la experimentación. Previamente, se desinfectó la cabina de flujo laminar con alcohol con el fin de reducir la eventual contaminación. Días anteriores a la siembra, los hongos guardados en refrigeración se revitalizaron con el propósito de obtener muestras vitales de los mismos. La inoculación de los hongos fitopatógenos se realizó colocando un disco de agar de 5 mm, con el hongo de interés, sobre el medio de cultivo previamente preparado con la concentración

adecuada de extracto; el proceso se desarrolló en un ambiente aséptico. Se realizó el etiquetado con nombres del hongo, del extracto, fecha. Posteriormente se incubó a 25°C (Figura 29).

Figura 29 – A) Disco del hongo fitopatógeno (5 mm), B) Siembra del hongo en medio de cultivo



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Para la evaluación de la actividad antifúngica del extracto, se midieron los diámetros de las colonias del hongo, por el lapso de 5 días desde la inoculación. Además para las evaluaciones se incluyó un testigo sin tratamiento, o sea sin extracto. La prueba se realizó con 3 repeticiones para obtener datos representativos estadísticamente.

3.8 Análisis económico

En la presente investigación no se realizó el análisis económico, debido a que tratándose de un estudio preliminar *in vitro* no se ha calculado el gasto para una eventual aplicación en el campo.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Este estudio investigativo se realizó con el fin de observar si los extractos hidroalcolicos de las plantas amazónicas *Piper aduncum* L., *Carica papaya* L. y *Bixa orellana* L., tenían actividad antifúngica.

4.1 Secado de plantas para producción de extractos vegetales

Los tres extractos vegetales fueron preparados a partir de hojas secas de las tres especies seleccionadas. En la Tabla 2 se indica el peso fresco de las hojas procesadas, por cada especie y el rendimiento de secado. En los tres casos se puede observar que el contenido en agua de las plantas está aproximadamente entre el 86 y el 90% del peso fresco. El Achiote fue la planta con el menor rendimiento de secado mientras el Matico aquella con el mejor rendimiento.

Después del secado se obtuvieron 251 g de hojas de *Piper aduncum* L., 141 g de hojas de *Carica papaya* L. y 136 g de hojas de *Bixa orellana* L. (Tabla 2).

Tabla 2 - Peso fresco de las hojas procesadas y rendimiento en droga seca de *Piper aduncum* L., *Carica papaya* L. y *Bixa orellana* L.

Especie	Peso fresco (gr)	Peso seco (gr)	Rendimiento de secado
Matico (<i>P. aduncum</i>)	1500	215	14%
Papaya (<i>C. papaya</i>)	1400	141	10%
Achiote (<i>B. orellana</i>)	1500	136	9%

Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

4.2 Producción de extractos vegetales

A partir del material vegetal seco de las tres especies se han obtenido los extractos hidroalcolicos. En la Tabla 3 se indican los

gramos de extracto seco obtenidos al terminar el proceso de extracción, constituido por la percolación y la evaporación mediante rotovapor y estufa (Tabla 3).

Tabla 3 – Peso seco, volumen extracto líquido y peso extracto seco de *Piper aduncum* L., *Carica papaya* L. y *Bixa orellana* L.

Planta	Peso seco droga (gr)	Volumen extracto líquido (ml)	Peso extracto seco (gr)
Matico (<i>P. aduncum</i>)	100	500	5,50
Papaya (<i>C. papaya</i>)	100	500	5,06
Achiote (<i>B. orellana</i>)	100	500	2,56

Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Los extractos secos fueron guardados en frascos ámbar y conservados en refrigeración a 4°C.

4.3 Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales

Los extractos secos de las tres especies objeto de estudio fueron evaluados por su capacidad de inhibir el crecimiento de cuatro hongos fitopatógenos, a tres concentraciones diferentes. Los hongos fitopatógenos considerados fueron: *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp. Las concentraciones de extracto estudiadas variaron desde 0,5 mg/mL hasta 6 mg/mL.

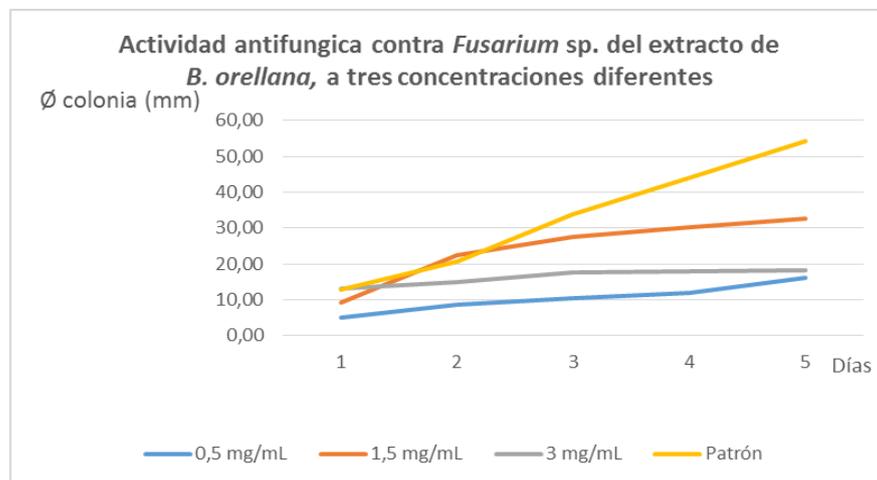
Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de *Bixa orellana* L.

El extracto de *Bixa orellana* L. tiene actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp.; mientras que no ha mostrado actividad antifúngica contra *Alternaria* sp. y *Sclerotinia* sp. Se ha observado un comportamiento extraño en cuanto al crecimiento de estos dos últimos hongos. De hecho, según los datos

registrados, se ha comprobado que las cepas de *Alternaria* sp. y *Sclerotinia* sp. crecen más en el medio de cultivo con extracto de *B. orellana* que en medio sin extracto, es decir en el patrón. Por lo tanto se estima que el extracto de Achiote tenga la propiedad de estimular el crecimiento de las dos cepas.

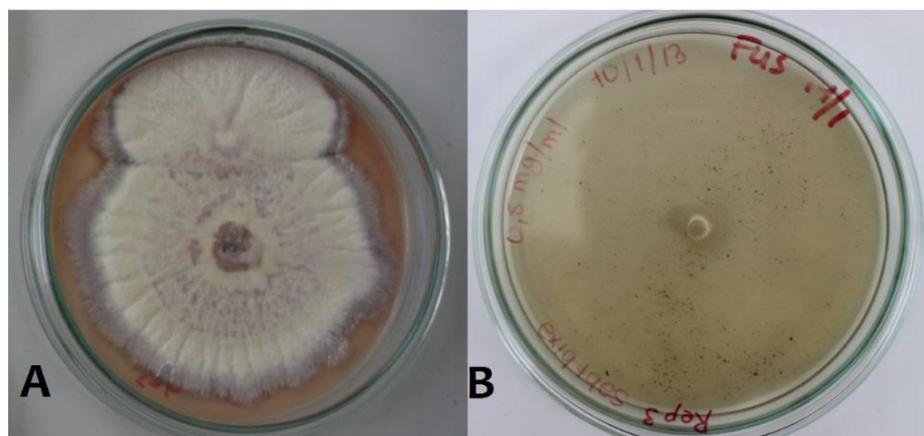
El estudio realizado con el extracto de *Bixa orellana* L. frente al hongo del género *Fusarium*, la concentración de extracto correspondiente a 0,5 mg/mL fue la concentración mínima a la cual se observó inhibición del crecimiento. A dicha concentración el diámetro de la colonia se mantuvo constante, alrededor de 10 mm, durante los cinco días de estudio. A las concentraciones de 1,5 y 3 mg/mL también se nota una inhibición pero inferior al crecimiento registrado con la concentración de 0,5 mg/mL. Esto representa un comportamiento no esperado en cuanto se supone que a concentraciones mayores de extracto corresponda una mayor inhibición (Figura 30 y Figura 31).

Figura 30 - Actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. del extracto de *Bixa orellana* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

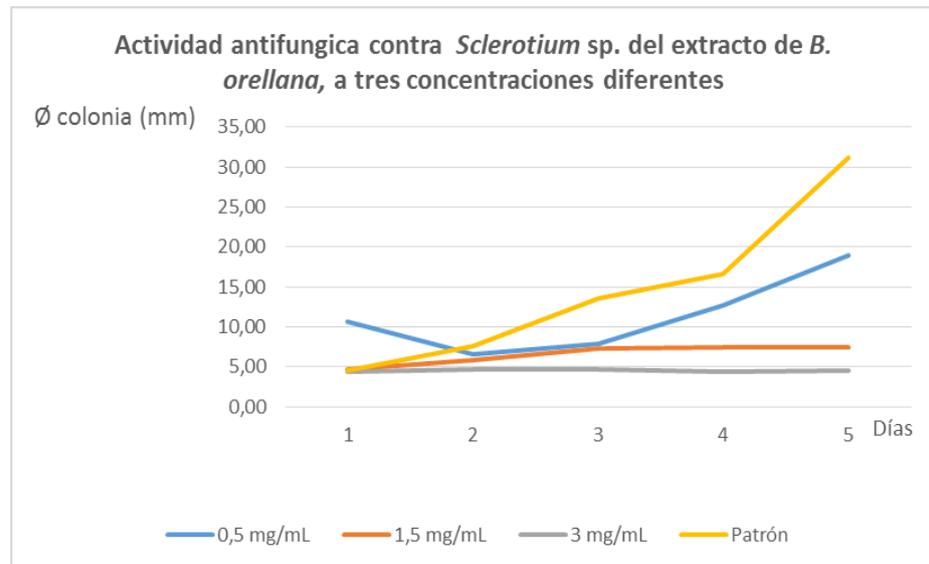
Figura 31 – A) *Fusarium* sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) *Fusarium* sp. en medio de cultivo con extracto de *Bixa orellana* (0,5 mg/mL).



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

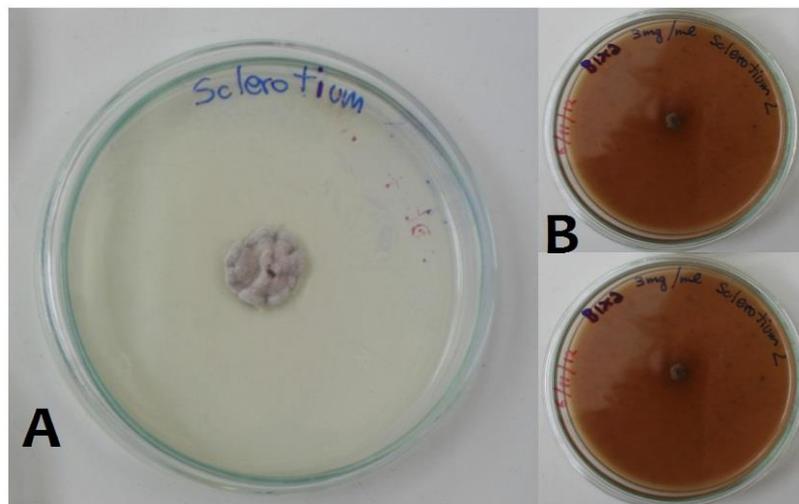
Con respecto al hongo del género *Sclerotium*, la concentración de extracto correspondiente a 3 mg/mL fue la concentración que mejor inhibió el crecimiento del hongo mientras que a las concentraciones de 1,5 y 0,5 mg/mL se registró un crecimiento superior de las colonias. Cabe destacar que no se registró mucha diferencia entre el crecimiento del hongo a las concentraciones de 3 y 1,5 mg/mL del extracto de *Bixa orellana* L. de hecho la diferencia del valor del diámetro de las colonias crecidas a las dos concentraciones es de aproximadamente 2-3 mm (Figura 32 y Figura 33).

