



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO VEGETAL DE *Piper carpunya*
(Ruiz & Pav.) SOBRE *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*.**

AUTOR: CISNEROS FLORES, MARCELA MONSERRATTE

DIRECTOR: MSc. CHÁVEZ LARREA, MARÍA AUGUSTA

SANGOLQUÍ

2019



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "*EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO VEGETAL DE Piper carpuaya (Ruiz & Pav) SOBRE Sphaerotheca pannosa var. rosae.*", realizado por la señorita **MARCELA MONSERRATTE CISNEROS FLORES**, ha sido revisado en su totalidad y cumple con las normas estatutarias establecidas en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar para que lo sustente públicamente

Sangolquí, Enero de 2019.

**MSc. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ LARREA
DIRECTORA**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, MARCELA MONSERRATTE CISNEROS FLORES, declaro que el contenido, ideas y criterios del presente trabajo de titulación "*EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO VEGETAL DE Piper carpubya (Ruiz & Pav) SOBRE Sphaerotheca pannosa var. rosae.*" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, Enero del 2019



MARCELA MONSERRATTE CISNEROS FLORES
C.C. 1804502282



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, MARCELA MONSERRATTE CISNEROS FLORES, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "*EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO VEGETAL DE Piper carpubaya (Ruiz & Pav) SOBRE Sphaerotheca pannosa var. rosae.*" cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, Enero del 2019

MARCELA MONSERRATTE CISNEROS FLORES

C.C. 1804502282

DEDICATORIA

Con mucho cariño:

A Dios que me ha dado fuerzas para seguir adelante y continuar creciendo.

A mis padres: Myriam Flores y Marcelo Cisneros por su apoyo incondicional.

A mi hermano: Alejandro Cisneros por ser la voz de la calma y un gran músico

A mis queridos amigos y profesores sobre todo;

Al Dr. Carlos Cárdenas que hizo posible esta realidad

A todos que con su apoyo me ayudaron a escribir y continuar con la tesis.

“Las preguntas que no podemos contestar son las que más nos enseñan”

Patrick Rothfuss

Marcela Monserratte Cisneros Flores

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme la fuerza para seguir adelante y permitirme cumplir con una de mis metas, iluminándome con sabiduría para escribir este proyecto.

A mi familia por el apoyo incondicional, gracias por su persistencia y consejos; los que me han ayudado a enfrentar los retos que se me presentaron.

A todos los profesores y colaboradores académicos que he tenido siendo una guía en mi camino, en especial al Dr. Cárdenas por permitirme desarrollar este proyecto y no desistir frente a los desafíos de esta investigación y al Dr. Paco Noriega por la ayuda brindada.

A todos mis compañeros y amigos que compartieron conmigo buenos y malos momentos a lo largo de todo este tiempo.

A todos ustedes infinitas gracias...

Marcela Monserratte Cisneros Flores

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES.	1
1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER.	3
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.	4
1.3.1 Objetivo general del proyecto.	4
1.3.2 Objetivos específicos.	4
MARCO TEÓRICO	5
2.1 Cultivo de rosas en el Ecuador.	5
2.1.1 Generalidades.	5
2.1.2 Taxonomía.	6
2.1.3 Manejo y Comercialización.	7
2.1.4 Importancia Económica.	8
2.2 Enfermedades en plantas causadas por hongos.	10
2.2.1 Importancia Económica.	10
2.3 Mildiú polvoso.	13
2.3.2 Taxonomía.	13
2.3.3 Biología y epidemiología en el rosal.	15
2.2.4. Sintomatología.	16
2.2.5. Morfología.	17
2.2.6. Control del patógeno.	18

2.4	Extractos Vegetales.....	19
2.4.1	Generalidades.....	19
2.4.2	Métodos de obtención de extractos vegetales.....	20
2.4.3	Destilación por arrastre de vapor.....	20
2.4.4	Maceración.....	21
2.5	Familia <i>Piperaceae</i>	21
2.5.1	Generalidades.....	21
2.5.2	Especie de estudio: <i>Piper carpunya</i>	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....		23
3.1	Participantes.....	23
3.2	Zona de Estudio.....	23
3.2.1	Campo.....	23
3.2.2	Laboratorio.....	24
3.3	Periodo de Investigación.....	24
3.4	Hipótesis.....	24
3.5	Diseño Estadístico.....	25
3.5.1	Factores controlables.....	26
3.5.2	Tratamientos.....	26
3.5.3	Repeticiones.....	27
3.5.4	Unidad experimental.....	27
3.5.5	Variable de Respuesta.....	27
3.5.6	Análisis Estadístico.....	28
3.6	Métodos.....	28
3.6.1	Procesamiento de la materia prima para la elaboración del extracto.....	28
3.6.2	Molienda y pesaje.....	28
3.6.3	Obtención del extracto por hidrodestilación.....	29
3.6.4	Obtención de los extractos por maceración.....	29
3.6.5	Preparación de los tratamientos a contrastar.....	30
3.6.6	Obtención de una suspensión de conidios de <i>Sphaerotheca pannosa var. rosae</i>	30
3.6.7	Conteo de conidios.....	32
3.6.8	Evaluación <i>in vitro</i> del extracto frente al Patógeno.....	33
3.6.9	Observación microscópica de los conidios de <i>Sphaerotheca pannosa var. rosae</i>	34
3.6.10	Análisis cromatográfico complementarios.....	34

RESULTADOS.....	36
4.1 Obtención de los extractos.....	36
4.2 Identificación morfológica del patógeno.....	37
4.3 Evaluación <i>in vitro</i> del extracto frente al Patógeno.....	38
4.3.1 Determinación del mejor método de extracción de <i>Piper carpunya</i> (Ruiz & Pav.) que permita el mayor control biológico sobre <i>Sphaerotheca pannosa</i> var. <i>rosae</i>	38
4.3.2 Determinación de la mejor dilución 30, 60, 90 % por solvente del extracto de <i>Piper carpunya</i> (Ruiz & Pav.) para conseguir el mayor control biológico del fitopatógeno <i>Sphaerotheca pannosa</i> var. <i>rosae</i>	38
4.3.3 Determinación del mejor tratamiento de <i>Piper carpunya</i> (Ruiz & Pav.) que permita el mayor control biológico sobre <i>Sphaerotheca pannosa</i> var. <i>rosae</i>	41
4.3.4 Evaluación de la variable de respuesta para cada tratamiento a las diferentes diluciones a través del tiempo de observación (0 – 12 y 24 horas).....	42
4.3.5 Apreciación microscópica de los cambios morfológicos producidos en los conidios de <i>Sphaerotheca pannosa</i> var. <i>rosae</i> en función del tiempo y tratamiento evaluado.....	44
4.4 Análisis cromatográficos complementarios.....	45
DISCUSIÓN.....	49
5.1 Obtención de los extractos.....	49
5.2 Evaluación <i>in vitro</i>	50
5.3 Determinación del mejor tratamiento.....	52
5.4 Observación microscópica del efecto de los extractos sobre conidios <i>S. pannosa</i>	53
5.5 Análisis cromatográficos complementarios.....	56
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación botánica de las rosas.</i>	6
Tabla 2. <i>Clasificación taxonómica del fitopatógeno causante del mildiú polvoso</i>	14
Tabla 3. <i>Tratamientos a evaluar sobre conidios de <i>S. pannosa</i> var. <i>rosae</i></i>	26
Tabla 4. <i>Características organolépticas y porcentaje de rendimiento en los diferentes métodos de obtención del extracto de <i>P. carpunya</i></i>	36
Tabla 5. <i>Características sintomatológicas y morfológicas del fitopatógeno <i>S. pannosa</i></i>	37
Tabla 6. <i>Compuestos detectados por el GC-MS en el extracto de <i>P. carpunya</i> hidrodestilado.</i> .47	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ciclo de biológico del mildiú polvoso.</i>	15
Figura 2. <i>Cuadrantes de la cámara de Neubauer.</i>	33
Figura 3. <i>Afecciones en la morfología de conidios de <i>S. pannosa</i> var <i>rosae</i>: a) conidio b) conidio hinchado c) conidio delgado d) conidio irregular e) conidio reventado.</i>	34
Figura 4. <i>Resultados del análisis de varianza respecto a los métodos de extracción aplicados macerado e hidrodestilado que permitan el mayor control biológico sobre <i>S. pannosa</i>.</i>	38
Figura 5. <i>Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente agua que permitan el mayor control biológico sobre <i>S. pannosa</i> var. <i>rosae</i>.</i>	39
Figura 6. <i>Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente etanol de caña que permitan el mayor control biológico sobre <i>S. pannosa</i> var. <i>rosae</i>.</i>	40
Figura 7. <i>Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente etanol comercial que permita el mayor control biológico sobre <i>S. pannosa</i> var. <i>rosae</i>.</i>	40
Figura 8. <i>Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente hidrolato que permita el mayor control biológico sobre <i>S. pannosa</i> var. <i>rosae</i>.</i>	41
Figura 9. <i>Resultados del análisis de varianza respecto al mejor tratamiento que permita el mayor control biológico sobre <i>S. pannosa</i> var. <i>rosae</i>.</i>	42
Figura 10. <i>Concentración de conidios/mL. para cada método de obtención del extracto de <i>P. carpunya</i> a través del tiempo de observación.</i>	43

Figura 11. Cromatograma del extracto macerado de <i>P. carpunya</i> en agua.	45
Figura 12. Cromatograma del extracto macerado de <i>P. carpunya</i> en etanol de caña.	46
Figura 13. Cromatograma del extracto macerado de <i>P. carpunya</i> en etanol comercial.	46
Figura 14. Cromatograma del extracto de <i>P. carpunya</i> hidrodestilado.	48

ABREVIATURAS

L: Litros

mL: Mililitros

μL: Microlitros

min: Minutos

h: Hora

nm: Nanómetros

mm: Milímetros

μm: micrómetros

m: Metros

GC-MS: Cromatografía de gases acoplado a masas

ME1: Macerado en etanol comercial al 30 %

ME2: Macerado en etanol comercial al 30 %

ME3: Macerado en etanol comercial al 90 %

MA1: Macerado en agua al 30 %

MA2: Macerado en agua al 60 %

MA3: Macerado en agua al 90 %

MC1: Macerado en alcohol de caña al 30 %

MC2: Macerado en alcohol de caña al 60 %

MC3: Macerado en alcohol de caña al 90 %

HD1: Hidrodestilado al 30 %

HD2: Hidrodestilado al 60 %

HD3: Hidrodestilado al 90 %

% R: Porcentaje de rendimiento

RESUMEN

El mildiú polvoso es una enfermedad criptogámica de relevancia en la producción y exportación de rosas a nivel mundial. Una de las alternativas propuestas para su regulación es mediante el empleo de extractos vegetales que actúen como agentes antifúngicos. Por este motivo, en el presente estudio se examinaron extractos vegetales de la especie arbustiva *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) para determinar si influyen significativamente sobre el número de conidios del fitopatógeno *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. observados *in vitro* en cámara de Neubauer. En su ejecución se seleccionaron muestras de hojas de la especie vegetal para someterlas a procesos de extracción (hidrodestilación y maceración) en 3 diferentes solventes (etanol comercial, alcohol de caña y H₂O_a estéril) a diluciones 30, 60 y 90 %; con los objetivos de determinar el método de extracción y la dilución más eficaz que permitan un mejor control biológico sobre esporas del patógeno *S. pannosa* var. *rosae*; y establecer los posibles metabolitos secundarios mayoritarios presentes por CG-MS. Para lo que, se contabilizó número de conidios presentes por mililitro en suspensión después de añadido el extracto al transcurrir de 0 -12 y 24 horas. Los resultados obtenidos indican que el método de extracción por hidrodestilación al 90 % fue el más efectivo contra la presencia de esporas *in vitro*. Adicionalmente, se comprobó que todos los extractos tenían en su composición química metabolitos de reconocida actividad antimicrobiana. Estos resultados podrían incentivar futuras investigaciones que permitan aislar compuestos para utilizarlos como sustancias promisorias para el control del mildiú polvoso en el rosal.

Palabras clave: *Sphaerotheca pannosa*,

FITOPATÓGENO,

Piper carpunya.

ABSTRACT

Powdery mildew is a relevant cryptogamic disease in the production and export of roses worldwide. One of the alternative proposals for its regulation is through plant extracts that could act as antifungal agents. For this reason, in the present study plant extracts of the species *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) were examined to determine if they significantly influence the conidia number of the phytopathogen *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* observed *in vitro* in Neubauer's chamber. In its execution, leaf samples of the plant were selected to undergo extraction processes (hydrodistillation and maceration) in 3 different solvents (commercial ethanol, cane alcohol, and sterile H₂O) at 30, 60 and 90% dilutions; with the objectives of determining the most effective extraction method and the dilution that allow a better biological control on the spores *S. pannosa* var. *rosae* pathogen; and establishing the possible major secondary metabolites present by CG-MS. To do so, the number of conidia present per milliliter in suspension was counted after adding the extract at 0-12 and 24 hours. The results obtained indicate that the 90% hydrodistillation extraction method was the most effective against the presence of *in vitro* spores. Additionally, it was proved that all the extracts had in their chemical composition metabolites of recognized antimicrobial activity. These results could allow future research to isolate these vegetable compounds as promising substances for the control of powdery mildew in the rose bush.

Key words: *Sphaerotheca pannosa*,

PHYTOPATHOGEN,

Piper carpunya.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES.

El hongo *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, causante de la enfermedad mildiú polvoso, se ha convertido en uno de las grandes limitantes en la producción y exportación de rosas a nivel mundial, dada su incidencia y destrucción de la calidad de las rosas en invernaderos y campos de cultivo. Se estima que este fitopatógeno es el autor de alrededor de 20 al 40 % de pérdida de productividad florícola en exportaciones (Ortega, 2011). Según Agrios (2004) este hongo se encuentra dentro del grupo de fitopatógenos de más difícil manipulación debido al ciclo de vida que posee, su permanencia en el huésped en todos los meses del año, y las limitadas opciones para su control que existen disponibles en el mercado, con los altos costos que los mismos implican.