Figura 32 - Actividad antifúngica contra *Sclerotium* sp., de extracto de *Bixa orellana* L



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

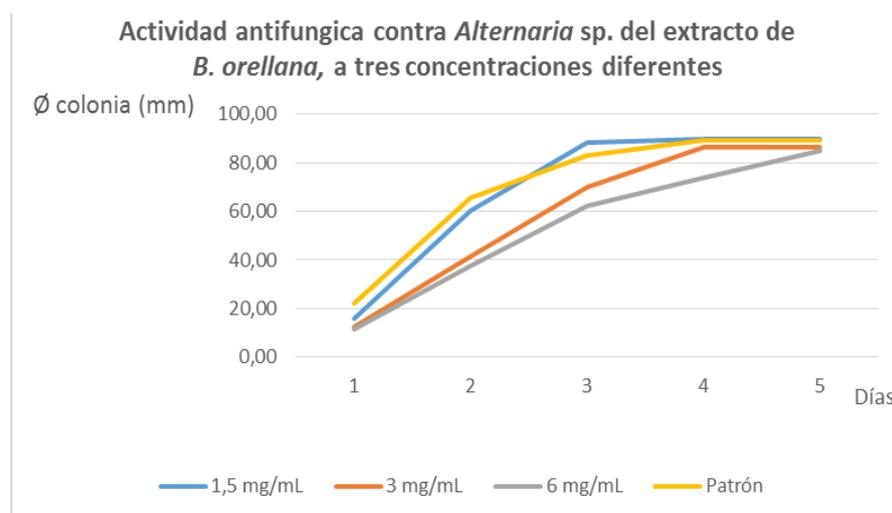
Figura 33 – A) *Sclerotium* sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) *Sclerotium* sp. en medio de cultivo con extracto de *Bixa orellana* (3 mg/mL)



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

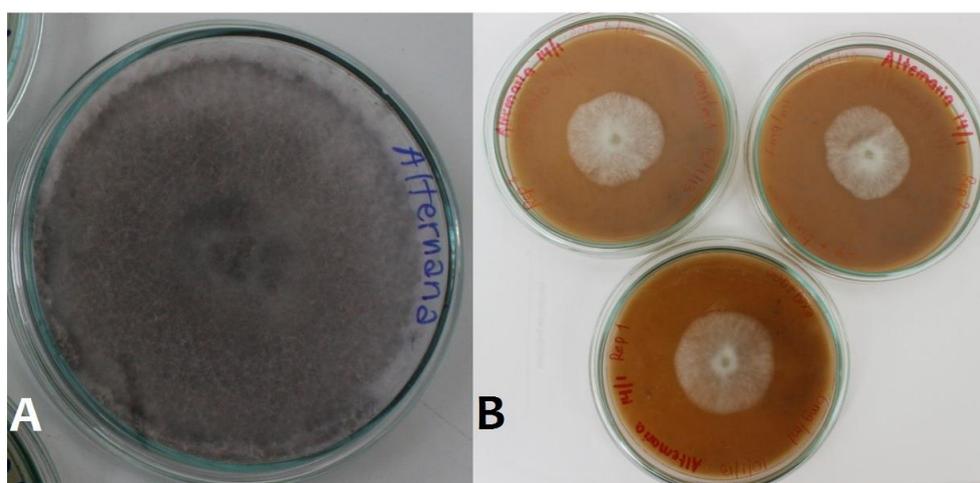
Con respecto al hongo del género *Alternaria* sp. el extracto de *Bixa orellana* L. a la concentración de 6 mg/mL y 3 mg/mL inhibe el crecimiento del hongo, mientras que a la concentración de 1,5 mg/mL se observa un comportamiento parecido al patrón. El patrón tiene valores semejantes a la concentración de 1,5 mg/mL (Figura 34 y Figura 35).

Figura 34 - Actividad antifúngica contra *Alternaria* sp., de extracto de *Bixa orellana* L



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

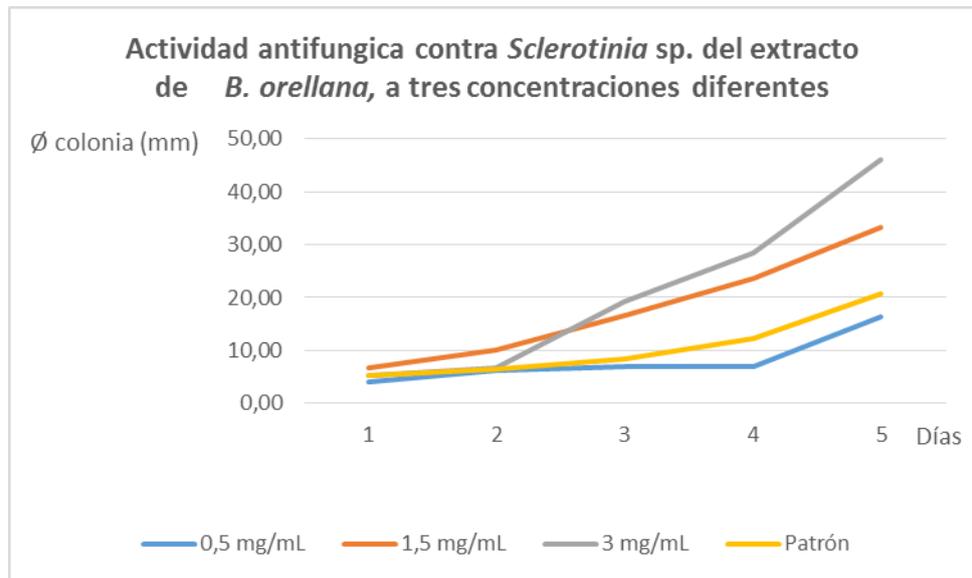
Figura 35 – A) *Alternaria* sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) *Alternaria* sp. en medio de cultivo con extracto de *Bixa orellana* (6 mg/mL).



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

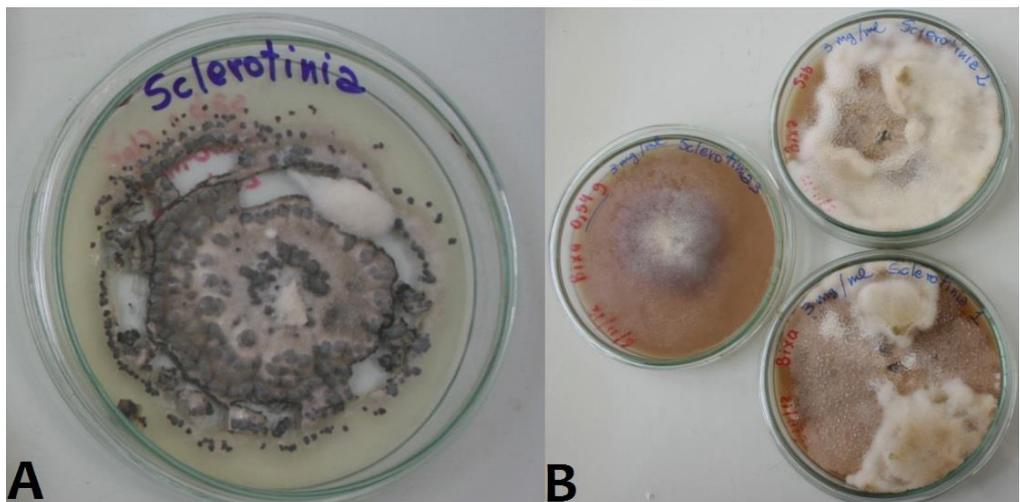
Con respecto al hongo del genero *Sclerotinia* sp. se observó que el extracto de *Bixa orellana* L. a una concentración de 0,5 mg/mL, inhibe el crecimiento, mientras a las concentraciones de 1,5 y 3 mg/mL se registró un aumento del crecimiento con respecto al patrón, indicando un comportamiento no esperado (Figura 36 y Figura 37).

Figura 36 - Actividad antifúngica contra *Sclerotinia* sp., de extracto de *Bixa orellana* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Figura 37 – A) *Sclerotinia* sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) *Sclerotinia* sp. en medio de cultivo con extracto de *Bixa orellana* (3 mg/mL).



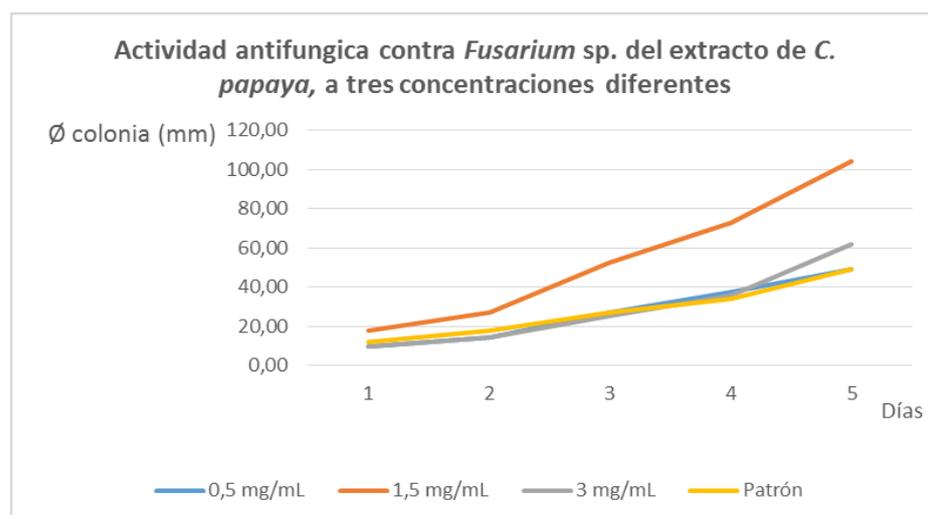
Los datos obtenidos de la presente tesis con los cuatro hongos estudiados *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp. frente al extracto de *Bixa orellana* se asemejan a los alcanzados por Irobi (1996), de acuerdo a los cuales se observa inhibición del crecimiento de *Candida utilis* y *Aspergillus niger* ya desde la concentración de 4 mg/mL. Resultados similares se han obtenido con las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a la concentración de 5 mg/mL. Los resultados de esta tesis han determinado, sin embargo, una MIC inferior a aquella de los estudios de Irobi (1996), correspondiente a 0,5 mg/mL.

Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de *Carica papaya* L.

El extracto de *Carica papaya* L. tiene actividad antifúngica contra *Alternaria* sp. y *Sclerotinia* sp.; mientras que no ha mostrado actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. Se ha observado un comportamiento extraño en cuanto al crecimiento de estos dos últimos hongos. De hecho, según los datos registrados, se ha comprobado que las cepas de *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. crecen más en el medio de cultivo con extracto de *C. papaya* L. que en medio sin extracto, es decir el patrón. Por lo tanto se estima que el extracto de Papaya tenga la propiedad de estimular el crecimiento de las dos cepas.

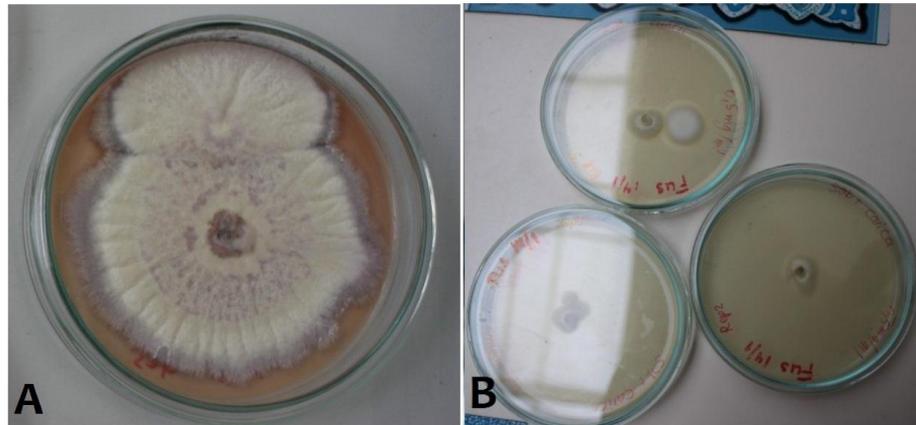
En la presente investigación con respecto al hongo *Fusarium* sp., el extracto de *C. papaya* a las tres concentraciones consideradas no inhibe el crecimiento del hongo. Según datos registrados los primeros 4 días, el crecimiento del hongo es similar al patrón. Por lo contrario la concentración de 1,5 mg/mL ha tenido un comportamiento fuera de lo esperado, de hecho el hongo crece más que el patrón (Figura 38 y Figura 39).

Figura 38 - Actividad antifúngica contra *Fusarium* sp., de extracto de *Carica papaya* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

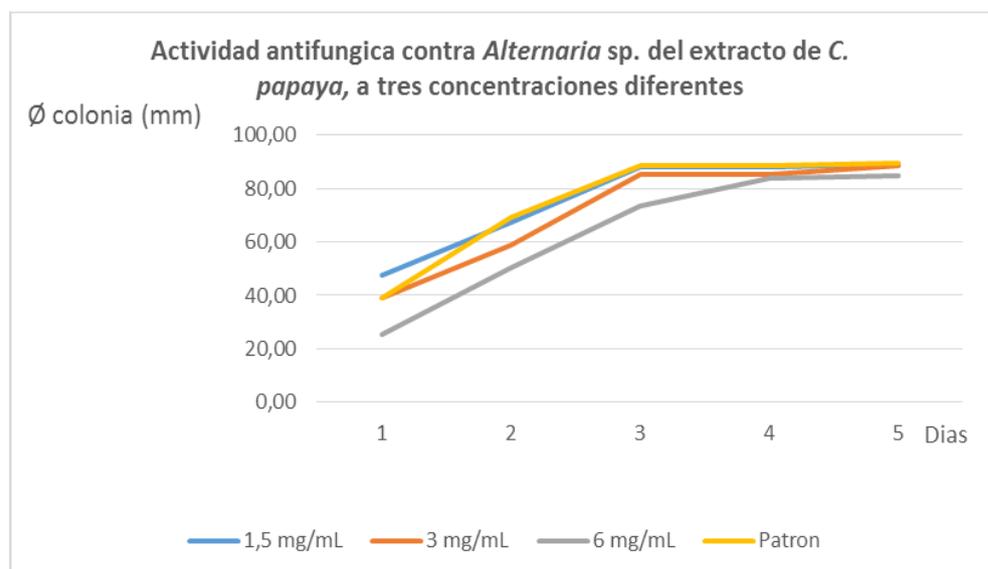
Figura 39 – A) *Fusarium* sp. en medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) *Fusarium* sp. en medio de cultivo con extracto de *Carica papaya* L. (0,5 mg/mL).



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

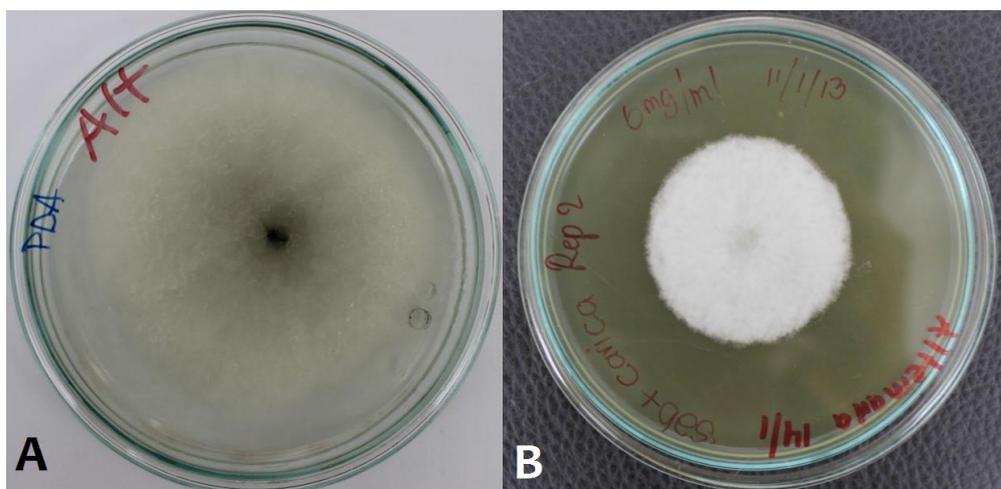
En el caso del hongo *Alternaria* sp. el extracto de *C. papaya* L. ha tenido en general un efecto de inhibición reducido sobre el hongo. De hecho se observa inhibición a la concentración más alta de 6 mg/mL. La concentración de 1,5 mg/mL ha tenido un comportamiento similar al patrón (Figura 40 y Figura 41).

Figura 40 - Actividad antifúngica contra *Alternaria* sp., de extracto de *Carica papaya* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

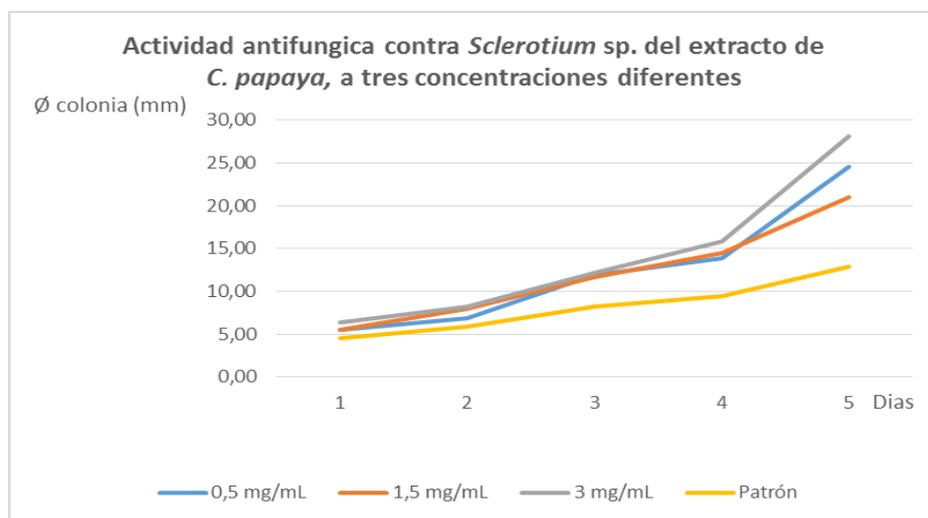
Figura 41 – A) Medio de cultivo sin extracto (Patrón). B) *Alternaria* sp. en medio de cultivo con extracto de *Carica papaya* (6 mg/mL).



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Con respecto al hongo del género *Sclerotium* sp., el extracto de *C. papaya* no inhibió el crecimiento a ninguna concentración, de hecho a concentraciones de 0,5, 1,5 y 3 mg/mL estimuló el crecimiento del hongo (Figura 42).

Figura 42 - Actividad antifúngica contra *Sclerotium* sp., de extracto de *Carica papaya* L

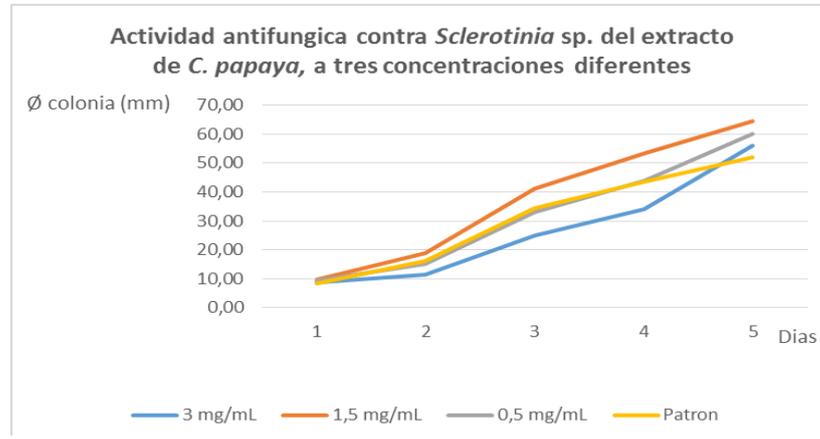


Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Con respecto al hongo *Sclerotinia* sp., el extracto de *Carica papaya* inhibió el crecimiento del hongo a la concentración de 3 mg/mL. Mientras que a la concentración de 1,5 mg/mL estimuló

el crecimiento del hongo, y a una concentración de 0,5 mg/mL se observó un desarrollo semejante al patrón (Figura 43).