Su manejo actualmente consiste en el uso prolongado de agroquímicos protectantes y sistémicos con compuestos azufrados y triazoles (Perilla & Sanabria, 2007). Pero, su empleo presenta distintos tipos de problemas relacionados con la aparición de grupos resistentes a este tipo de fungicidas e incrementa la contaminación del campo (Neira, 2010). Ortega (2011) sostiene que el control químico continuo llevado a cabo por la incidencia del patógeno no siempre es una decisión acertada, pues se ha observado que pueden surgir aislamientos de grupos resistentes que logran sobrevivir durante varios años en el campo y que consiguen atacar con más fuerza a los cultivos florales.

Así mismo, la aplicación de los fungicidas promueve la filtración de compuestos dañinos que arrastrados por el viento, cursos de aguas continentales, corrientes marinas y/o a través de las

cadena biológica, alteran al equilibrio del medio ambiente (Sánchez Martín & Sánchez Camazano, 2006).

Adicionalmente, en un análisis del Departamento de Agronomía UF/IFAS – Florida, sobre Perfil Toxicológico de Plaguicidas derivados de los compuestos conjugados de Triazoles (2014) la exposición del ser humano a este tipo de fungicidas lleva consigo riesgos que deben ser tomados en cuenta en su manipulación y empleo, pues muchos de estos químicos tienen efectos adversos que dañan la piel, los pulmones y los ojos de los implicados. Las personas más afectadas son aquellas que por exposición laboral tienen contacto con este tipo de compuestos que pasan a través de la vía inhalatoria y la vía dérmica.

Por ello, el sector florícola internacional busca actualmente alternativas sustentables que le permitan un manejo integral del cultivo que aspire a reducir o eliminar el uso de plaguicidas y así minimizar el impacto ambiental y social dentro de un margen sostenible para el cultivo de rosas (Alvarez *et al.*, 2007).

El uso de extractos vegetales es una opción agroecológica moderna que puede emplearse para combatir los diversos microorganismos que atacan a las plantas, sustituyendo la aplicación de agroquímicos dañinos (Cárdenas *et al.*, 2016); y que abre paso a un sector comercial aun no muy explorado en nuestro país para la producción de rosas orgánicas comestibles, que a diferencia del cultivo tradicional requieren plaguicidas naturales, potencializando el uso de extractos de origen vegetal (Revista Líderes, 2015).

1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER.

Ecuador es un país en desarrollo que depende mucho de los productos primarios de exportación como fuente de divisas y empleo (Expoflores, 2016). En el caso del sector florícola su producción genera más de 105 mil empleos directos e indirectos. Además, sus exportaciones representan aproximadamente \$ 800 millones de dólares anuales al país (Diario El Telégrafo, 2015; Ministerio del Comercio Exterior, 2014). En la actualidad, existen más de dos mil 500 hectáreas cultivadas de flores; siendo las flores de corte las más solicitadas (Noticias Telesur, 2016). Dentro de las flores de corte las rosas son las que representan un mayor rubro económico y constituyen los ornamentales con mayor extensión de siembra en el país (Cervantes, 2014). En el 2016, Ecuador registro 15 mil 623 toneladas de rosas vendidas por el día de los enamorados, lo que significó un aumento del siete por ciento en las exportaciones de flores comparadas con el 2015 (Noticias Telesur, 2016). Por esta razón, la actual coyuntura económica de la agroindustria florícola es una de las más significativas convirtiéndola en una de las pocas áreas donde la investigación tiene aún espacio y financiamiento, esto hace que alternativas “vanguardistas” para su manejo sean discutidas y ensayadas continuamente (Cervantes, 2014).

Vásquez (2013), manifiesta que el uso de extractos botánicos debe ser considerado como una nueva alternativa natural para reemplazar los plaguicidas sintéticos; pues ofrecen seguridad para el ambiente y son una eficiente opción agronómica. Ecuador debido a la fecunda biodiversidad que posee a disposición, se vuelve un candidato idóneo para el control de plagas aprovechando extractos vegetales naturales. Estudios de control de plagas con extractos botánicos de plantas que se encuentran disponibles en el país, ya han tenido resultados agronómicamente y económicamente viables para el floricultor (Vásquez, 2013).

Es por ello que el presente trabajo de investigación tiene como fin utilizar el extracto vegetal obtenido por maceración e hidrodestilado de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.); una planta endémica del Ecuador, también conocida como “*pinku*”; para evaluar su efecto antagonista sobre *S. pannosa* como alternativa natural para el control del mildiú polvoso en el rosal, enfermedad que se considera una de las más frecuentes en rosas de exportación y que afecta significativamente al proceso productivo y a la calidad del producto.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

1.3.1 Objetivo general del proyecto.

Evaluar *in vitro* la actividad biológica antifúngica del extracto vegetal de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) sobre *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Determinar el mejor método de extracción de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) que permita el mayor control biológico sobre *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*;
- Establecer la mejor dilución 30, 60, 90 % por solvente del extracto de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) para conseguir el mayor control biológico del fitopatógeno *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*;
- Caracterizar la composición bioquímica de los metabolitos secundarios descritos en el extracto vegetal de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) mediante cromatografía de gases.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Cultivo de rosas en el Ecuador.

2.1.1 Generalidades.

En el Ecuador el desarrollo florícola tiene su aparición en 1964 una vez que se despliegan la infraestructura y logística necesarias para la obtención de *gypsophila*, *limonium*, *liatris*, *aster*, *claveles* y muchas otras flores de verano (Ortega, 2011). Sin embargo, no es hasta la década de los 80 con el cultivo de *rosas* en la provincia de Pichincha que se abre la posibilidad de exportar flores al mercado internacional (Vásquez, 2016).

Esta prospectiva favorable permitió la expansión de cuantiosas plantaciones de rosas hacia otras provincias de la sierra como Imbabura, Cotopaxi, Cañar, Tungurahua, Azuay y Carchi. Provincias que por poseer las condiciones de luminosidad, humedad y temperatura propicias para el cultivo dieron auge a rosas con características únicas y especiales, como son: tallos gruesos, largos y totalmente verticales; botones grandes con colores sumamente vivos y con una mayor durabilidad; volviéndose muy apetecidas por países extranjeros (Bastidas, 2016).

Actualmente, las rosas se encuentran entre uno de los cultivos ornamentales más importantes desde el punto de vista económico de nuestro país; con más de 60 variedades cultivadas, incluidas las rosas rojas más cotizadas como: “*Freedom*”, “*First Red*”, “*Classi*”, “*Dallas*”, “*Mahalia*”, “*Madame Del Bar*” y “*Royal Velvet*”; así como variedades amarillas, entre ellas: “*Allsmer Gold*” y la “*Skyline*”; son las que representan un 80 % de las exportaciones anuales para el país (Álvarez, 2013). Los principales mercados compradores de flores ecuatorianas son

Estados Unidos con un 59 %, seguido por la Unión Europea (UE) con el 38,6 % (Diario El Comercio, 2017). Y pese a la creciente oferta que ha emergido en estos últimos años con la producción de flores colombianas, etíopes y keniatas, las rosas ecuatorianas siguen manteniéndose como líderes en el mercado internacional (Expoflores, 2015).

Esta dinámica evolutiva que ha sufrido el sector florícola ha sido fruto del desarrollo y adaptación de técnicas ideadas para mantener la competitividad de nuestro producto a base de incrementar su calidad, y así asegurar que las rosas ecuatorianas continúen siendo las flores preferidas por los países importadores (Yong, 2004b). Hoy en día, las mejoras en el cultivo de rosas se concentran en producir flores orgánicas, de acuerdo a la necesidad de certificación ambiental ahora exigida por algunos mercados internacionales (Neira, 2010).

2.1.2 Taxonomía.

Las *Rosas sp.* son arbustos ornamentales que alcanzan los 12 m de altura cultivados principalmente por sus hermosas flores, con características representativas como: diversidad de colores, olores y atractivo follaje, floración continua entre otros (Yong, 2004a). Su clasificación botánica es la siguiente:

Tabla 1.

Clasificación botánica de las rosas.

<i>Reino</i>	<i>Vegetal</i>
<i>Phylum:</i>	Deuteromycota
<i>Clase:</i>	Deuteromycetes
<i>Orden:</i>	Monilial

CONTINÚA

<i>Género:</i>	<i>Oidium</i>
<i>Especie:</i>	<i>leucoconium</i>

Fuente: (Yong, 2004a)

2.1.3 Manejo y Comercialización.

Para el cultivo masivo de rosas dependiendo de la zona se suelen utilizar invernaderos bajo factores de temperatura, humedad y luminosidad controlados. De esta manera se consigue producir rosas en épocas y lugares en los que de otra forma no sería posible (InfoAgro, 2016). Para ello, estos invernaderos deben cumplir unas condiciones mínimas: tener grandes dimensiones Mín. (50 x 20), transmisión de luz abundante Mín. (6 horas de emisión solar diarias), humedad relativa menor al 60 %, y por otro lado una temperatura alrededor de los 25°C (InfoAgro, 2016; Brown-Pérez *et al.*, 2013).

Para su multiplicación se utilizan cuatro principales técnicas en cultivo: por semilla, acodo, injerto y esqueje. Sin embargo, no todos estos métodos pueden aplicarse a todas las variedades o cultivares de rosas. La propagación por semilla por ejemplo solo se hace para producir nuevas variedades de plantas, pues las rosas así obtenidas varían considerablemente en sus características genéticas convirtiéndose en un proceso poco aplicable a gran escala. Por otro lado, la multiplicación por acodo se utiliza generalmente en rosales con tallos largos y flexibles donde alcanza un mayor rendimiento. Por lo tanto, la elección básica oscila entre el injerto y el esqueje (Yong, 2004a).

El método de propagación que más popularidad ha alcanzado en los viveros por su alta facilidad de replicación es a través de las estacas o esquejes, en el cual, se logra copiar exactamente las características del progenitor basándose en la facultad que poseen ciertas partes del vegetal de reconstruir todos sus órganos cuando se les proporcionan condiciones específicas; pero numerosos autores plantean diversos inconvenientes con respecto a su uso. Es por esto que muchas veces la mayoría de los rosales que se cultivan con fines comerciales se producen por injertos, lo cual implica la inserción de una yema u "ojo" de la variedad seleccionada en forma de T en el tallo de la otra planta (Yong, 2004a).

Al realizar la comercialización de las flores, las empresas productoras primero buscan rosas que posean todos los estándares de calidad exigidos por el cliente, las flores que no cumplan con estas características se separan y son vendidas en el mercado local a compradores ya establecidos (Lorena López, 2009). Entre los atributos que demandan las rosas de exportación son: longitudes de tallo que van desde los 40 cm hasta los 80 cm, tamaño de botones entre los 4 a 5 cm, grosor del tallo con un min. 4mm y max. de 1 cm. Además, la flor debe de encontrarse en un estado óptimo con una apertura de 2 a 3 pétalos externos (Mejía & Cuaran, 2004). Para su transporte, las rosas se agrupan en un número de 12 o 25 rosas en una caja tipo tabaco; y el lugar donde se almacenan debe ser aireado y refrigerado garantizando su vida máxima (Bravo & Del Castillo, 2005).

2.1.4 Importancia Económica.

Según Proecuador (2013), Ecuador es considerado uno de los países sudamericanos con mayor nivel de exportación de flores de corte, como: rosa, crisantemo, tulipán, liliun, gerbera, clavel y orquídea, lo cual, constituye un importante ingreso económico del capital que se mueve

dentro y fuera del país. Actualmente, la industria florícola ecuatoriana genera alrededor de 820 millones de dólares en divisas y más de 100 mil plazas de empleo, que contribuyen a su crecimiento sustentable (Diario El Telégrafo, 2016).

Las rosas son las flores de corte más vendidas alrededor de todo el mundo; en especial en países como: Estados Unidos, Rusia, Los Países Bajos, Canadá, Italia, Ucrania y España; en donde tienen bastante aceptación (ProEcuador, 2013). Ecuador, como proveedor de este producto, posee el 18.5 % de participación en las exportaciones mundiales, ubicándose como el segundo mayor abastecedor de rosas del mundo (ProEcuador, 2015).

En el primer semestre del 2016 las exportaciones de rosas alcanzaron un rubro de ingresos por 327 millones de dólares con una participación del 5.9 %, ocupando de esta manera el cuarto lugar dentro de la lista de los principales productos no petroleros de exportación (ProEcuador, 2016). En el transcurso del presente año, por temporada del día de las madres, el volumen de exportación creció un 3 % más que la temporada anterior figurando como uno de los productos líderes en el mercado mundial (Diario El Telégrafo, 2017), con estrategias anticipadas para abrirse paso a mercados como China y Australia (Diario Metro, 2017). Pero, sin llegar aún al nivel de ingresos económicos deseado, pues la crisis económica internacional no ha permitido obtener las ganancias anheladas (BCE, 2014).

El Impacto económico en beneficio de las empresas florícolas del país toma en cuenta el costo de producción de cada flor, la producción anual de tallos por hectárea, el precio promedio que se paga en el mercado por cada flor, y el porcentaje de producción que cada empresa destina

para la exportación, además, de la influencia del sello verde (Torres, 2004). Según Martínez (2016), lo más difícil en los últimos años ha sido operar con el alto costo de producción más el precio caído de la flor. Su meta es obtener un crecimiento exponencial de ingresos sin un incremento en el costo de manufactura o perdiendo la calidad, variedad y responsabilidad ambiental con que la flor ecuatoriana se cultiva.

Una percepción visionaria fomenta la industria con certificación de sello verde, una inversión que genera réditos como se aprecia en el mayor precio de sus productos; además del beneficio que se manifiesta en la sociedad por la protección al medio ambiente, al trabajador y a las comunidades aledañas a las plantaciones (Torres, 2004). Cabe resaltar, que la producción de productos ecológicos también lleva consigo la ampliación a nuevas áreas parcialmente exploradas como en el ámbito culinario (Diario El Universo, 2010).

2.2 Enfermedades en plantas causadas por hongos.

Entre las enfermedades derivadas de plantas, las fúngicas representan el porcentaje más importante; siendo los agentes causales hongos parásitos que producen estructuras en la superficie del huésped o dentro de sus tejidos, que al ser observados muchas veces a simple vista ayudan a su identificación (Sánchez, 2015).