Figura 43 - Actividad antifúngica contra *Sclerotinia* sp., de extracto de *Carica papaya* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

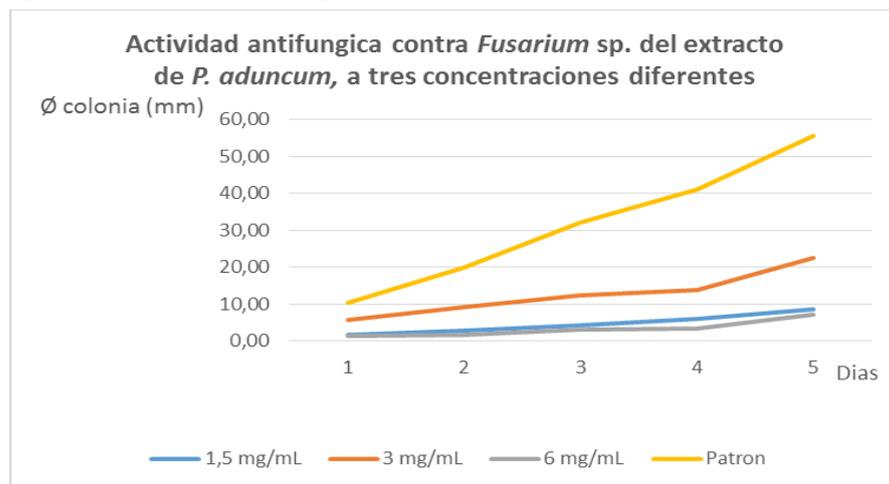
El estudio realizado en la presente tesis muestra que el extracto de *Carica papaya* L. no inhibe el crecimiento de los hongos *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp., pero si inhibe el crecimiento de *Alternaria* sp. y *Sclerotinia* sp. a una concentración de 6 mg/mL y 3mg/mL respectivamente. Mientras que la investigación de Chávez (2011), demuestra que a la concentración de 0.625 mg/mL se inhibe el crecimiento de *Fusarium* sp. y a la de 10 mg/mL él de *Colletotrichum gloeosporioides*. Comparando los resultados obtenidos en las dos investigaciones se nota que el extracto de *C. papaya* tiene poder inhibitorio sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos a partir de una concentración de 6mg/mL.

Actividad antifúngica *in vitro* del extracto de *Piper aduncum* L.

El extracto de *Piper aduncum* L. tiene actividad antifúngica contra todos los hongos en estudio; según los datos registrados, se ha comprobado que a concentraciones mayores de 1,5 mg/mL inhibe el crecimiento del hongo.

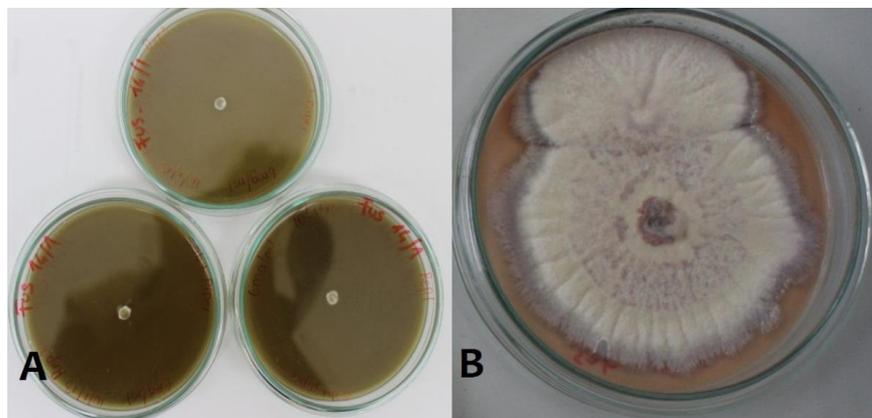
En la presente investigación se logró demostrar que el extracto de *Piper aduncum* L. inhibe el crecimiento del hongo *Fusarium* sp., en todas las concentraciones consideradas, pero con mayor intensidad a la concentración de 6 mg/mL, cuya MIC fue de 1,5 mg/mL la cual muestra que inhibe el crecimiento del hongo (Figura 44 y Figura 45).

Figura 44 – Actividad antifúngica contra *Fusarium* sp., de extracto de *Piper aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

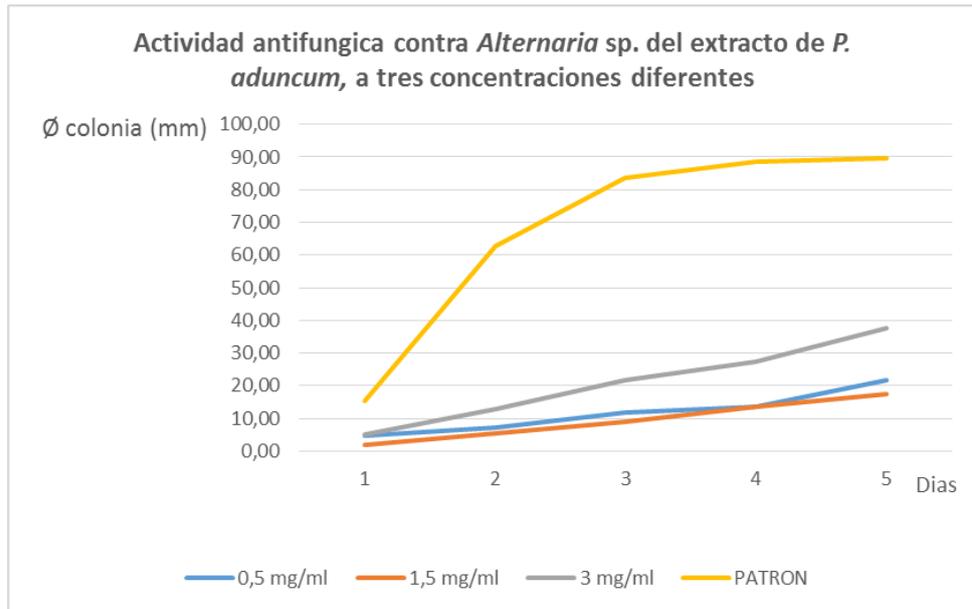
Figura 45 - A) *Fusarium* sp. en medio de cultivo con extracto de *Piper aduncum* L. (6mg/mL) B) *Fusarium* sp. en medio de cultivo sin extracto.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

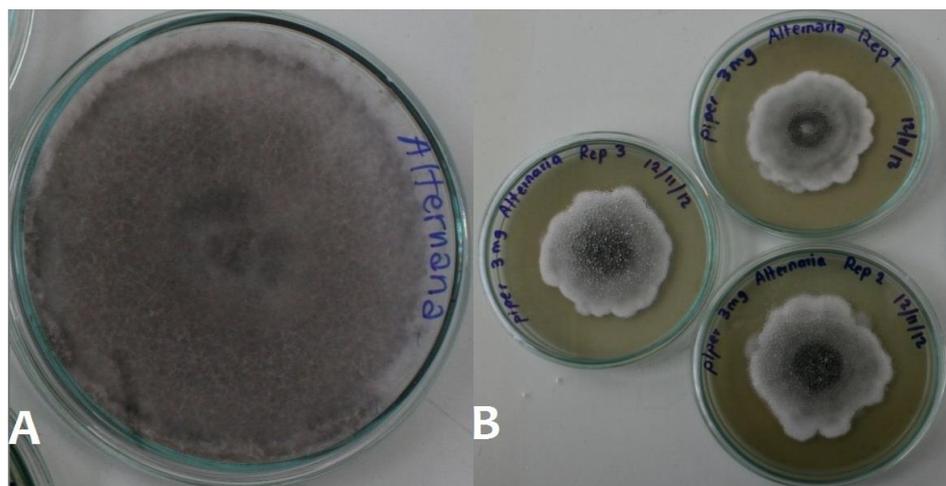
Con respecto al hongo del genero *Alternaria* sp. el extracto de *P. aduncum* L. inhibe el crecimiento, a las tres concentraciones, es decir que el hongo no se desarrolló. La eficiencia del extracto de *P. aduncum* L. es muy alta especialmente a la concentración de 1,5 mg/mL (Figura 46 y Figura 47)

Figura 46 - Actividad antifúngica contra *Alternaria* sp., de extracto de *Piper aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

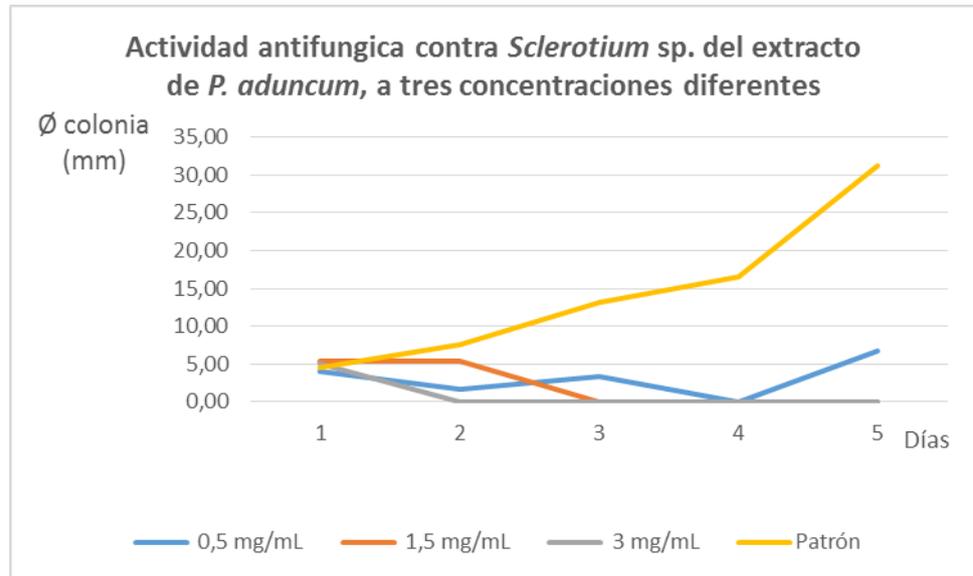
Figura 47 – A) *Alternaria* sp. en medio de cultivo sin extracto., B) Extracto de *Piper aduncum* (3 mg/mL) inhibe el crecimiento de *Alternaria* sp.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

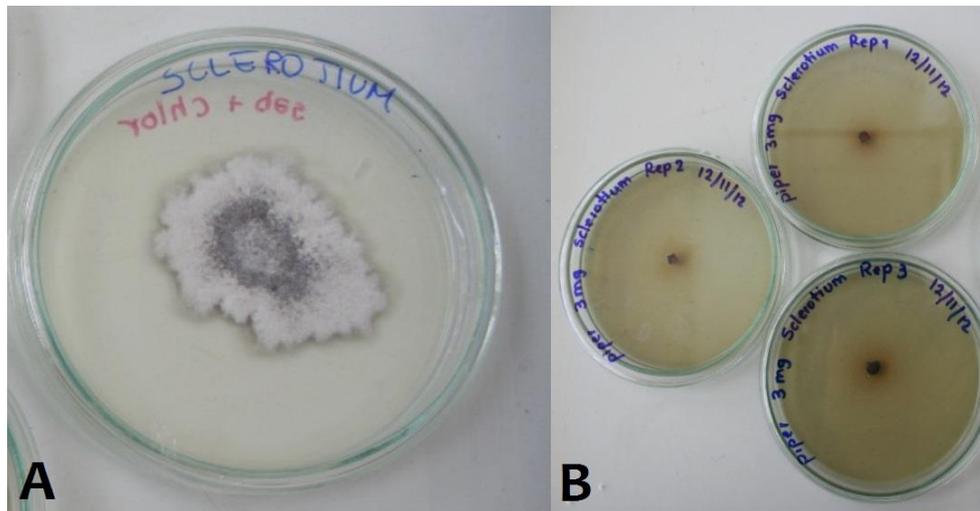
En el caso del hongo *Sclerotium* sp. las concentraciones correspondientes a 0,5, 1,5 y 3 mg/mL inhiben el crecimiento del hongo; la concentración mínima inhibitoria es de 3 mg/mL (Figura 48 y Figura 49)