2.2.1 Importancia Económica.

Las enfermedades causadas por hongos pueden transformarse en factores limitantes para la producción y comercialización de las mismas, provocando pérdidas económicas a productores o comercializadores y disminuyendo también la vida útil de la planta (Sepúlveda, 2017).

Algunos géneros y especies de hongos presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo; originando pérdidas económicas que ascienden a miles de millones de dólares al año, por el daño que ocasionan en las cosechas y por el coste de fungicidas necesarios para su control (Rodríguez, 2001). Las principales enfermedades causadas por hongos son mildiús, oídios, royas, chancros, antracnosis, negrillas, botrytis, entre otras (Abiomed, 2015).

Mildiús.- Junto al oídio es uno de los problemas más comunes que se encuentran en diversas plantas de jardines y huertas. Empieza a aparecer en las hojas, tallos y espigas de algunas plantas como unas manchas blancas y una especie de moho blanquecino que hará que la hoja caiga cuando la infestación perdura. Se ve favorecido también por condiciones climáticas ideales en torno a los 24°C con cierta humedad (Infojardin, 2015b).

Oídios.- Es una enfermedad estacional, recurrente en épocas de primavera y otoño, en las cuales, las condiciones climáticas favorecen la aparición de un polvillo blanco o grisáceo característico del patógeno, que posteriormente se convierte en manchas amarillas hasta que se deforman, se secan y se caen (Infojardin, 2015c).

Royas.- Son causadas dependiendo del tejido vegetal por diversos tipos de hongos que ocasionan pústulas o heridas en la superficie del haz de las hojas donde surgen masas polvorosas de colores anaranjados, amarillos o blanquecinos; pero en ataques graves pueden hacerlo también en los tallos y a las espigas (Chacon, 2010b).

Chancros.- Lo produce un hongo patógeno al caer sobre una herida o grieta del tejido vegetal, penetrando por ella y al germinar ahí; ocurre por lo general cuando existen cortes por poda

o cicatrices. El síntoma más característico consiste en la presencia de chancros sobre el tronco, ramas o renuevos, los cuales, provocan un anillamiento impidiendo así la circulación de la savia y dando como resultado la muerte de los brotes o ramas por encima de la lesión (Infojardín, 2015a).

Antracnosis.- Es producida por hongos que causan la desintegración de los tejidos sobre todo cuando existen ambientes cálidos y húmedos; dando lugar a manchas negras y hundidas en forma de úlcera que aparecen sobre hojas, tallos, flores y frutos de numerosas plantas de los jardines; pueden aparecer también rayas de color marrón oscuro en la punta de las hojas (Chacon, 2010a).

Botrytis.- Se encuentra ampliamente distribuida en hortalizas, plantas ornamentales, y/o frutales en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones del fruto, pero también como chancros o pudriciones del tallo, ahogamiento de las plántulas, manchas foliares y como pudriciones del tubérculo, como un bulbo y raíces. En condiciones húmedas se revela como una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados (Orlando, 2009).

Negrillas.- El daño que produce es más estético; ya que, las hojas se cubren de una fea capa negra. Sin embargo, si los ataques son muy fuertes pueden interferir en la fotosíntesis y disminuir el ritmo de su crecimiento; pero, si la planta es resistente al: pulgón, la cochinilla o la mosca blanca, lo será también a este hongo; ya que, solo se ven infectadas por este fitopatógeno tras sufrir el ataque de estas plagas (Aialanet S.L, 2016).

2.3 Mildiú polvoso.

2.3.1 Generalidades.

El mildiú polvoso, también denominado cenicilla polvorienta u oídium es una enfermedad de las más comunes, conspicuas, difundidas y fácilmente reconocibles (Agrios, 2005). Su prevalencia en los cultivos depende de varios factores, incluida la variedad, edad y estado de la planta; además de las condiciones climáticas y geográficas que le permitan su rápida diseminación (Pataky, 2000). Se presenta en una gran variedad de cultivos ornamentales, vegetales y frutales como: las azaleas, lilas, ligustros, rosas, tulipanes, begonias; entre otras, incluyendo los cerezos, duraznos, olmos ingleses, sauces, entre otros (Neria, 2010; Nikada, 2011).

Las plantas más sensibles al ataque de este hongo son el Rosal, Evónimo, Geranios, Dalias, Phlox paniculata, entre otros (Roque, 2012). En el rosal, por ejemplo, aparece año tras año favorecidas por condiciones muy húmedas (en torno al 70-80 %) y temperatura moderada, desapareciendo en pleno verano siempre que se encuentren por encima de los 35 °C. Pudiendo llegar a ser un enfermedad muy grave en invernaderos de fincas cercanas a un río donde la humedad es más alta y la temperatura no sobrepasa los 32 °C (Ortega, 2011).

2.3.2 Taxonomía.

Existe una gran diversidad de hongos que provocan la enfermedad conocida como mildiú polvoso u oídium, todos pertenecientes a la familia *Erysiphaceae*, pero agrupados en géneros distintos de acuerdo a su biología reproductiva (Hansen, 2009).

Como en algunas especies de hongos, el fungo patógeno causante del mildiú polvoso puede coexistir con ambas formas reproductivas en el mismo organismo. En los rosales la fase dominante se encuentra en su estado vegetativo, asexual o anomorfo, clasificado taxonómicamente como *Oidium leucoconium* (Tabla 2.); el cual, exhibe características pertenecientes a un hongo deuteromicetes por presentar muchas veces solo una fase conídica en su ciclo de vida (Perilla & Sanabria, 2007). Por otra parte, su fase sexual, perfecta o telemorfa, raramente vista, clasificada taxonómicamente como *Sphaerotheca pannosa*, pertenece al grupo de hongos concernientes a los ascomicetes debido a la formación de un cuerpo fructífero o ascocarpo también denominado cleistotecio característicos de esta división.

Tabla 2.
Clasificación taxonómica del fitopatógeno causante del mildiú polvoso

<i>Fase Sexual</i>		<i>Fase Asexual</i>	
Reino:	Fungi	Reino:	Fungi
Phylum:	Ascomicota	Phylum:	Deuteromycota
Clase:	Ascomycetes	Clase:	Deuteromycetes
Subclase	Erythromycetidae	Orden:	<i>Monilia</i>
Orden:	<i>Erysiphales</i>	Género:	<i>Oidium</i>
Familia:	<i>Erysiphaceae</i>	Especie:	<i>leucoconium</i>
Género:	<i>Sphaerotheca</i>		
Especie:	<i>pannosa</i>		

Fuente: (Perilla & Sanabria, 2007)

2.3.3 Biología y epidemiología en el rosal.

Los hongos causantes del mildiú polvoriento son parásitos biotrófos obligados, lo que significa que sólo pueden sobrevivir en células de huéspedes vivos; y por lo tanto, no pueden cultivarse en medios de nutrientes artificiales (Agrios, 2005). En condiciones favorables como una temperatura de 32 °C y humedad que supere al 23 %, las infecciones por *Oidium leucoconium* inician (Pataky, 2000).

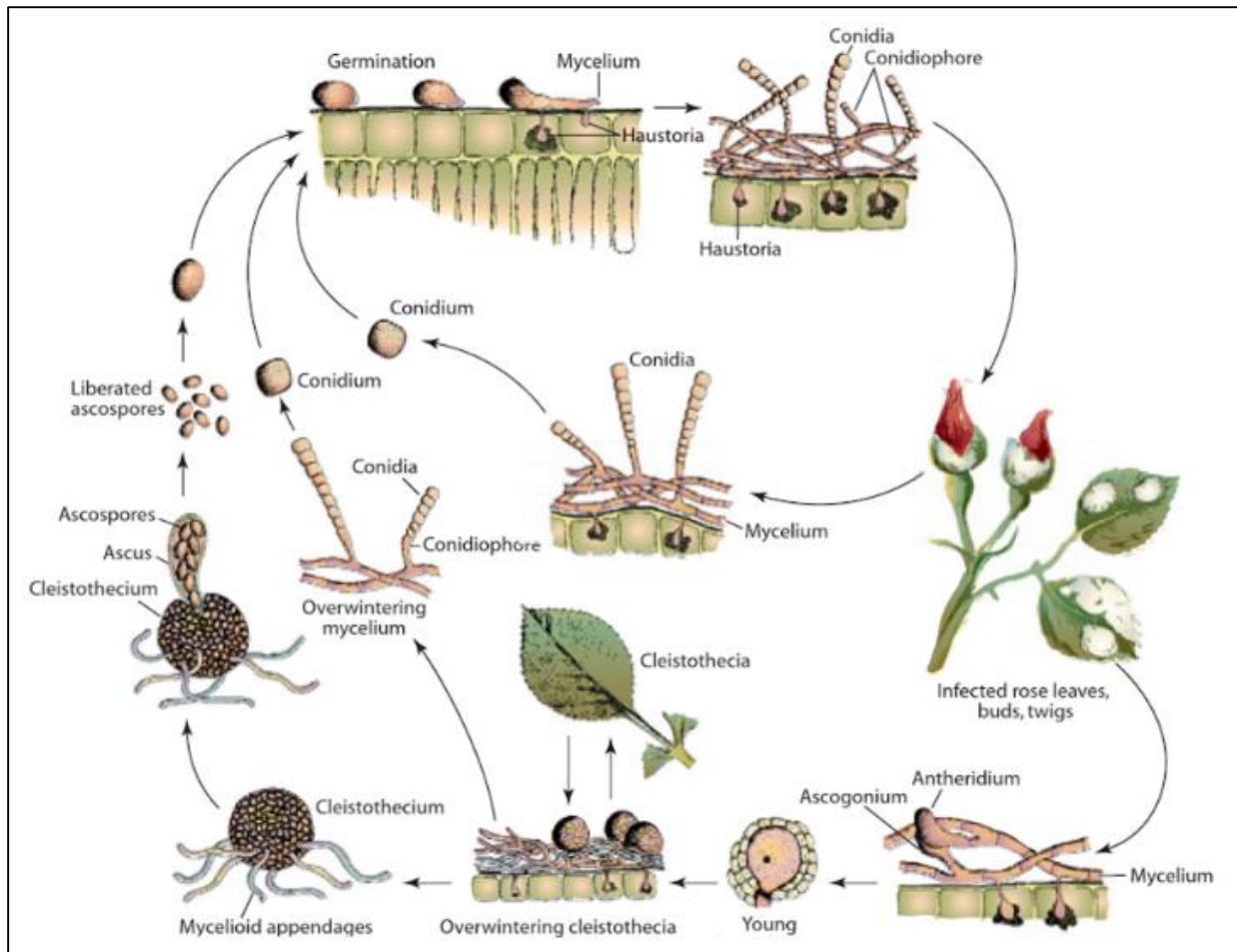


Figura 1. Ciclo de biológico del mildiú polvoroso

Fuente: (Agrios, 2005)

En infecciones por *Oidium* los conidios una vez que tocan la superficie de tejidos vegetales germinan alrededor de las 3 horas; dando lugar rápidamente a una cadena o conjunto de hifas con paredes celulares septadas (micelio). El micelio, para la obtención de nutrientes y fijación al huésped, penetra las células epidérmicas por medio de haustorios globulados. Consecutivamente, el micelio desarrolla hifas cortas y erectas que toman el nombre de conidióforos, estructuras especializadas en su producción asexual. En la punta de cada conidióforo, se producen cadenas de 5 a 10 conidios elipsoide-ovoides (esporas asexuales) que pueden dar lugar a un nuevo ciclo de la enfermedad esparcidos por el viento, el agua de lluvia o el deslizamiento de las gotas de rocío en un periodo de 72 a 96 horas (Márquez, 2009; Pataky, 2000).

Con la llegada de temperatura y humedad relativa bajas, la producción de conidios se suprime y empieza el ciclo de vida sexual del hongo (*Sphaerotheca pannosa*); el cual, se origina a partir del apareamiento complementario de dos hifas pertenecientes a grupos sexuales distintos, el anteridio y el ascogonio; dando lugar al cuerpo fructífero, cleistotecio o ascocarpo (estructura especializada en la reproducción sexual). A partir del cleistotecio se despliegan varios apéndices miceliales o hifas hacia el tejido vegetal, que proveen de los nutrientes y adherencia que necesita. Consecutivamente, del cleistotecio emergen hifas ascógenas denominadas ascas (estructura sexual productora de esporas) que al estar maduras se rompen liberando 5 a 10 esporas elipse-ovoides (Agrios, 2005; Pârvu & Pârvu, 2012).

2.2.4. Sintomatología.

A diferencia de la mayoría de patógenos fúngicos, los hongos causantes del mildiú polvoso tienden a crecer superficialmente o epifíticamente; produciendo un visible crecimiento blanco a

grisáceo del micelio sobre todo en las partes verdes de activo crecimiento, como: hojas, brotes y botones florales; que aparecen tanto en el envés como en el haz de la hoja (SATA, 2010; Heffer *et al.*, 2006). En condiciones favorables, crecimiento de este fungo patógeno empieza a extenderse a otras partes de la planta, como sus hojas más viejas, haciendo que poco a poco las zonas afectadas lleguen a encresparse y deformarse, hasta la defoliación (SATA, 2010). Y conforme se expanden el patógeno puede llegar a atacar a tallos, espinas, flores, sépalos, receptáculos, pétalos; inclusive sus yemas, disminuyendo considerablemente el vigor de las plantas y deteriorando la calidad de las rosas (Bayer, 2014).

Las pérdidas económicas que genera esta enfermedad en los rosales se deben a una depreciación en el valor estético de la planta, incluyendo la producción de menos botones florales o de peor calidad, una reducción en el crecimiento de la planta o la muerte de la misma, que es rara (Agris, 2005).

2.2.5. Morfología.

La forma más prevalente del hongo causante del mildiú polvoso en invernaderos es fácilmente apreciable sobre partes infectadas de una planta como un polvo blanco a grisáceo que crece superficialmente en capas finas de micelio. Bajo el microscopio se puede observar su estructura como hifas hialinas superficiales de un diámetro medio de 4,7 a 6,0 μm ; que poseen de 2 a 5 ocasionalmente 6 conidios elipsoide-ovoides o en forma de barril que miden 14,3 x 29,0 μm , producidos en cadenas desde el ápice de conidióforos no ramificados, que tienen una longitud total aproximada de 54,9 a 98,0 μm ; derivadas de células de pie rectas de 24,9 a 53,6 μm de largo

y de 8,2 a 9,8 μm de diámetro aproximado (a través de su parte media) (Tabla 5.) (Félix *et al.*, 2014).

La fase sexual del hongo es infrecuente, encontrándose rara vez en cleistotecios, que tienden a establecerse en grupos apreciables sobre las partes infectadas de una planta. Bajo el microscopio los cleistotecios se perciben de color pardo o negro, con forma globosa y un tamaño aproximado de 70-120 μm de diámetro. En la mitad inferior poseen apéndices cortos (de 0,5 a 2 veces el diámetro del cuerpo fructífero), septados e hialinos o de color pardo-amarillentos. Y en su interior se distingue una única asca elipsoide u ovoide (70-100 x 50-80 μm) con entre cuatro y ocho ascosporas unicelulares que miden 16-28 x 9-18 μm (Campelo *et al.*, 2000).

2.2.6. Control del patógeno.

El método de propagación del mildiú polvoso en los rosales por medio de esporas de fácil, rápida y continua disseminación, hace que los floricultores tengan que aplicar varias técnicas de manejo y cultivo que logren de cierto modo reducir la infestación y dispersión de la enfermedad. Por ejemplo: no plantando demasiado denso ni tupido, para evitar que se produzcan sombras y humedades; donde, se suele desarrollar efectivamente la infección (Bayer, 2015). Adicionalmente, es recomendable evitar la sobre nutrición de los cultivos para evitar el brote muy a menudo de tejidos nuevos que tienen una alta susceptibilidad al ataque del fitopatógeno (Perilla & Sanabria, 2007).

Otros sistemas de control se basan en el uso de variedades resistentes de rosa aunque muchas veces resultando contraproducente, al desarrollar el fungo patógeno la habilidad de atacar a este y otros tipos de cultivo (Perilla & Sanabria, 2007). Sin embargo; el método más empleado

consiste en el uso prolongado de agroquímicos como medida preventiva, sobre todo cuando se entiende que existe una condición favorable para su desarrollo o una vez adquirida la enfermedad (Bayer, 2015).

Los fungicidas a los que se recurren son primero de contacto y posteriormente sistémicos; siempre que se apliquen dentro de las primeras 24-48 horas posteriores a la infección; es decir, antes de que el hongo afecte la calidad del cultivo de las rosas de exportación. Muchas veces complementándose con la poda de todas las partes dañadas y material afectado para que no contagie otras partes del cultivo (Morales, 2015). Entre los fungicidas preventivos más eficaces se utilizan los compuestos azufrados y triazoles; que incluyen al Dinocap, Bayleton CA, Duplex, KB anti-oidio universal y el Meltatox (Morales, 2015).

Cabe mencionar también que existe una línea de productos alternativos caracterizados por ser amigables con el ambiente para el control de la enfermedad, entre los que se encuentran los de origen vegetal, de origen biológico, bioles, entre otros que les permite actuar como antagonistas de patógenos bióticos y de plagas (Panjón & Vintimilla, 2008).

2.4 Extractos Vegetales.

2.4.1 Generalidades.

Los extractos vegetales son bioproductos de las plantas, que se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural con principios activos, que no son estrictamente necesarios para el crecimiento o reproducción de la planta; pero que muchas veces forman parte de las estrategias defensivas de la misma, inhibiendo, repeliendo, disuadiendo o

eliminando plagas y enfermedades de distinto tipo; por cual, pueden ser utilizados como una alternativa control, dentro de las nuevas tendencias en el marco de una agricultura sostenible y en reemplazo de los plaguicidas sintéticos (Díaz, 2012).

2.4.2 Métodos de obtención de extractos vegetales.

Existen muchos métodos de obtención de extractos vegetales; sin embargo, a menudo se utilizan los procesos extractivos más simples o convencionales, estos se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

Extracción con agua: infusión, destilación por arrastre de vapor y decocción

Extracción con solventes orgánicos: maceración, lixiviación o percolación, extracción Soxhelt, digestión y por fluido supercrítico

La selección de uno de los métodos dependerá siempre de las necesidades y facilidades tanto técnicas como económicas con la que se disponga para la extracción (González, 2004).

2.4.3 Destilación por arrastre de vapor.

Esta técnica es llamada comúnmente también hidrodestilación, extracción por arrastre, hidrodifusión o hidroextracción usa vapor sobrecalentado o saturado, que fluye a través del material vegetal para calentar la materia prima y así liberar los componentes volátiles de la muestra, que son condensados por un refrigerante, y del cual se obtiene un extracto líquido (hidrolato) y el aceite esencial de las células vegetales (Cerpa, 2007; Rodríguez *et al.*, 2012).

2.4.4 Maceración.

La maceración es una técnica de extracción donde la materia prima, debidamente fragmentada, se coloca en un solvente (agua, etanol o metanol) durante un tiempo prolongado o hasta que penetre y disuelva los principios activos de las porciones solubles. Este proceso genera dos productos, el sólido propio del extracto y el líquido de extracción; que pueden ser empleados de acuerdo a las necesidades del usuario (González, 2004).

2.5 Familia *Piperaceae*.

2.5.1 Generalidades.

La familia *Piperaceae* cuenta con más de 3610 especies agrupadas de 10 a 12 géneros, de los cuales, el más representativo es el género *Piper*, debido a la diversidad de especies contenidas en él que son empleadas en una gran variedad de industrias, como: la alimenticia, farmacológica y agrónoma, representando una gran importancia económica (Riofrío, 2012).

Entre las especies comprendidas en la familia de *Piperáceas* se encuentran: arbustos, hierbas o enredaderas y muy rara vez árboles, todos los cuales, están distribuidos a nivel mundial, principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Parra, 2011).

Estas plantas exhiben hojas que pueden o no tener glándulas aromáticas; pero que a lo largo se han utilizado tradicionalmente como: insecticidas, especias y fitomedicamentos; razones por las que, en varias de sus especies se han descrito diferentes actividades biológicas, entre las que se destacan la insecticida, antiparasitaria y antifúngica como las observadas en: *P. hispidium*, *P.*

tuberculatum, *P. arboreum*, *P. scutifolium*, *P. hoffansggiam* y *P. ridleyi* contra el hongo del género *Cladosporium* (Parra, 2011).

2.5.2 Especie de estudio: *Piper carpunya*.

Piper carpunya es un arbusto de 2 a 6 m. altura que habita principalmente en los Andes y en la Amazonía a una altitud de 1.000 a 2.000 m.; siendo una especie endémica de las regiones del norte de América del Sur, donde se la conoce también como: guaviduca y se la caracteriza sencillamente por el olor que desprende de sus hojas, ampliamente utilizadas en la medicina popular del Ecuador, sobre todo en las poblaciones cercanas a Loja y Zamora Chinchipe, que lo usan para enfermedades relacionadas con constipación intestinal, inflamación y además como protector gastrointestinal (Parra, 2011). Sin embargo, también se ha corroborado que tiene propiedades antifúngicas significativas sobre todo frente a *Candida albicans*, lo que demuestra su potencial como alternativa para el control de plagas y enfermedades producidas por hongos (Riofrío, 2012).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Participantes.

El presente proyecto titulado ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO VEGETAL DE *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) SOBRE *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, se llevó a cabo por Marcela Monserratte Cisneros Flores como ejecutora y el Dr. Carlos Cárdenas en calidad de Docente y Asesor del mismo. Cabe mencionar que contó con colaboraciones de la florícola “Chimbacalle roses” ubicada en la parroquia de Pedro Moncayo Tabacundo – Ecuador y la participación del Dr. Paco Noriega, docente investigador de la Universidad Politécnica Salesiana para la ejecución del análisis cromatográficos, en los laboratorios de la carrera de Ingeniería en Biotecnología.

3.2 Zona de Estudio.

3.2.1 Campo.

Recolección de la materia prima para la elaboración del extracto

Se recolectó alrededor de 1 kg de muestra de hojas de la especie arbustiva *Piper carpunya* conocida también como guaviduca en los senderos del río Baba, en la comuna Chigüilpe perteneciente a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en el cantón Santo Domingo, Ecuador, Latitud: 0°19'26.68", Longitud: 79°10'20.34" procurando que las muestras vegetales sean de un color homogéneo y eliminando hojas viejas o que presenten manchas o residuos como polvo e insectos.

Recolección de la materia prima infectada.

El fitopatógeno a estudiarse (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*), se colectó *in situ* en la florícola “Chimbacalle roses” ubicada en la parroquia de Pedro Moncayo Tabacundo – Ecuador; Latitud: 0°1’19.19”S, Longitud: 78°15’38.70”O, a partir de hojas infectadas de rosas del cultivar “wow”, que presentaban la sintomatología de la enfermedad, sobretodo la presencia de conidios característicos observados al estereomicroscopio.

3.2.2 Laboratorio.

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Bioquímica, Microbiología y Fitopatología del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA I), ubicada en la Hacienda El Prado, Sangolquí-Ecuador S/N, Latitud: 0°23’5.81”S, Longitud: 78°24’54.18”O; en asociación con los laboratorios del CIVABI (centro de Investigaciones y Valoración de la Biodiversidad) de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito, Campus Girón.

3.3 Periodo de Investigación.

La investigación tuvo un periodo de 7 meses de duración.

3.4 Hipótesis.

H0: No existen diferencias significativas con respecto al conteo inicial de conidios de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* observados *in vitro* en cámara de Neubauer y/o entre los grupos de tratamiento obtenidos a partir extracto vegetal de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.).

H1: Los tipos de tratamiento utilizados obtenidos a partir extracto vegetal de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) si influyen significativamente sobre el número de conidios de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. observados *in vitro* en cámara de Neubauer.

3.5 Diseño Estadístico.

Para evaluar el efecto antagonista que presentó el extracto de *Piper carpunya* sobre las esporas de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, los datos cuantitativos obtenidos de esta investigación fueron sometidos a una estadística con un diseño experimental completamente al azar (DCA) que nos permitió establecer el principal:

1. Método de extracción (macerado (M) o hidrodestilado (HD)),
2. Solventes utilizados (etanol, etanol de caña y agua) y
3. Dilución de los extractos (30, 60 y 90 %)

Que demostraron establecer el mejor porcentaje de control biológico sobre fitopatógeno; a partir de la observación de la proporción registrada de conidios afectados o con cambios morfológicos presentados en suspensión.

Para determinar si existen diferencias significativas entre las distintas diluciones de un mismo solvente y las mejores diluciones de los distintos solventes se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias de Tukey al 5 % efectuado a las 12 y 24 horas de cada tratamiento.

Para evaluar el efecto del tiempo en las mejores diluciones de cada tratamiento se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) y análisis de gráficos de dispersión desde las 0 a las 12 y 24 horas.

3.5.1 Factores controlables.

Entre los factores controlables que presenta la investigación se pueden mencionar:

1. El método de obtención del extracto vegetal de *Piper carpunya* (macerado o hidrodestilado).
2. El tipo de solvente empleado (etanol comercial al 96 %, etanol de caña al 60 %, agua y el producto de hidrodestilación) a distintas diluciones (30, 60 y 90 % V/V)

3.5.2 Tratamientos.

Se evaluaron 12 tratamientos ajustables al arreglo factorial A x B, donde A es el método de extracción (macerado o hidrodestilado) * solventes utilizados (agua, etanol de caña al 60 %, etanol comercial al 96 % y el producto de hidrodestilación) y B a las diluciones de los extractos empleados (30, 60 y 90 %).

Tabla 3.

Tratamientos a evaluar sobre conidios de S. pannosa var. rosae

Código	Descripción (%)
MA1	Macerado en agua al 30
MA2	Macerado en agua al 60
MA3	Macerado en agua al 90
MC1	Macerado alcohol de caña al 30

CONTINÚA

MC2	Macerado en alcohol de caña al 60
MC3	Macerado en alcohol de caña al 90
ME1	Macerado en etanol al 30
ME2	Macerado en etanol al 60
ME3	Macerado en etanol al 90
HD1	Hidrodestilado al 30
HD2	Hidrodestilado al 60
HD3	Hidrodestilado al 90

3.5.3 Repeticiones.

Para este ensayo se llevaran a cabo 5 réplicas por cada tratamiento para dar una evaluación que sea aceptablemente confiable y segura.

3.5.4 Unidad experimental.

Las unidades experimentales correspondieron a los pocillos dispuestos en las placas de cultivo múltiple celular de 2,5 mL de capacidad conteniendo en su interior 1 mL de la suspensión de esporas y 1mL del extracto obtenido. Por cada tratamiento (12) se dispusieron 5 réplicas dando un total de 60 UE para todo el ensayo.

3.5.5 Variable de Respuesta.

La variable de respuesta fue la concentración de esporas registradas. Definida como el número de esporas (con morfología típica característica o con cambios morfológicos presentados) presentes por mililitro de suspensión (esporas/mL), contabilizadas en cámara de Neubauer, de

acuerdo a la metodología del fabricante (MARIENFELD Laboratory glassware), expuestas a los tratamientos definidos en el literal anterior.

3.5.6 Análisis Estadístico.

El análisis de datos y resultados se lo llevó a cabo en el programa estadístico INFOSTAT.

3.6 Métodos.

3.6.1 Procesamiento de la materia prima para la elaboración del extracto.

Se procedió a lavar con agua común y luego con agua destilada a las muestras de hojas de la especie arbustiva *Piper carpunya* (previamente pesadas y seleccionadas por su aspecto), con el fin de eliminar cualquier tipo de impurezas que pudieran alterar los ensayos subsecuentes. Posteriormente, el material vegetal se dispuso en una superficie sobre papel periódico a temperatura ambiente, evitando el contacto directo con los rayos solares y alrededor de 3 días se encontraban secas.

3.6.2 Molienda y pesaje.

Para llevar a cabo la maceración se trituraron alrededor de 100 g de hojas secas del espécimen *Piper carpunya* mediante un molino eléctrico hasta obtener un polvo fino para aumentar el área de contacto de la muestra y que los metabolitos secundarios sean obtenidos de la muestra vegetal con los distintos tipos de solventes utilizados. Y otra cantidad igual de hojas secas se troceó para luego someterlas a hidrodestilación.