Figura 48 - Actividad antifúngica contra *Sclerotium* sp., de extracto de *Piper aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

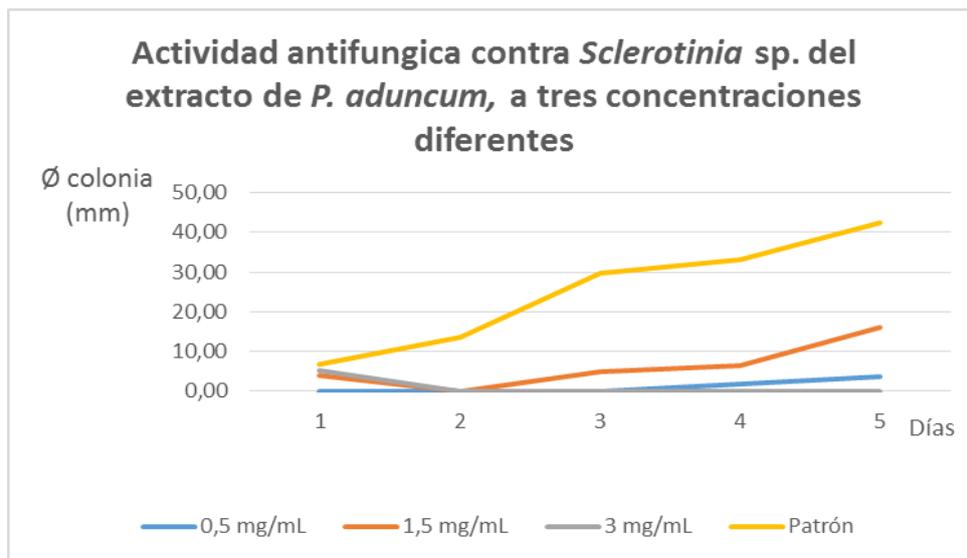
Figura 49 – A) *Sclerotium* sp. en medio de cultivo sin extracto. B) *Sclerotium* sp. en medio de cultivo con extracto de *Piper aduncum* L. a una concentración de 3 mg/mL.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

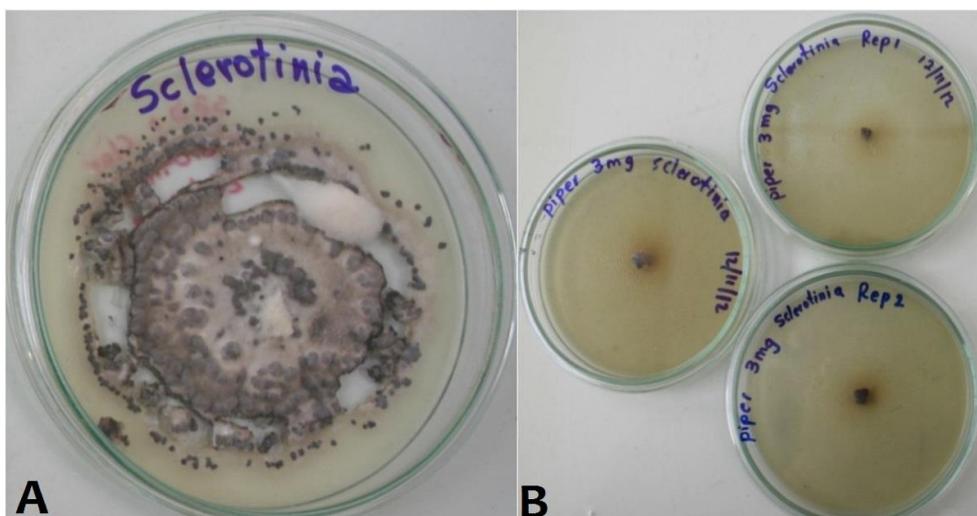
En el caso del hongo de genero *Sclerotinia* sp., las tres concentraciones del extracto de *Piper aduncum*, 0,5 mg/mL, 1,5 mg/mL y 3 mg/mL, inhiben el crecimiento del hongo *Sclerotinia* sp., como se muestra en la Figura 50, la concentración de 3 mg/mL inhibió el desarrollo del hongo (Figura 50 y Figura 51)

Figura 50 - Actividad antifúngica contra *Sclerotinia* sp., de extracto de *Piper aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Figura 1 – A) *Sclerotinia* sp. en medio de cultivo sin extracto. B) *Sclerotinia* sp. en medio de cultivo con extracto de *Piper aduncum* inhiben el crecimiento del hongo a 3 mg/mL



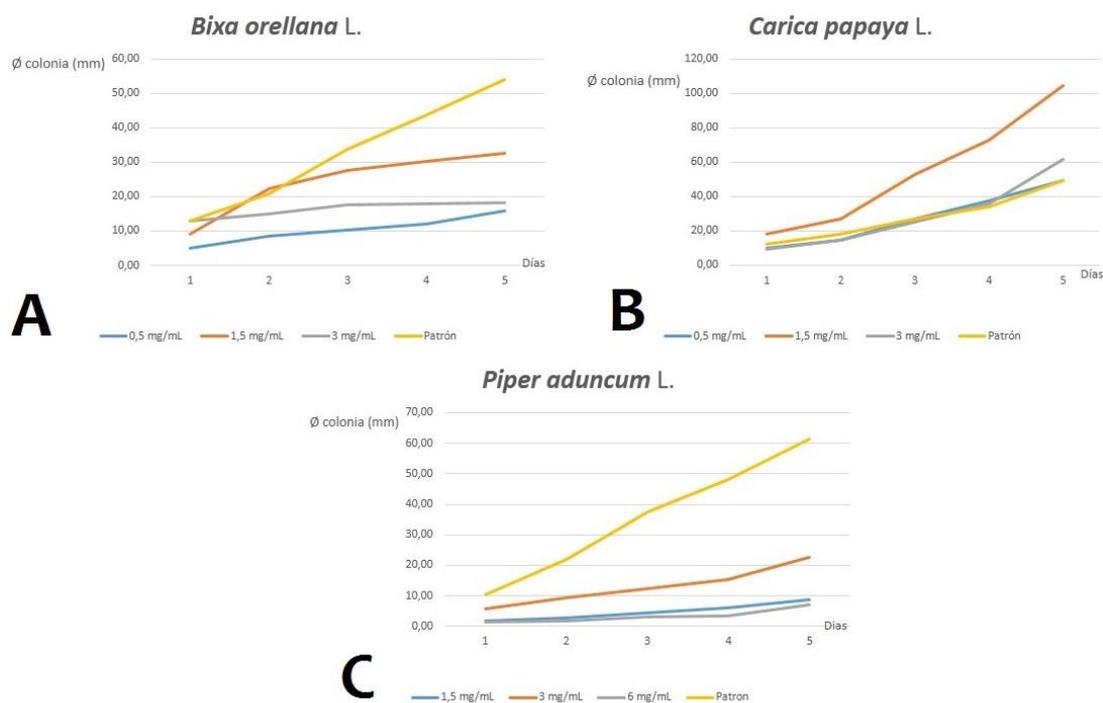
Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

Según los datos registrados en la presente tesis, el extracto de *Piper aduncum* L. inhibe el crecimiento de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Sclerotinia* sp. y *Sclerotium* sp. con MIC correspondientes respectivamente a 1,5 mg/mL, 1,5 mg/mL, 3 mg/mL y 3 mg/mL. Estudios previos realizados por Guerrini (2009) sobre el aceite esencial de *Piper aduncum* L. demuestran que ese tiene la capacidad de inhibir por un 70% el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, a la concentración de 0,5 mg/mL. Por lo tanto se puede notar que los resultados obtenidos en la presente tesis se asemejan a los alcanzados en el estudio mencionado, de hecho el orden de magnitud de la concentración está dentro de la decena.

A continuación se expresan los mismos resultados descritos anteriormente pero desde la perspectiva de inhibición del crecimiento de los cuatro fitopatógenos; en la sección anterior se han expresado los resultados desde la perspectiva de los tres extractos de plantas amazónicas (*C. papaya* L., *B. orellana* L., *P. aduncum* L.).

El crecimiento del género *Fusarium* fue inhibido significativamente por los extractos de *P. aduncum* L. y de *B. orellana* L., a las concentraciones respectivamente de 6 mg/mL y 0,5 mg/mL. Por lo contrario no fue afectado en su crecimiento por el extracto de *C. papaya* L. Contrariamente a lo esperado, este extracto demostró tener una actividad estimuladora del crecimiento fúngico, especialmente a la concentración de 1,5 mg/mL (Figura 51).

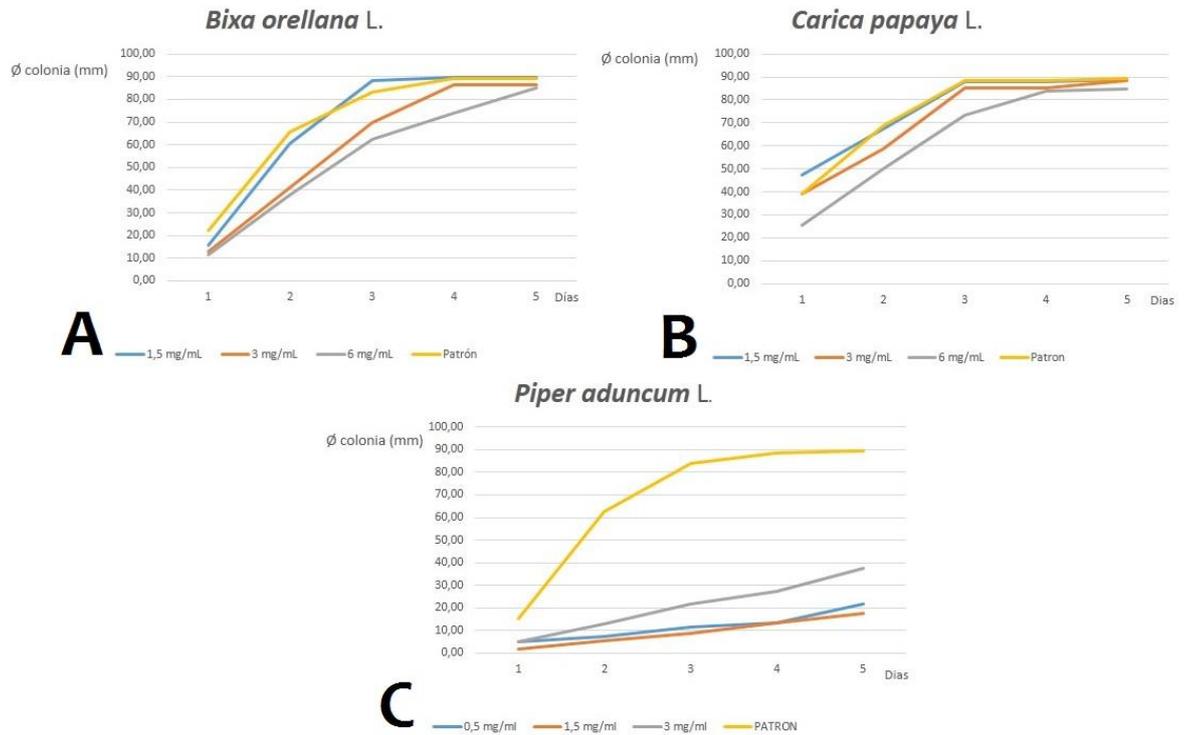
Figura 51 – Crecimiento del hongo *Fusarium* sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) *B. orellana* L., B) *C. papaya* L., C) *P. aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

El crecimiento del género *Alternaria* fue inhibido significativamente por el extracto de *P. aduncum* L., a las tres concentraciones de 0,5, 1,5 y 3 mg/mL. Se observó una inhibición en el crecimiento micelial también con el extracto de *B. orellana* L. aunque solo a dos de las concentraciones evaluadas, es decir 3 y 6 mg/mL. La misma situación se observó con el extracto de *C. papaya* L., el cual logró inhibir el crecimiento del hongo especialmente a la concentración de 6 mg/mL (Figura 52).

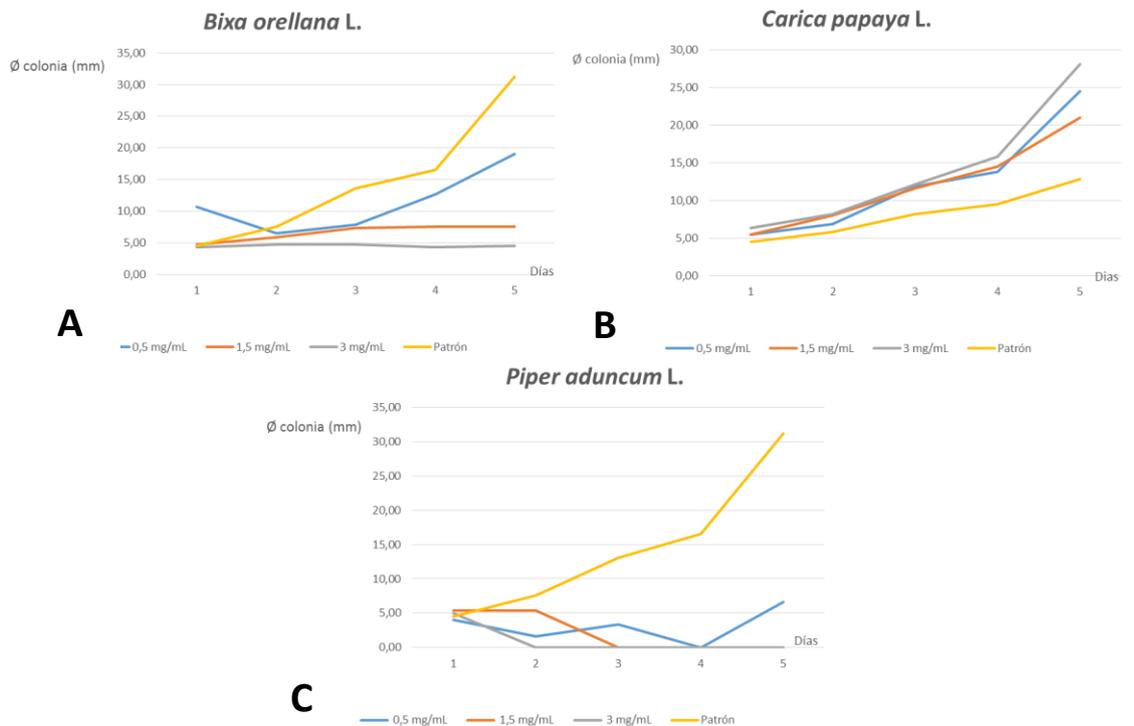
Figura 52 – Crecimiento del hongo *Alternaria* sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) *B. orellana* L., B) *C. papaya* L., C) *P. aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

El crecimiento del género *Sclerotium* fue inhibido significativamente por los extractos de *Piper aduncum* L. y de *Bixa orellana* L. Por lo contrario, el extracto de *C. papaya* L. no mostró ninguna actividad de inhibición del crecimiento de *Sclerotium* sp., e inclusive estimuló su desarrollo llevando a tener colonias de diámetros superior a la del patrón (Figura 53).

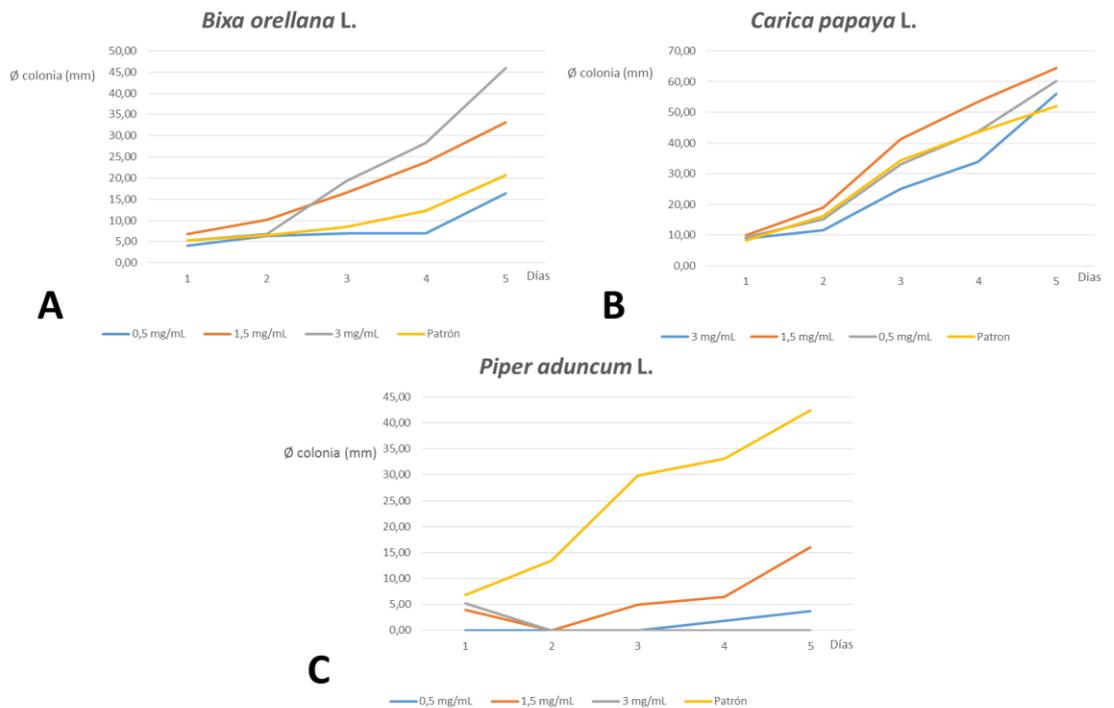
Figura 53 – Crecimiento del hongo *Sclerotium* sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) *B. orellana* L., B) *C. papaya* L., C) *P. aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del Autor, 2013.

El crecimiento del género *Sclerotinia* fue inhibido de forma relevante solo por el extracto de *P. aduncum* L., especialmente a las concentraciones de 0,5 y 3 mg/mL. Por el contrario, los extractos de *C. papaya* L. y *B. orellana* L. han tenido un comportamiento particular. A ciertas concentraciones han inhibido el crecimiento de *Sclerotinia* sp., mientras a otras concentraciones han estimulado; específicamente el extracto de *B. orellana* L. ha inhibido el crecimiento a la concentración de 0,5 mg/mL, mientras el de *C. papaya* L. a la concentración de 0,5 mg/mL (Figura 54).

Figura 54 - Crecimiento del hongo *Sclerotinia* sp. en contacto con tres extractos vegetales, a diferentes concentraciones: A) *B. orellana* L., B) *C. papaya* L., C) *P. aduncum* L.



Fuente: Elaboración propia del autor, 2013.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los Anexos de 1 a 12 se encuentran las tablas de cálculo de los valores promedio de los diámetros de las colonias fúngicas, por cada tratamiento considerado. Adicionalmente se encuentra el cálculo de las desviaciones estándares referentes a cada tratamiento.

5. DISCUSIÓN

La discusión de los resultados obtenidos está incluido en la sección “4. RESULTADOS EXPERIMENTALES”.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se han montado tres especímenes botánicos, uno por cada especie vegetal objeto de estudio. Cada espécimen se ha montado por triplicado y reposa en el Herbario ECUAMZ de la Universidad Estatal Amazónica.
- ✓ Se realizaron extractos hidroalcolicos de las tres especies; se obtuvieron las siguientes cantidades de extractos secos: 2,56 g de *Bixa orellana* L., 5,06 g *Carica papaya* L. y 5,50 g *Piper aduncum* L.
- ✓ Se aislaron de vainas de arveja (*Pisum sativum* L. var. *sativum*) enferma, los hongos del genero *Sclerotinia* y *Sclerotium*; los hongos del género de *Fusarium* y *Alternaria* fueron aislados respectivamente desde el suelo y desde plantas de col (*Brassica oleraceae*) enfermas, en los laboratorios de Ingeniería en Alimentos de la Universidad del Azuay, en la ciudad de Cuenca.
- ✓ Se demostró que la técnica de difusión en agar del extracto y medición del diámetro de la colonia son útiles en la evaluación del efecto antimicótico de los extractos evaluados.
- ✓ Se determinaron las MIC de los distintos extractos.
- ✓ El extracto hidroalcohólico de *B. orellana* L., a ciertas concentraciones, tiene una actividad estimuladora sobre el crecimiento de *Sclerotinia* sp.
- ✓ El extracto hidroalcohólico de *C. papaya* L. a ciertas concentraciones tiene una actividad estimuladora sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda aplicar los resultados de esta tesis en estudios en campo, como método de control natural de enfermedades causadas *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Sclerotinia* sp. y *Sclerotium* sp., a fin de comprobar *in vivo* la actividad antifúngica de los extractos. Específicamente se recomienda:
 - Utilizar el extracto de *Piper aduncum* L. en concentración equivalente a 1,5 mg/mL, como método de control natural,
 - Utilizar el extracto de *Bixa orellana* L. en concentración equivalente a 0,5mg/mL contra *Fusarium* sp. y 3 mg/mL contra *Sclerotium* sp.
 - Utilizar el extracto de *Carica papaya* L. en concentración equivalente a 6mg/mL contra *Alternaria* sp., y 1.5 mg/mL contra *Sclerotinia* sp.
- Se recomienda realizar estudios adicionales que permitan formular hipótesis sobre el fenómeno de la estimulación de crecimiento que dan los extractos de *C. papaya* y *B. orellana*, sobre *Alternaria* sp., *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp.