3.6.3 Obtención del extracto por hidrodestilación.

Se utilizó un equipo de destilación por arrastre de vapor, provisto de un refrigerante vertical que cumple la función de condensar el hidrodestilado, de acuerdo con la metodología de Alcaraz, Rodríguez *et al.*, (2012) y Cerpa, (2007).

Para ello se tomaron 100 g de muestra seca de *Piper carpunya* que se dispuso en el destilador y adicionando 2,5 litros de agua destilada, para que su vapor fluya sobre la muestra y arrastre los compuestos hacia un recipiente que colecta los fitofluidos hidrodestilados en el transcurso de aproximadamente 30 min a 1 hora. A partir de los resultados volumétricos arrojados se obtuvieron los porcentajes de rendimiento de hidrolato adquirido al tiempo indicado.

$$\% \text{ Rendimiento}_{(t)} = \frac{\text{Volumen de hidrolato (mL)}}{\text{Volumen de la solución (hidrolato + aceite esencial) (mL)}}$$

3.6.4 Obtención de los extractos por maceración.

Adoptando las recomendaciones de Moreno *et al.*, (2010), de 30 g de la muestra vegetal de *Piper carpunya* molida se tomó alícuotas de 10 g que fueron añadidas en 3 diferentes frascos de color ámbar de 500 mL de capacidad, a los que, se agregó de 150 mL de los solventes: etanol comercial al 96 %, etanol de caña al 60 % y agua destilada (H₂O_d) estéril respectivamente. Con ayuda de un agitador orbital, se los sometió a agitación orbital a 180 rpm a diferentes tiempos de acuerdo al solvente utilizado, y posterior reposo 4 °C durante 8 días. Después del periodo de reposo los extractos fueron filtrados con papel filtro N°45 y rotaevaporados a 50 °C para recuperar el solvente.

Las características organolépticas de los extractos macerados e hidrodestilado, se registraron en base a su color y olor con los siguientes parámetros, siendo: (leve +), (constante ++) e (intenso +++) y su porcentaje de rendimiento se calculó volumétricamente a partir del volumen del extracto obtenido de la muestra/volumen total de la solución.

3.6.5 Preparación de los tratamientos a contrastar.

Finalmente, a partir de los 4 extractos obtenidos (hidrodestilado y macerado en etanol comercial al 96 %, macerado en etanol de caña al 60 %, macerado en agua destilada (H₂O_d) estéril, se efectuaron diluciones al 30, 60 y 90 (V/V) de 10 mL cada una, dando lugar a un total de 12 soluciones o tratamientos dispuestas en frascos ámbar de 100 mL de contenido.

3.6.6 Obtención de una suspensión de conidios de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*.

Toma de muestras de infectadas.

El fitopatógeno a estudiarse (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*), se colectó *in situ* en la florícola “Chimbacalle roses” ubicada en la parroquia de Pedro Moncayo Tabacundo – Ecuador; a partir de hojas infectadas de rosas del cultivar “wow”, observando que presentasen la sintomatología de la enfermedad, como un polvo o cenicilla blanca a grisácea sobre la superficie de las partes afectadas de la hoja.

Las muestras se depositaron en fundas de papel kraft estéril; se rotularon y seguidamente se almacenaron en una nevera icopor de 10L (cooler) con el propósito de preservarlas hasta su traslado al laboratorio para los ensayos posteriores.

Identificación morfológica del patógeno.

De acuerdo con Heffer *et al.*, 2006. Se realizó la identificación en el laboratorio de la presencia de constituyentes macroscópicos característicos del hongo en rosas previamente diagnosticadas en el campo por sintomatología con mildiú polvoso, doblando una sección de la hoja infectada a lo largo del pliegue de manera que las estructuras del patógeno sean fácilmente reconocibles al estéreo microscopio.

Posteriormente, se utilizó la técnica para caracterización morfométrica microscópica descrita por Domínguez-Serrano *et al.*, 2015 para la determinación de estructuras de reproducción asexual como hifas, conidióforos y conidios propios del hongo fitopatógeno *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae.*, utilizando un trozo de cinta transparente (más pequeño que el portaobjetos del microscopio) y tomando una porción de micelio de la parte infectada de la hoja que se adhiere al portaobjetos con una gota de solución de violeta de genciana al 1 %, para su observación en el microscopio compuesto con el objetivo 40X.

Las estructuras sexuales que fueron analizadas en el programa de análisis de imágenes ImageJ para la confirmación de la aparición de mildiú polvoso en las plantas.

Recolección de conidios.

Se utilizó la técnica de barrido descrita por Perilla & Sanabria (2007), la cual, consistió en separar los conidios del material vegetal con ayuda de un pincel pelo de marta N° 23, hasta coleccionar aproximadamente 0.15 g de esporas sobre una caja Petri de 100 x 15mm previamente esterilizada,

eliminando en el proceso con la ayuda del estereomicroscopio cualquier tipo de partícula o agente no deseado que no fuera perteneciente a la muestra.

Preparación de la suspensión de esporas.

De acuerdo a la metodología descrita por Velásquez y colaboradores (2014) se realizó una suspensión de esporas a partir de una solución Tween 80 al 0.1 %, con algunas modificaciones. Se colocó 15 mL de Tween (en lugar de 10 mL) en la caja Petri conteniendo los 0.15 gr esporas asexuales de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* a modo de lavado, lo que permitió la separación de los conidios aglomerados; para luego con ayuda de un asa bacteriológica trasladarlos a un tubo falcón de 30 mL de capacidad, procurando que cada uno de las esporas colectadas se despegaran de la superficie. Seguidamente se llevó el tubo a agitación constante por alrededor de 3 min (en lugar de 1 min) a 2000 rpm valiéndose de un agitador tipo Vortex.

3.6.7 Conteo de conidios.

Se determinó la concentración inicial de esporas; al igual que, el número de conidios afectados o con cambios morfológicos presentados una vez añadido el extracto (#células/mL) que se encontró en 10 μ L pipeteados de suspensión celular madre sobre la cámara de Neubauer; a partir del conteo de conidios efectuado en los cuatro cuadrantes grandes presentados en el mismo (Figura 2.), observados al microscopio a un aumento de 4X y 10X, como lo sugieren las indicaciones descritas por Arredondo & Voltolina (2007), para células con un tamaño aproximado de 5-75 μ m.

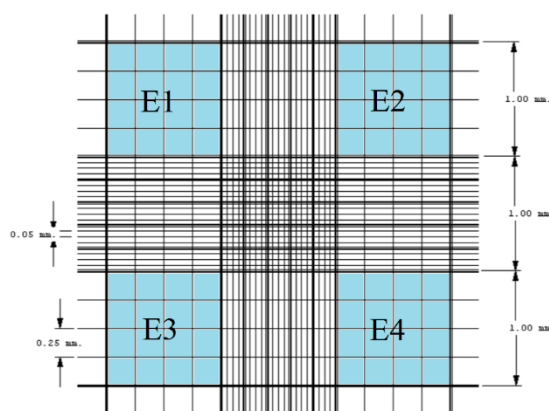


Figura 2. Cuadrantes de la cámara de Neubauer

Fuente: (MARIENFELD Laboratory)

$$[Esporas](cel/mL) = \frac{\Sigma (E_1, \dots, E_4) \times 10^4 mL}{4}$$

Donde:

$[Esporas](cel/mL)$ = Concentración celular presente

$\Sigma (E_1, \dots, E_4)$ = Sumatoria del número de células encontradas en los cuatro cuadrantes

$10^4 mL$ = El volumen en cuadrante grande ubicado en uno de los extremos de la cuadrícula de la cámara

4 = Número de cuadrantes contabilizados

3.6.8 Evaluación *in vitro* del extracto frente al Patógeno.

Para evaluar la actividad biológica antifúngica que generó el extracto de *Piper carpunya* frente a los conidios obtenidos de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, se dispensó 1 mL de cada tratamiento por repetición (X 5) en cada uno de los pocillos de placas para cultivo múltiple celular *in vitro*, a los cuales, se les agregó 1 ml de la suspensión de esporas previamente homogenizada con ayuda de micropipeta. Luego de lo cual, se procedió al conteo de esporas en la cámara de

Neubauer según lo descrito en el literal anterior, registrando el número de conidios encontradas y/o afectadas o con cambios morfológicos presentados en el transcurrir del tiempo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 horas consecutivas). Y finalmente a las 24 horas para medir su capacidad regenerativa.

3.6.9 Observación microscópica de los conidios de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*.

Los cambios morfológicos en los conidios observados en microscopio provocados por cada uno de los 12 tratamientos establecidos (MA1, MA2, MA3; MC1, MC2, MC3; ME1, ME2, ME3; HD1, HD2, HD3) a las (12 y 24 horas) fueron registrados como: conidios hinchados, delgados, con la capa externa (exosporio) irregular o totalmente deformados (Figura 3.) de acuerdo al tratamiento y al tiempo de exposición al mismo.

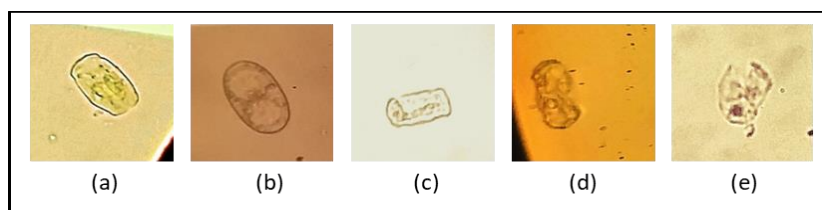


Figura 3. Afecciones en la morfología de conidios de *S. pannosa* var. *rosae*:
a) conidio b) conidio hinchado c) conidio delgado d) conidio irregular e) conidio reventado.

3.6.10 Análisis cromatográfico complementarios.

Para el análisis cromatográfico se prepararon en frascos color ámbar de 15 mL de capacidad, una dilución al 1 % de los extractos etanólicos obtenidos; tomando como muestra 30 μ l de cada extracto, diluidos a 3 mL con el solvente di-cloro metano. Para los extractos macerado en agua e hidrodestilado se les sometió a una extracción liquido-líquido en un embudo de

separación colocando 5 mL del extracto con 3 mL de di-cloro metano; realizando 2 recuperaciones consecutivas. Posteriormente almacenados a -4°C .

Finalmente, la identificación de los componentes químicos de las muestras estuvo a cargo del docente-fundador de la carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador, sede (Quito-Ecuador), Dr. Paco Noriega, llevada a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a masas (CG-MS): Cromatógrafo de gases Varian 3900 equipado con un factor de cuatro columnas VF-5ms 5 %-fenil-95 %-dimetilpolisiloxano, conectado directamente a un espectrómetro de masas Varian Saturn 2100; de acuerdo especificaciones técnicas de Noreiga *et al.* (2015).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Obtención de los extractos.

Obtenidos los extractos de acuerdo a la metodología descrita en el literal 3.6, se obtuvieron los siguientes resultados de las operaciones:

Tabla 4.

Características organolépticas y porcentaje de rendimiento en los diferentes métodos de obtención del extracto de P. carpunya

Solvente	Tiempo reposo	Método	Características organolépticas		% R
			Color	Olor	
Macerado en etanol (Etanol comercial 96 %)	8 días	Rotaevaporado	Verde claro	Suigéneris a condimento (picante) ++	33 %
Macerado en caña (Etanol de caña 60 %)	8 días	Rotaevaporado	Verde oscuro	Suigéneris a condimento con especias (dulce) ++	30 %
Macerado en agua	8 días	Filtrado	Verde agua	Suigéneris a condimento (picante) ++	82 %
		Hidrodestilado (Hidrolato)	Incoloro	Suigéneris a condimento (picante) +++	9.5 % 12 %

El porcentaje de rendimiento y el tiempo de extracción variaron de acuerdo al solvente y método utilizado. Para cada macerado en etanol (etanol comercial y etanol de caña) se obtuvieron porcentajes de rendimiento y tiempo de recuperación de extractos aproximados entre sí. El valor del porcentaje de rendimiento del macerado en agua corresponde a la relación más alta. Por otro lado, el rendimiento logrado por el método de hidrodestilación arrojó un resultado máximo del 12 % de hidrolato obtenido a los 60 min.




De acuerdo a las características organolépticas de los 4 extractos obtenidos, aunque varíen en intensidad presentan el mismo aroma particular de la familia *Piperaceae*, que resulta ser más intenso en el hidrolato con respecto a los otros extractos; y el color verde representativo de la hoja en el caso de los macerados.

4.2 Identificación morfológica del patógeno.

El análisis de las imágenes en campo y tomadas bajo estereomicroscopio y microscopio en aumento de 40X arrojó los siguientes resultados:

Tabla 5.

Características sintomatológicas y morfológicas del fitopatógeno S. pannosa var. rosae

Fotos	Observaciones
	<p>Presencia en campo de manchas blancas polvorosas o algodonosas en el haz de las hojas y tallos jóvenes del rosal.</p> <p>En algunos casos de epidemia grave las colonias también aparecen en las yemas y en las flores.</p>
	<p>Visualización al estereomicroscopio de filamentos que nacen perpendiculares a una red que cubre la superficie de las hojas del hospedante; con aspecto cilíndrico hialino flexuoso recto que no se ramifican y se va tabicando dando origen a una cadena de células tubulares o en forma de barril.</p>
	<p style="text-align: center;">Análisis de Imagen con ImageJ</p> <p>Micelio: 3 – 7 μm de diámetro Conidióforos: 87 – 125 μm de longitud Conidios: 20 – 25 x 11-17 μm (longitud/diámetro) Célula basal: 33 – 54 μm de longitud</p>

4.3 Evaluación *in vitro* del extracto frente al Patógeno.

4.3.1 Determinación del mejor método de extracción de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) que permita el mayor control biológico sobre *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*.

Como se muestra en el Anexo B existe una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos macerado e hidrodestilado $p < 0.005$; con un porcentaje mucho mayor de variable de respuesta (conidios/mL) en el método de extracción por macerado sugiriendo que este es el método menos eficaz empleado (Figura 4).