8. RESUMEN

El trabajo de investigación de tesis se realizó con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas amazónicas, *Piper aduncum* L., *Carica papaya* L. y *Bixa orellana* L. contra los hongos fitopatógenos *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Las muestras de plantas fueron recolectadas en el jardín botánico de la Universidad Estatal Amazónica. De cada planta se montó un espécimen botánico para el herbario ECUAMZ de la Universidad Estatal Amazónica. Los extractos se obtuvieron por percolación, utilizando la proporción 1:5 entre droga seca y menstruo (Solución hidroalcohólica al 80%). Se han obtenido 2,56 gr de extracto seco de *B. orellana* L., 5,06 gr de extracto seco de *C. papaya* L. y 5,50 gr de extracto seco de *P. aduncum* L. La actividad antifúngica de los extractos fue evaluada sobre 4 hongos fitopatógenos. Dos de estos, *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp. se aislaron de muestras de arvejas (*P. sativum*) enfermas y los hongos del género *Fusarium* y *Alternaria* fueron aislados respectivamente desde el suelo y desde plantas de col (*Brassica oleraceae*) enfermas, en los laboratorios de Ingeniería en Alimentos de la Universidad del Azuay (Cuenca). La actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales se determinó mediante la técnica de difusión en agar, evaluando tres concentraciones diferentes (desde 0,5 hasta 6 mg/mL). Los estudios se realizaron en el laboratorio de Biología de la UEA. El extracto de *Bixa orellana* L. tiene actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. El extracto de *Carica papaya* L. tiene actividad antifúngica contra *Alternaria* sp. y *Sclerotinia* sp.; mientras que no ha mostrado actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. El extracto de *Piper aduncum* L. tiene actividad antifúngica contra todos los hongos en estudio;

según los datos registrados, se ha comprobado que a concentraciones mayores de 1,5 mg/mL inhibe el crecimiento del hongo.

9. SUMMARY

The thesis was focused on evaluating the inhibition activity of the extracts of *Piper aduncum* L., *Carica papaya* L. and *Bixa orellana* L. against phytopathogen fungi: *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Fusarium* and *Alternaria*. Plant samples were collected in the botanical garden of the Universidad Estatal Amazónica (UEA), in Puyo (Ecuador). A botanical specimen, for each plant, was prepared for the UEA herbarium ECUAMZ. The hydroalcoholic extracts were obtained by percolation, using the 1:5 ratio between dry drug and solvent (80% alcohol solution). The following amount of extracts was obtained: 2.56 gr of *B. orellana* L., 5.06 gr of *C. papaya* L. and 5.50 gr of *P. aduncum* L. The extract antifungal activity was set on 4 phytopathogenic fungi. Two of these, *Sclerotium* sp. and *Sclerotinia* sp. was isolated from sick pea samples (*P. sativum*) and the genus *Fusarium* and *Alternaria* from soil and sick cabbage (*Brassica oleraceae*), in the laboratories of Food Engineering of University of Azuay (Cuenca). The *in vitro* antifungal activity of plant extracts was determined by agar diffusion technique, evaluating three different concentrations (from 0.5 to 6 mg/mL). The studies were conducted in the Laboratory of Biology at UEA. *B. orellana* extract showed antifungal activity against *Fusarium* sp and *Sclerotium* sp. The extract of *Carica papaya* L. showed antifungal activity against *Alternaria* sp. and *Sclerotinia* sp., while it didn't have antifungal activity against *Fusarium* sp. and *Sclerotium* sp. The extract of *Piper aduncum* L. demonstrated antifungal activity against all fungi, according to the data recorded, it was found that at concentrations higher than 1.5 mg/mL the extract inhibited the fungi growth.

10. BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 2008. Fitopatología; 1a edición; Edit. Limusa; México.

Andreotti, E. 2002-2004. Funghi endofiti come potenziale strumento di individuazione di molecole di interesse farmaceutico. Tesi di dottorato di ricerca in biocatalisi applicata e microbiologia industrial. Dipartimento delle Risorse Naturali e Culturali. Università di Ferrara

Augstburger F., Berger J., Censkowsky U., Heid P., Milz J., Streit C. 2000. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico Guías de 18 cultivos, Asociación Naturland, 1ª edición, pág. 5

Celis Á., Mendoza C., Pachón M., Cardona J., Delgado W. y Cuca L. E. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Agronomía Colombiana, Vol. 26, No. 1, pág. 97-105, Colombia.

Chávez, Q. P., González F.T., Rodríguez B. I. y Gallegos T, S. 2011. Antifungal Activity in Ethanolic Extracts of *Carica papaya* L. CV. Maradol Leaves and seeds, Association of Microbiologists of India, Vol. 51(1), pág. 54-60.

Emeruwa A. C. 1982. Antibacteterial Substance From *Carica papaya* Fruit Extract. *Journal of Natural Products* 45(2), 123-127.

Estrella, J., Manosalvas R., Mariaca J. y Ribadeneria M. 2005. Biodiversidad y recursos genéticos, Abya-Yala.

FAO. 2003. Agricultura orgánica, ambiente y seguridad alimentaria. Servicio del Medio Ambiente y los Recursos naturales. Departamento de Desarrollo Sostenible

FAO. 2011. Utilidad de plantas amazónicas, publicación, Los árboles frutales y plantas útiles en la vida amazónica; <http://www.fao.org>.

Guerrini A., Sacchetti G., Rossi D., Paganetto G., Muzzoli M., Andreotti E., Tognolini M. Maldonado M. y Bruni R. 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavón (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol 27, pág. 39-48.

INAMHI, 2012, condiciones meteorológicas Puyo, <http://www.inamhi.gob.ec/index.php/red-de-estaciones/easytablerecord/2-prueba/1002>

Irobi O.N., Moo-young, M., Anderson W.A. 1996. Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. Pharmaceutical Biology. Vol. 34, No.2, pág.87-90.

Lorence D. 2012. National Tropical Botanical Garden. Meet the plants. Choose a plant. *Bixa orellana*. ntbg.org.

Lourido P., H. & Martínez S., G. 2010. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. Rev. Cubana Farm. 44(2)

Marín O., Mass M., Barrera J. y Robles J. 2008. Evaluación de extractos vegetales para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en plátano en tierra alta. Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo rural. Temas Agrarios. Vol. 13, No 1, pág. 25-31.

Mejía K. y Rengifo E. 2000. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. AGENCIA ESPAÑOLA DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL (AECI) y el INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONÍA PERUANA (IIAP) en el marco del Proyecto Araucaria Amazonas Nauta que el Gobierno Regional de Loreto.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Montaje de especímenes botánica, documento de trabajo del Jardín Botánico de Missouri, Los especímenes de Herbario; <http://www.missouribotanicalgarden.org/.sf>

Moraos, M., Ollgaard, B., Kvist, L. P., Borchsenius, F. y Balslev H. 2006. Botánica Económica de los andes centrales. Plural editores. Universidad Mayor de San Andrés. La paz. pág. 333.

Muñoz F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Mundi Prensa Libros.

Murillo W., Araque P. y Peláez C. 2012. Actividad Fungicida e Insecticida de Emulsiones Agua/Aceite de Mezclas de Extractos de *Nicotiana tabacum*, *Azadiractha indica* y *Eucalyptus tereticornis*. Información tecnológica, Vol. 23, No. 1.

Osorio S., G.P. 2006. Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis Morelet*) en banano. Tesis de posgrado en Agricultura Ecológica. CATIE

Ríos, M., Koziol M. J., Borgtoft Pedersen H. y Granda G. 2007. Plantas Útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas. Abya Yala.

Rivera, G. C. 1999. Conceptos Introductorios a la Fitopatología, Editorial Universidad Estatal a Distancia.

Singh, I. & Singh, V.P. 2000. Antifungal properties of aqueous and organic solution extracts of seed plants against *Aspergillus flavus* and *A. niger*. *Phytomorphology*. 50(2):151-157

Starr F., Starr K., and Loope L. 2003. *Piper aduncum* L. United States Geological Survey--Biological Resources Division.

Tamil S. 2011. Leaf and seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 9: 116-120.

10. ANEXOS

Anexo 1

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *B. orellana*, a tres concentraciones diferentes, contra *Fusarium* sp.

Bixa + Fusarium 0,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	9	16	22	29	50,5
Rep 1	5	7	8,5	10	14,5
Rep 2	5	9,5	11,5	13	13,5
Rep 3	5	9,5	11	13	20
Promedio	5,00	8,67	10,33	12,00	16,00
DEV.ST	0,00	1,44	1,61	1,73	3,50
Bixa + Fusarium 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	8,8	25,2	44,7	57,7	67,0
Rep 1	6,0	20,0	27,0	30,0	31,0
Rep 2	13,0	27,5	33,5	36,0	41,0
Rep 3	8,5	19,5	22,5	25,0	26,0
Promedio	9,17	22,33	27,67	30,33	32,67
DEV.ST	3,55	4,48	5,53	5,51	7,64
Bixa + Fusarium 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	21	21	35	45	45
Rep 1	12	12	13	13	13
Rep 2	14	18	25	25	26
Rep 3	13	15	15	16	16
Promedio	13	15	18	18	18
DEV.ST	1	3	7	6	7

Anexo 2

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *B. orellana*, a tres concentraciones diferentes, contra *Alternaria* sp.

Bixa + Alternaria 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	15,33	62,67	88,33	88,67	89,50
Rep 1	14	55	88	90	90
Rep 2	17	60,5	88,5	90	90
Rep 3	16	66	88	88,5	89
Promedio	15,67	60,50	88,17	89,50	89,67
DEV.ST	1,53	5,50	0,29	0,87	0,58

Bixa + Alternaria 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	15	63	88	89	90
Rep 1	15	39	70	88	88
Rep 2	12	43	71	86	86
Rep 3	11	43	70	86	86
Promedio	13	41	70	86	86
DEV.ST	2	2	1	1	1

Bixa + Alternaria 6 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron 1	35	71	90	90	90
Rep 1	10,5	39	63	74	85
Rep 2	13	36	61	74	85
Rep 3	10,5	38	62,5	74	85
Promedio	11,33	37,67	62,17	74,00	85,00
DEV.ST	1,44	1,53	1,04	0,00	0,00

Anexo 3

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *B. orellana*, a tres concentraciones diferentes, contra *Sclerotium* sp.