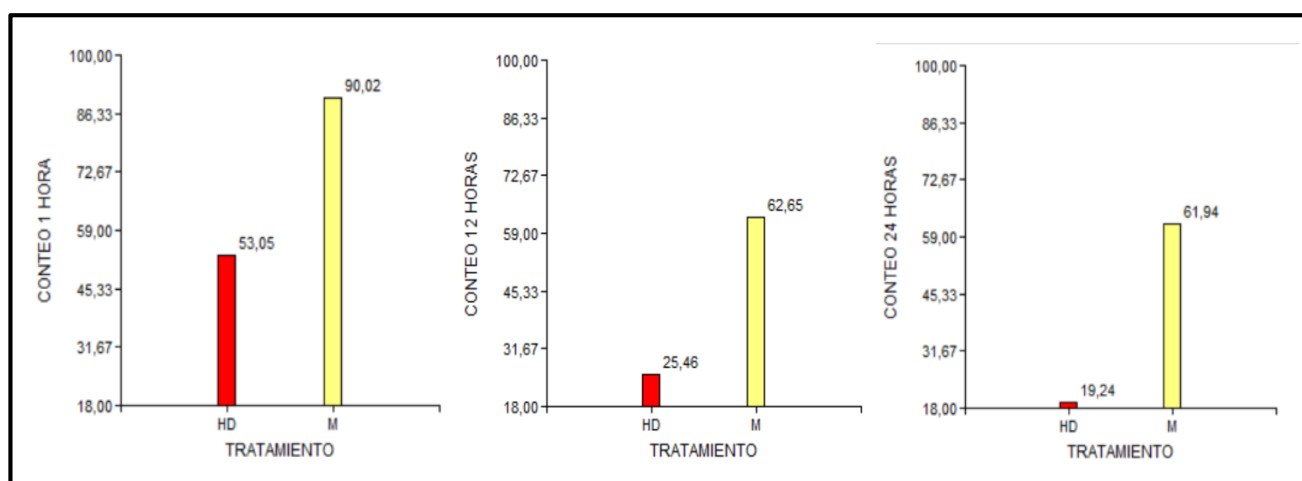


Figura 4. Resultados del análisis de varianza respecto a los métodos de extracción aplicados macerado e hidrodestilado que permitan el mayor control biológico sobre *S. pannosa* var. *rosae*.

4.3.2 Determinación de la mejor dilución 30, 60, 90 % por solvente del extracto de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) para conseguir el mayor control biológico del fitopatógeno *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*.

Macerado en agua.

El ANOVA del solvente macerado en agua (MA) entre las distintas diluciones evaluadas (MA1, MA2, MA3) demostró que no existen diferencias significativas entre las medias a sus

distintas diluciones $p > 0.005$ (Anexo B). Sin embargo, de acuerdo a la gráfica se puede observar que existe un efecto del tratamiento sobre la concentración de conidios que se reducen a través del tiempo (Figura 5).

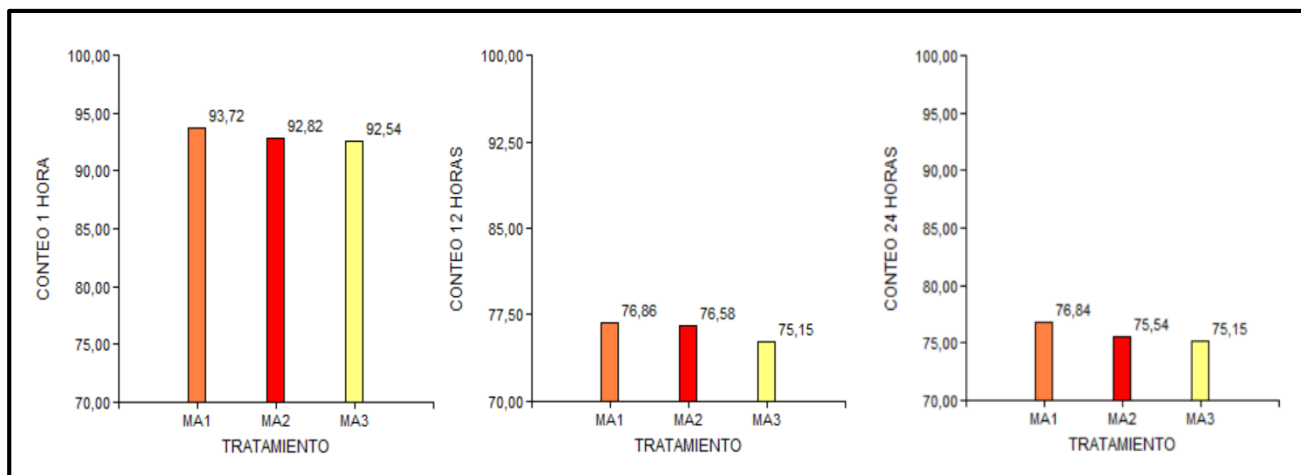


Figura 5. Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente agua que permitan el mayor control biológico sobre *S. pannosa* var. *rosae*.

Macerado en etanol de caña.

En el caso del análisis comparativo ANOVA para el solvente macerado en caña (MC) se determinó que existen diferencias significativas entre las diluciones (MC1, MC2, MC3) $p < 0.005$.

Sin embargo, en el análisis de Tukey al 5 % se observan que existen únicamente 2 grupos (MC1) y los tratamientos (MC2, MC3) (Anexo B); siendo los tratamientos (MC2, MC3) igualmente de eficaces en la reducción de conidios.

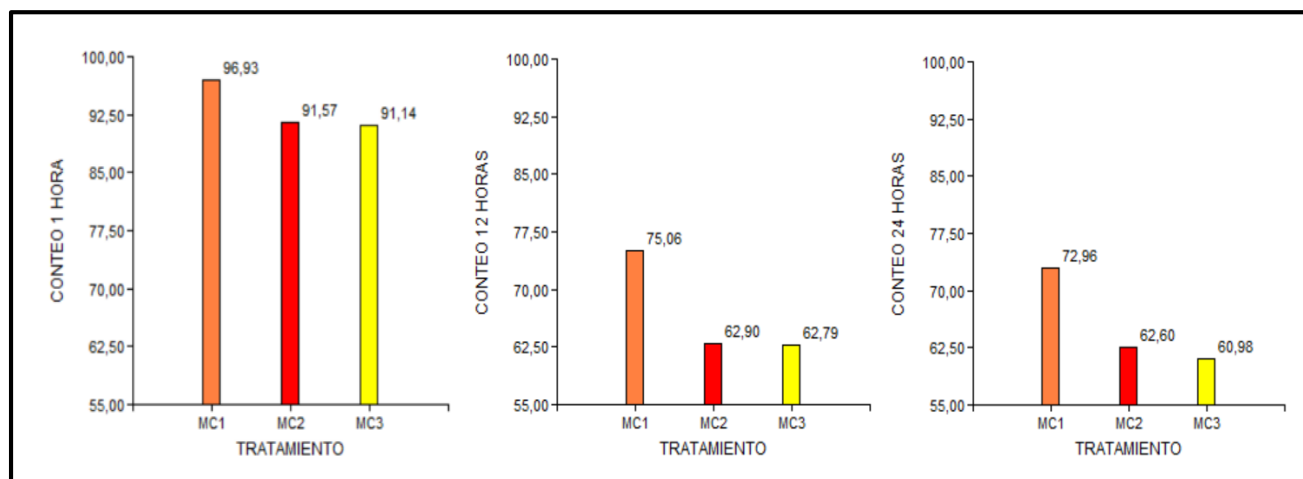


Figura 6. Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente etanol de caña que permitan el mayor control biológico sobre *S. pannosa* var. *rosae*.

Macerado en etanol comercial.

Para el solvente macerado en etanol (ME), el análisis estadístico señaló diferencias entre medias estadísticamente significativas para sus distintas diluciones (ME1, ME2, ME3) $p < 0.005$.

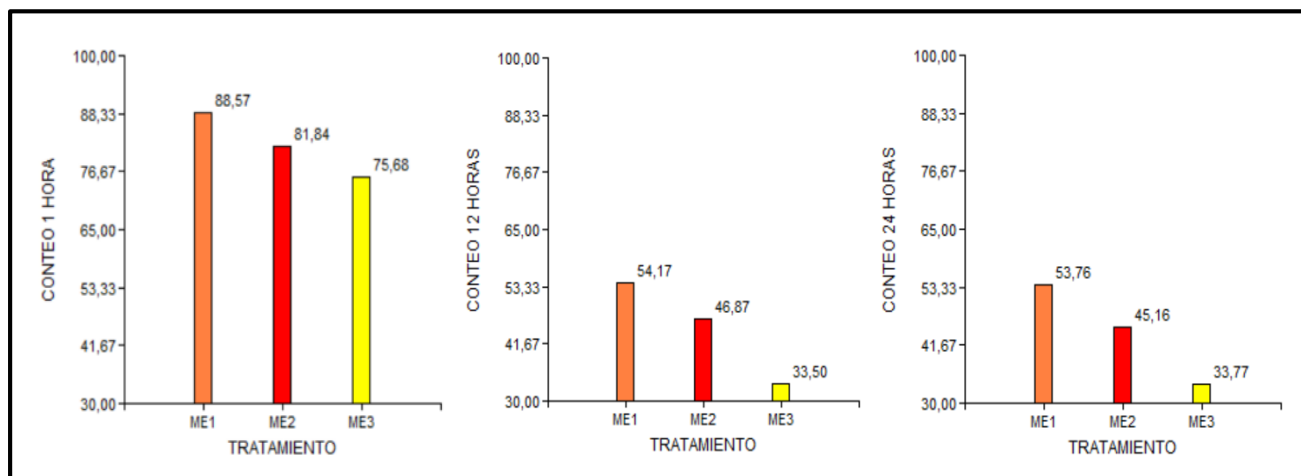


Figura 7. Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente etanol comercial que permita el mayor control biológico sobre *S. pannosa* var. *rosae*.

Además, se observa en la Figura 7. un mínimo de conidios presentes en la dilución al 90% y un máximo de conidios presentes en la dilución al 30%; lo que los convierte en la mejor y peor dilución aplicada del mismo solvente.

Hidrodestilado.

Así mismo, en el análisis comparativo del solvente hidrodestilado (HD) en las diluciones (HD1, HD2, HD3) aplicado sobre la variable de respuesta arrojó diferencias entre medias estadísticamente significativas para todas sus diluciones con un mínimo del 0% y un máximo del

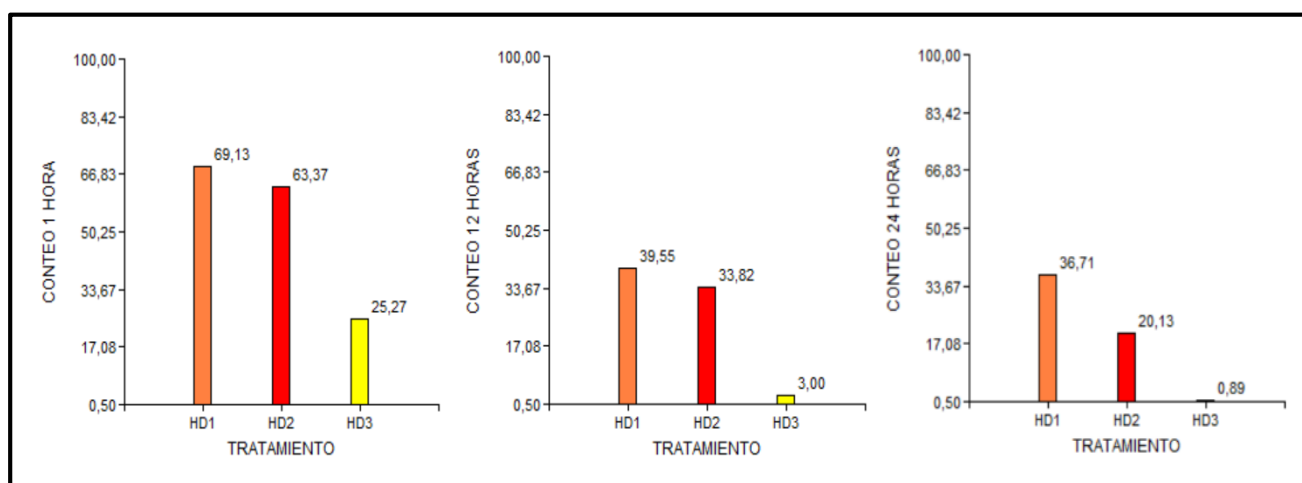


Figura 8. Resultados del análisis de varianza respecto a la mejor dilución del solvente hidrolato que permita el mayor control biológico sobre *S. pannosa* var. *rosae*.

4.3.3 Determinación del mejor tratamiento de *Piper carpunya* (Ruiz & Pav.) que permita el mayor control biológico sobre *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*.

La Tabla 14 y 15 muestran la media de las mejores diluciones de cada solvente (HD3,ME3,MC2,MA1) evaluadas en el literal anterior, contrastadas entre sí para determinar el

mejor tratamiento que permita el mayor control biológico sobre *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* a las 1, 12 y 24 horas.

Como resultado de este análisis se obtuvo que existen diferencias significativas en los cuatro tratamientos evaluados a las 12 y 24 horas, con el menor porcentaje de conidios observados 0.89 % en el tratamiento (HD3) y el mayor porcentaje 78.19 % en el tratamiento (MA1) a las 24 horas (Figura 9); lo que los convierte en el mejor y peor tratamiento aplicado para el control de conidios.

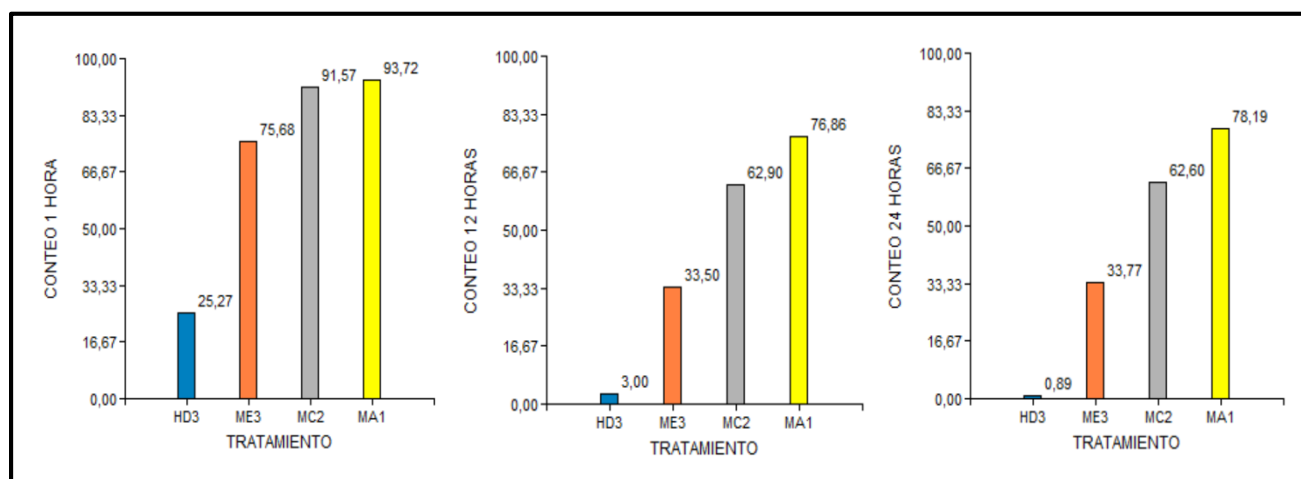


Figura 9. Resultados del análisis de varianza respecto al mejor tratamiento que permita el mayor control biológico sobre *S. pannosa* var. *rosae*

4.3.4 Evaluación de la variable de respuesta para cada tratamiento a las diferentes diluciones a través del tiempo de observación (0 – 12 y 24 horas).

De acuerdo al ANCOVA nos sugiere que la covariable horas influye significativamente sobre los tratamientos aplicados en función de la variable de respuesta (conidios/militro), con un coeficiente medio negativo que representa una decreciente de -1,19 conidios, que se observa de en la Figura 10.

Evaluación *in vitro*: método de obtención del extracto de *P. carpunya* sobre conidios de *S. pannosa* var. *rosae*

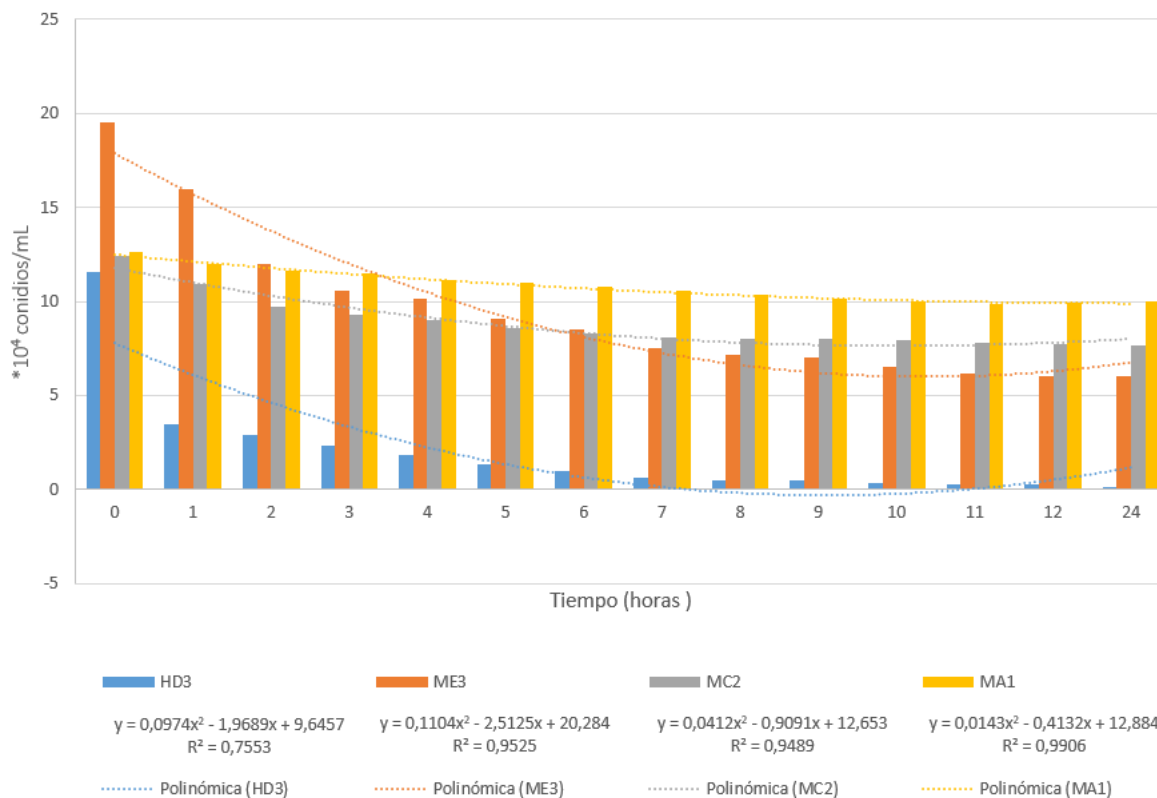


Figura 10. Concentración de conidios/mL. para cada método de obtención del extracto de *P. carpunya* a través del tiempo de observación.

De igual manera, se evidencia un cambio significativo de reducción de la variable de respuesta alrededor del 50 % o más a partir de las 2 horas para los tratamientos (HD3, ME3, MC2) respectivamente; mientras que el tratamiento (MA) a las 24 horas apenas alcanza un porcentaje mínimo del 79.36 % conidios a las 2 horas de aplicado el tratamiento, colocándolo como el peor tratamiento aplicado.

El comportamiento de los cuatro mejores tratamientos para la variable de respuesta (conidios/mL) en función del tiempo de observación (0 – 12 y 24 horas) se ajustan a una tendencia polinómica de segundo grado con un coeficiente de regresión (R) muy cercano a 1.

4.3.5 Apreciación microscópica de los cambios morfológicos producidos en los conidios de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* en función del tiempo y tratamiento evaluado.

Se visualizó la morfología de los conidios sometidos a los distintos tratamientos Figura 3. Los conidios sometidos al tratamiento de macerado en agua (MA) una tendencia a hincharse cuantiosamente aumentando de tamaño hasta transcurridas las 24 horas, muchos de ellos hasta llegar a explotar como se observa en la.

En el caso de extracto macerado en caña (MC) se visualizó deformaciones del exosporio hasta desintegrar los conidios en función del tiempo y de la dilución empleada.

Los conidios expuestos al extracto macerado en etanol comercial (ME) presentaron en la placa además de las características deformativas exhibidas en extracto el extracto MC, unos diminutos puntos verdes de característica de gotas que eran más abundantes en función de la concentración del extracto (Anexos).

Para los conidios expuestos al extracto hidrodestilado se observó raramente la deformación de conidios y más bien presentó una disminución de esporas con fragmentos o residuos de las mismas en la placa transcurridos 1 hora de empleado el tratamiento.

4.4 Análisis cromatográficos complementarios.

Macerado en agua.

En el análisis cromatográfico del extracto de *Piper carpunya* macerado en agua se visualizaron los picos de cuatro compuestos; siendo dos señales de ruido propias de la columna, el tercero un herbicida sistemático conocido comercialmente como Kemitran 50, y el compuesto trans-2-Caren-4-ol, cíclico monoterpénico (Figura 11).

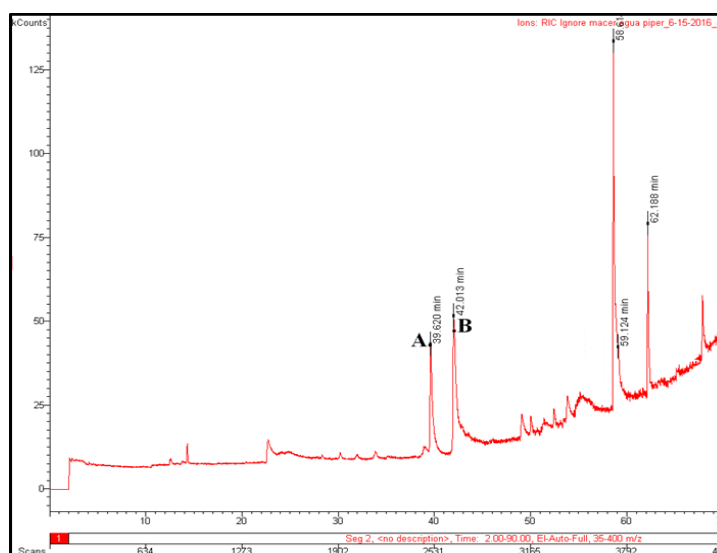


Figura 11. Cromatograma del extracto macerado de *P. carpunya* en agua.

Macerado en etanol de caña.

En el caso del análisis cromatográfico del extracto de *Piper carpunya* macerado en etanol de caña, se distinguió un solo pico significativo con un tiempo de retención (TR) a los 4.03 min que correspondió a la molécula orgánica tipo éster, Actylol o Lactato de etilo cuya fórmula molecular es $C_5H_{10}O_3$ (Figura 12.)

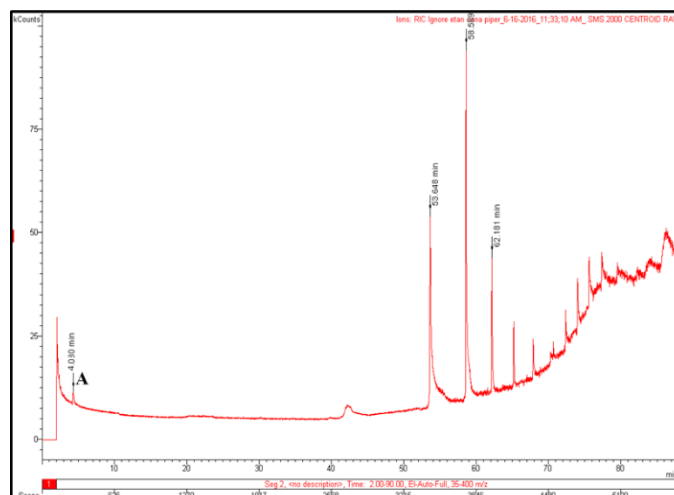


Figura 12. Cromatograma del extracto macerado de *P. carpunya* en etanol de caña.

Macerado en etanol.

El análisis cromatográfico del extracto de *Piper carpunya* macerado en etanol, reveló dos picos importantes con un tiempo de retención (TR) de 63.68 y 65.18 min que correspondieron a una mezcla de isómeros cis-trans del compuesto -3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, conocido comercialmente como Phytol (Figura 13.)

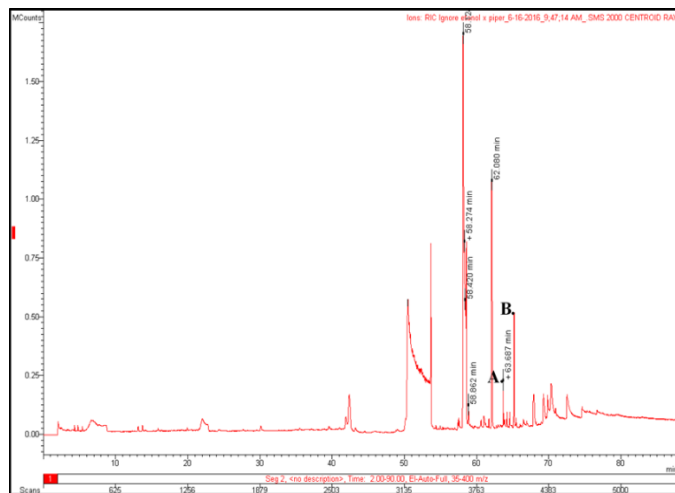


Figura 13. Cromatograma del extracto macerado de *P. carpunya* en etanol comercial.

Hidrodestilado.

El análisis cromatográfico del hidrodestilado de *Piper carpunya* se detectaron una variedad de compuestos monoterpénicos cíclicos o bicíclicos asociados a diferentes grupos funcionales: >50 % transportan un grupo funcional alcohol, >20 % poseen un grupo éter cíclico, y solo el 10 % corresponde al grupo funcional cetona y un puente inusual con peróxido en el grupo funcional; siendo el Ascaridiol el compuesto más abundante con un 35.12 %, seguido del 1-8 cineol con un porcentaje de abundancia del 33.5 %, como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6.

Compuestos detectados por el GC-MS en el extracto de P. carpunya hidrodestilado.

Pico	TR (min)	Compuesto	%	Fórmula
A.	14.28	1-8 cineol	33.50	C ₁₀ H ₁₈ O
B.	17.53	4-Isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol	2.00	C ₁₀ H ₁₈ O
C.	20.38	5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	1.50	C ₁₀ H ₁₈ O
D.	27.42	α-terpineol	0.62	C ₁₀ H ₁₈ O
E.	30.15	L-α-terpineol	10.00	C ₁₀ H ₁₈ O
F.	33.38	α-Limonene diepoxide	0.50	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
G.	34.93	4,7,7-Trimethylbicyclo[4.1.0]heptan-2-ol	2.65	C ₁₀ H ₁₈ O
H.	42.02	trans-2-Caren-4-ol	5.14	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
I.	42.71	Ascaridiol	35.12	C ₁₀ H ₁₆ O ₂
J.	49.04	6-Isopropyl-3-methyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one	9.00	C ₁₀ H ₁₆ O ₂

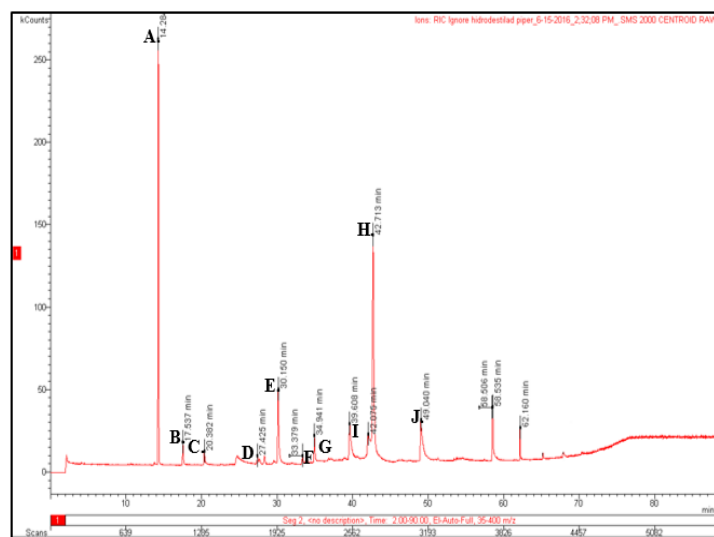


Figura 14. Cromatograma del extracto de *P. carpunya* hidrodestilado.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Obtención de los extractos.