Bixa + Sclerotium 0,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron 1	5	9	22	27	70
Rep 1	4	6,5	7,5	14,5	25
Rep 2	4	8	9	14,5	20
Rep 3	4	5	7	9	12
Promedio	10,67	6,50	7,83	12,67	19,00
DEV.ST	0,00	1,50	1,04	3,18	6,56

Bixa + Sclerotium 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron 1	4,33	6,83	8,67	11,33	11,83
Rep 1	4,5	4,5	6	6	6
Rep 2	4,5	7,5	10,5	11	11
Rep 3	5	5,5	5,5	5,5	5,5
Promedio	4,7	5,8	7,3	7,5	7,5
DESV.ST	0,29	1,53	2,75	3,04	3,04

Bixa + Sclerotium 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron 1	4,2	6,8	10,2	11,3	11,8
Rep 1	5,0	5,0	4,5	3,5	4,5
Rep 2	4,0	5,0	5,0	5,0	4,5
Rep 3	4,0	4,0	4,5	4,5	4,5
Promedio	4,3	4,7	4,7	4,3	4,5
DESV.ST	0,6	0,6	0,3	0,8	0,0

Anexo 4

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *B. orellana*, a tres concentraciones diferentes, contra *Sclerotinia* sp.

Bixa + Sclerotinia 0,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron 1	4	6	8	12	23,5
Rep 1	4	7	7	7	13
Rep 2	4	6	7	7	18
Rep 3	4	6	7	7	18
Promedio	4,00	6,33	7,00	7,00	16,33
DESV.ST	0	1	0	0	3

Bixa + Sclerotinia 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron 1	6,00	6,67	8,67	12,50	19,17
Rep 1	8	10,5	15	19,5	25
Rep 2	6	9,5	18	31	51
Rep 3	6,5	10,5	16,5	20,5	23,5
Promedio	6,83	10,17	16,50	23,67	33,17
DESV.ST	1	1	2	6	15

Bixa + Sclerotinia 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron 1	6,00	6,67	8,67	12,50	19,17
Rep 1	5,0	8,0	29,0	45,0	67,5
Rep 2	5,5	6,0	14,5	24,5	49,0
Rep 3	5,5	6,5	14,5	15,5	21,5
Promedio	5	7	19	28	46
DESV.ST	0	1	8	15	23

Anexo 5

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *C. papaya*, a tres concentraciones diferentes, contra *Fusarium* sp.

Carica + Fusarium 0,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	9	16	22	29	50,5
Rep 1	10	14,5	21,5	41	55
Rep 2	9,5	14	33	41,5	52,5
Rep 3	10,5	15,5	27	29,5	40
Promedio	10,00	14,67	27,17	37,33	49,17
DEV.ST	0,50	0,76	5,75	6,79	8,04

Carica + Fusarium 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	14,56	19,56	32,06	40,89	53,11
Rep 1	7	11	20,5	30,5	48,5
Rep 2	8,5	12,5	24,5	32	42,5
Rep 3	7	11	23,5	30,5	40
Promedio	7,5	11,5	22,8	31,0	43,7
DEV.ST	0,87	0,87	2,08	0,87	4,37

Carica + Fusarium 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	13,67	18,67	29,67	36,67	48,33
Rep 1	8	10	18	30	59
Rep 2	10,5	14,5	26,5	37	62,5
Rep 3	10	18,5	31	41	63,5
Promedio	9,5	14,3	25,2	36	61,7
DEV.ST	1,32	4,25	6,60	5,57	2,36

Anexo 6

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *C. papaya*, a tres concentraciones diferentes, contra *Alternaria* sp.

Carica + Alternaria 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	41	68	88	88	89
Rep 1	45	65	88	88	89
Rep 2	47	67	88	88	89
Rep 3	50	70	88	88	89
Promedio	47,33	67,33	88,00	88,00	89,00
DEV.ST	2,52	2,52	0,00	0,00	0,00

Carica + Alternaria 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	41	68	88	88	89
Rep 1	40	56,5	88	88	89
Rep 2	37,5	59,5	88	88	89
Rep 3	40	60	80	80	88
Promedio	39,17	58,67	85,33	85,33	88,67
DEV.ST	1,44	1,89	4,62	4,62	0,58

Carica + Alternaria 6 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	35	71	90	90	90
Rep 1	25	64,5	79,5	87	89
Rep 2	25	43	72	81	85
Rep 3	26	43	69	84	80
Promedio	25,33	50,17	73,50	84,00	84,67
DEV.ST	0,58	12,41	5,41	3,00	4,51

Anexo 7

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *C. papaya*, a tres concentraciones diferentes, contra *Sclerotium* sp.

Carica + Sclerotium 0,5 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	4,50	5,83	8,17	9,50	12,83
Rep 1	5,5	6	12,5	14	25
Rep 2	6	6,5	10,5	14,5	23,5
Rep 3	5,5	7,5	12,5	13	24,5
Promedio	5,67	6,67	11,83	13,83	24,33
DEV.ST	0,29	0,76	1,15	0,76	0,76

Carica + Sclerotium 1,5 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	4,50	5,83	8,17	9,50	12,83
Rep 1	6	8,5	11,5	13	13
Rep 2	5	7	11,5	16	30,5
Rep 3	5,5	8,5	12	14,5	19,5
Promedio	5,50	8,00	11,67	14,50	21,00
DEV.ST	0,50	0,87	0,29	1,50	8,85

Carica + Sclerotium 3 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	4,50	5,83	8,17	9,50	12,83
Rep 1	6	8	14	15	30,5
Rep 2	6	7	10,5	14	27
Rep 3	7	9,5	12	18,5	27
Promedio	6,33	8,17	12,17	15,83	28,17
DEV.ST	0,58	1,26	1,76	2,36	2,02

Anexo 8

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *C. papaya*, a tres concentraciones diferentes, contra *Sclerotinia* sp.

Carica + Sclerotina 0,5 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	8,33	16,33	34,33	43,67	52,00
Rep 1	9	15	34	44,5	59,5
Rep 2	8	14,5	32	43	61
Rep 3	11	16	33	41,5	60,5
Promedio	9,33	15,17	33,00	43,00	60,33
DEV.ST	1,53	0,76	1,00	1,50	0,76

Carica + Sclerotina 1,5 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	8,33	16,33	34,33	43,67	52,00
Rep 1	9,5	21,5	49	63	75
Rep 2	8,5	13,5	29,5	36	41
Rep 3	11,5	22	45,5	61,5	77,5
Promedio	9,83	19,00	41,33	53,50	64,50
DEV.ST	1,53	4,77	10,40	15,17	20,39

Carica + Sclerotinia 3 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	8,33	16,33	34,33	43,67	52,00
Rep 1	8	9	20,5	31	63,5
Rep 2	8,5	11,5	23,5	30	31,5
Rep 3	10	14	31	41	73
Promedio	8,83	11,50	25,00	34,00	56,00
DEV.ST	1,04	2,50	5,41	6,08	21,74

Anexo 9

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *P. aduncum*, a tres concentraciones diferentes, contra *Fusarium* sp.

Piper + Fusarium 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	8,9	25,4	46,4	59,6	68,5
Rep 1	5,0	9,0	13,0	18,0	24,0
Rep 2	5,0	8,5	11,0	20,0	27,0
Rep 3	5,0	8,5	14,5	17,0	28,0
Promedio	5,00	8,67	12,83	18,33	26,33
DEV.ST	0,00	0,29	1,76	1,53	2,08

Piper + Fusarium 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	15	25	48	60	69
Rep 1	5,5	7,5	11,5	16,0	20,0
Rep 2	6,0	10,0	13,0	15,5	24,0
Rep 3	6,0	10,5	13,0	15,0	24,0
Promedio	5,83	9,33	12,50	15,50	22,67
DEV.ST	0,29	1,61	0,87	0,50	2,31

Piper + Fusarium 6 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	9	16	22	29	50,5
Rep 1	4	5	10	10,5	19
Rep 2	4	5	9	10	23
Rep 3	4	5	9	10,5	23
Promedio	1,33	1,67	3,11	3,44	7,22
DEV.ST	0,00	0,00	0,58	0,29	2,31

Anexo 10

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *P. aduncum*, a tres concentraciones diferentes, contra *Alternaria* sp.

Piper + Alternaria 0,5 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	35	71	90	90	90
Rep 1	17	24	36	43	70
Rep 2	15	21	33,5	41	65
Rep 3	12	20	36	38	60
Promedio	4,89	7,22	11,72	13,56	21,67
DEV.ST	2,52	2,08	1,44	2,52	5,00

Piper + Alternaria 1,5 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	15,5	62,5	84	88	89
Rep 1	1,5	5	8	15	17
Rep 2	2	5,5	9	13,5	18
Rep 3	1,5	6	9,5	12,5	17,5
Promedio	1,67	5,50	8,83	13,67	17,50
DEV.ST	0,29	0,50	0,76	1,26	0,50

Piper + Alternaria 3 mg/mL

DIA	1	2	3	4	5
Patron	15	63	75	89	90
Rep 1	5,5	12,0	20,5	26,5	36,0
Rep 2	5,0	14,0	22,0	26,0	40,0
Rep 3	4,5	12,5	22,5	29,5	37,0
Promedio	5,00	12,83	21,67	27,33	37,67
DEV.ST	0,50	1,04	1,04	1,89	2,08

Anexo 11

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *P. aduncum*, a tres concentraciones diferentes, contra *Sclerotium* sp.

Piper + Sclerotium 0,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	5	9	22	27	70
Rep 1	4	0	5	0	7
Rep 2	4	0	0	0	7
Rep 3	4	5	5	0	6
Promedio	4,00	1,67	3,33	0,00	6,67
DEV.ST	0,00	2,89	2,89	0,00	0,58

Piper + Sclerotium 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	4,33	6,83	8,67	11,33	11,83
Rep 1	6,0	6,0	0,0	0,0	0,0
Rep 2	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0
Rep 3	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0
Promedio	5,33	5,33	0,00	0,00	0,00
DEV.ST	0,58	0,58	0,00	0,00	0,00

Piper + Sclerotium 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	4,33	6,83	8,67	11,33	11,83
Rep 1	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rep 2	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rep 3	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Promedio	5	0	0	0	0
DEV.ST	0	0	0	0	0

Anexo 12

Diámetro de la colonia fúngica (mm), valor promedio y desviación estándar referentes al extracto de *P. aduncum*, a tres concentraciones diferentes, contra *Sclerotinia* sp.

Piper + Sclerotinia 0,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	4	6	8	12	23,5
Rep 1	0	0	0	5	10
Rep 2	0	0	0	6	12
Rep 3	0	0	0	6	12
Promedio	0,00	0,00	0,00	5,67	11,33
DEV.ST	0,00	0,00	0,00	0,58	1,15

Piper + Sclerotinia 1,5 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	8	17	47	44	52
Rep 1	4,0	0,0	5,0	6,0	17,0
Rep 2	4,0	0,0	5,0	6,0	13,0
Rep 3	4,0	0,0	5,0	7,0	17,0
Promedio	4,0	0,0	5,0	6,3	15,7
DEV.ST	0,00	0,00	0,00	0,58	2,31

Piper + Sclerotinia 3 mg/mL					
DIA	1	2	3	4	5
Patron	8,33	17,17	34,33	43,67	52,00
Rep 1	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rep 2	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Rep 3	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Promedio	5,17	0,00	0,00	0,00	0,00
DEV.ST	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00