Muchos de los beneficios de las plantas y sus subproductos son conocidos y utilizados desde la antigüedad como agentes antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, insecticidas, herbicidas entre otros. Estos efectos son producto de compuestos de naturaleza química diversa sintetizados por células especializadas de las plantas. Por este motivo, su obtención mediante diferentes técnicas de extracción es fundamental en diversas áreas como medicina, alimentación, perfumería y agricultura (Giral, 2011). Sin embargo, su óptima extracción depende de diversos factores como: edad de la planta, forma de recolección de la muestra, modo de almacenamiento del material vegetal, método de obtención del extracto (destilación, maceración, prensado, extracción con solventes o sin ellos) y tipo de solvente (agua, etanol, hexano); que además estos factores determinarán las propiedades organolépticas (color, aroma, sabor) del producto obtenido (Cárdenas, 2012; Caldas, 2012).

En el caso del método de extracción por maceración se observó productos con una mayor intensidad de color variando de verde oscuro a verde claro en los macerados de etanol comercial y etanol de caña, dado por la solubilidad de las clorofilas en el alcohol; tal como lo reporta Pérez *et al.*, (2016). Así mismo, el producto obtenido del macerado vegetal en agua aunque insoluble para pigmentos clorofílicos adquirió un color verde ligero que puede presumirse al contacto y proceso de fragmentación al que fue sometida la muestra; daños físicos que según López, (2009) alteran la permeabilidad de la membrana celular causando la penetración del solvente y la disolución y difusión de algunos contenidos celulares. Estas son las mismas razones por las cuales,

distintos disolventes pueden dar como resultado productos con diferentes características olfativas a partir de una misma sustancia; obteniendo en este caso los productos de los extractos alcohólicos el olor característico al solvente más el de la muestra vegetal (López, 2009). A diferencia de productos de la extracción por hidrodestilación (hidrolato) en donde el solvente no penetra, ni disuelve los componentes deseados del sólido; sino más bien el solvente en forma de vapor arrastra los diversos componentes volátiles de la muestra que se condensan de acuerdo a su solubilidad en el agua dando como resultado por lo general un extracto incoloro con un olor parecido al de la planta original, como el adquirido en el laboratorio suigéneris a condimento (Sarmiento, 2016; Pressreader, 2018).

Por otro lado, los rendimientos de extracción varían de acuerdo a la metodología empleada. Para el proceso de hidrodestilación el rendimiento fue menor respecto al porcentaje obtenido en los procesos de maceración, en donde el rendimiento está directamente relacionado con la cantidad de muestra y el volumen de solvente ocupado; mientras que en la hidrodestilación, el limitante es el tiempo del proceso (Carrión & García, 2010).

5.2 Evaluación *in vitro*.

La familia *Piperaceae* es considerada una de las más complejas y diversas entre las angiospermas basales, razón por la cual muchas de sus especies presentan gran actividad biológica (antiinflamatoria, insecticida, bactericida, fungicida, etc.) (Delgado *et al.*, 2012). Ensayos con varias especies del género *Piper* mostraron actividad antifúngica, tanto en las esporas como en el desarrollo de colonias de diversos tipos de hongos fitopatógenos, que en algunos casos resultaban ser más efectivos que el fungicida aplicado comercial (Celis *et al.*, 2008). El hongo biótrofo,

Sphaerotheca pannosa var. *rosae*, se caracteriza por ser un fitopatógeno de difícil control, cuyas condiciones de cultivo *in vitro* son altamente estrictas en cuanto a temperatura y humedad (Perilla & Sanabria, 2007); es por ello que en el presente estudio se determinó el efecto de los extractos sobre sus células asexuales reproductivas (conidios).

Al evaluar el producto de los métodos de extracción (M, HD) de la especie vegetal de *Piper carpunya*; se comprobó por medio de un análisis comparativo (ANOVA) que el número de conidios del fitopatógeno *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* presentes en suspensión se ven afectados significativamente ($p < 0.05$) por los tratamientos evaluados y por ello se acepta la hipótesis alternativa tomando en cuenta un nivel de significancia Tukey de un 5 %. Igualmente, la significancia de los valores en las diluciones (30-60-90 % V/V) de un mismo solvente, indican que no solamente los productos del método de extracción tienen un efecto sobre el número de conidios, sino que también sus concentraciones contribuyen a estos resultados; con excepción del producto obtenido del macerado en agua para el cual todas las diluciones mostraron valores de medias aproximadas; esto podría deberse a que los hongos muestran diversas respuestas y estrategias metabólicas en respuesta a las condiciones hídricas variables (Tijerina *et al.*, 2014).

Otro factor determinante sobre el número de conidios/mL, fue la influencia del tiempo; observándose en las gráficas y en el análisis de covarianza (ANCOVA) una pendiente negativa que indica un decremento medial de -1,19 conidios/mililitro desde la 1 hasta las 24 horas en todos los tratamientos; hasta el 0 % de esporas en el tratamiento con hidrodestilado al 90 %. Resultados que concuerdan con docenas de investigaciones elaboradas en diversas especies del mismo género frente a varios fitopatógenos potenciales (Landino, 2017).

5.3 Determinación del mejor tratamiento.

Entre los procesos extractivos destacan dos métodos comúnmente utilizados para la obtención de componentes bioactivos de las plantas, la maceración y la hidrodestilación, de los cuales, Taborda, (2013) menciona que el segundo favorece a la separación de compuestos que permiten la inhibición y control biológico de los fitopatógenos estudiados. Del mismo modo, al contrastar en este estudio ambas técnicas de extracción, se observa que el método de hidrodestilación es el más efectivo frente al fitopatógeno *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* causando una disminución en el número de conidios de al menos el 75 % en cualquiera de sus diluciones (30, 60, 90 V/V) a comparación de un 39 % con los productos obtenidos de la maceración de *Piper carpunya*. Por este motivo, en algunos casos en la extracción de compuestos por maceración de plantas aromáticas se requiere que las muestras sean sometidas a agua caliente para favorecer la separación de compuestos volátiles que forman parte del metabolismo secundario de las plantas y que pueden poseer acción fungicida hacia ciertos fitopatógenos, como señala Albarracín & Gallo, (2003). Sin embargo, extractos de procesos de maceración aunque menos eficaces que hidrolatos ofrecen cierta acción biofungicida (Taborda, 2013). De acuerdo con Andrews *et al.*, (2016) son los solventes orgánicos polares como los alcoholes (etanol, metanol, n-butanol, isopropanol) los que permiten la extracción de la mayoría de los compuestos bioactivos de plantas naturales. Así como se observa con los productos de maceración del presente estudio, en donde los más efectivos fueron el etanol comercial y el etanol de caña a comparación del extracto macerado en agua, exhibiendo porcentajes de reducción en el número de conidios de al menos el 45 % y 28 % respectivamente en cualquiera de sus diluciones (30, 60, 90 V/V).

5.4 Observación microscópica del efecto de los extractos sobre conidios *S. pannosa*.

Según Torés & Segarra, (2014) una de los aspectos distintivos para la diferenciación entre tipos de Oídio son sus estructuras asexuales que tienen un aspecto muy variable desde finas y delicadas en las especies *Microsphaera* y *Uncinula*, hasta anchas y robusta en *Erysiphe* y *Sphaerotheca*. En México varios reportes de mildiú polvoso en el rosal, Campelo *et al.*, (2000); Domínguez-Serrano *et al.*, (2015); Félix *et al.*, (2014), han descrito a *S. pannosa* como un hongo ectofítico biotrófico, con estructuras hialinas características. En este estudio, al realizar observaciones microscópicas se pudo comprobar dicha constitución en el hongo fitopatógeno estudiado, con valores aproximados a los de la literatura, conidióforos erectos de hasta 125 μm de largo, surgiendo de las células madres hifales; células basales rectas subcilíndricas de hasta 54 μm de largo, con conidios de 20-25 μm x 11-17 μm (longitud/diámetro); pero con una coloración violeta debido a la adición del colorante. De estas estructuras destacan la presencia de sus esporas asexuales inmóviles (conidios). En el caso de la especie *S. pannosa* estos conidios tienen forma característica de barril, con manifestación de cuerpos de fibrosina, abundantes vacuolas, pared celular muy fina con alto contenido lipídico, que les hace muy impermeables y relativamente independientes de las condiciones exteriores. Además, poseen polisacáridos estructurales como quitina y β -1-3, glucanos que les confiere resistencia al daño celular (Torés & Segarra, 2014).

Agroquímicos usados contra la infección de Oídios se caracterizan por actuar en la síntesis de ácidos nucleicos; complejos de respiración; y mecanismos de transducción de señales como biosíntesis de esteroides de membranas, síntesis de glucanos y pared celular (Pérez *et al.*, 2015). Estas sustancias pueden provocar la inflamación y el estallido o colapso de las estructuras, seguido de la extrusión de citoplasma (Van Rooi, 2002). Se desconoce el mecanismo de acción del extracto

de *Piper carpunya* sobre conidios de *S. pannosa* var. *rosae*; sin embargo, al realizar las observaciones microscópicas, se determinó los mismos efectos que causan los agroquímicos sobre los conidios en suspensión. Por ejemplo, en el extracto de etanol comercial, el mejor de los tratamientos del método de maceración, se percibió que se producían daño completo de la pared celular de constitución delgada, afectando la membrana celular hasta desintegrarse y dejando libre el contenido celular de los conidios sobre el medio a la 1 hora de empleado el tratamiento y en aumento en función del tiempo y de la dilución empleada (Figura 3.). Van Rooi, (2002) sugiere que este tipo de efectos adversos observados en estructuras fitopatógenas se deben a un mecanismo de acción directo o indirecto en la síntesis de la pared celular y la integridad de la membrana.

Por otro lado, en la visualización de la suspensión de conidios de este tratamiento, se presentó una sustancia con apariencia de gotas inmiscibles en la placa que se hacían más evidentes al aumentar la concentración del extracto; lo que advierte la aparición de compuestos de naturaleza lipídica en la suspensión. Peredo *et al*, (2009) indica que métodos de extracción con disolventes orgánicos alcohol y cloroformo pueden dar lugar a separaciones de sustancias tales como grasas y ceras obteniéndose al final un extracto que retiene impurezas. Sin embargo, Montes, (2009) agrupa muchos compuestos de origen lipídico como constituyentes principales de metabolitos secundarios con acción antifúngica; lo que puede ser la causa de que este tratamiento sea el mejor del método de maceración empleado.

Para el extracto obtenido del macerado en caña, se evidencio el mismo resultado de daño a la membrana por la exposición del tratamiento; pero con un mayor porcentaje en la concentración de conidios comparados con el tratamiento del macerado en etanol comercial. Resultados que van

de la mano con los análisis de metabolitos secundarios presentes en esta extracción, donde la cantidad de compuestos encontrados es mucho menor en relación al extracto obtenido por maceración con etanol comercial.

En el caso, del extracto macerado en agua los conidios observados se caracterizaron por un aumento significativo del volumen de la espora, pero muy ocasionalmente hasta hacerlas explotar. Muchos trabajos confirman que las esporas tienen una permeabilidad extremadamente baja a las moléculas pequeñas, incluso a las del agua; por lo tanto, se espera que la permeabilidad de compuestos químicos débiles sea muy bajo y no causen el daño esperado en la célula asexual; pues incluso compuestos como el peróxido de hidrógeno y los agentes alquilantes de ADN de bajo peso molecular, desempeñan un papel mínimo en el deterioro contra el recubrimiento celular de los conidios (Setlow, 2004). Por tal motivo, se puede esperar que el mecanismo de acción presente en este tratamiento se trate de una actividad directa sobre el recubrimiento celular, junto con un efecto osmótico ocasionado por el porcentaje de agua en solución; y no de una acción en síntesis de membranas como los que presentan fungicidas comerciales contra diversas cepas de Oídio (Van Rooi, 2002).

Por último, los efectos producidos sobre conidios expuestos al extracto hidrodestilado raramente fueron percibidos y más bien este extracto se caracterizó por el decremento de esporas al poco tiempo de iniciado el tratamiento con fragmentos o residuos de sus estructuras observadas en la placa; situándolo como el mejor tratamiento aplicado. De hecho, numerosos reportes de la acción antifúngica de hidrolatos han hecho que muchos de ellos ya sean muy comerciales (Agrolimpia, 2018; Cativa Natureza, 2018; Lizbeth López, 2017).

5.5 Análisis cromatográficos complementarios.

A menudo la cromatografía de gases acoplada a masas es la herramienta más empleada en la separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles y semivolátiles de mezclas complejas en una muestra (López, 2008). La composición de los tratamientos estudiados se analizó mediante esta técnica, en donde se detectaron (9 compuestos) por el método de hidrodestilación y (5 compuestos) productos del método de maceración divididos en: (2 compuestos) del solvente etanol comercial, (2 compuestos) del solvente etanol de caña y (1 compuesto) del solvente agua.

En el cromatograma del producto de hidrodestilación se detectaron una variedad de compuestos monoterpénicos cíclicos o bicíclicos asociados a diferentes grupos funcionales; los cuales, forman parte de un gran número de organismos con una intensa actividad alelopática, lo que ha hecho que sean una gran fuente de desarrollo de agroquímicos basados en compuestos naturales (García, 2014). Dentro de ellos, el compuesto con mayor porcentaje de abundancia fue el Ascaridiol (35.12 %), que se encuentra presente también como componente mayoritario en plantas con potente actividad antifúngica y antibacterial como *Achillea Cappadocica* (Nusret *et al.*, 2017). Al igual que el 1-8 cineol (Eucalyptol), que corresponde al segundo compuesto más abundante (33.50 %) y quien según varios estudios muestra una fuerte actividad fungicida (García, 2014; Morcia *et al.*, 2013; Padrón, 2010); cuyo mecanismo de acción en hongos micelares se conoce al reducir la división celular, inhibir la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Montes, 2009). El compuesto L- α -terpineol le sigue en abundancia (10 %). Este es un componente que también se encuentra presente del (1-8 %) en el aceite de árbol de té, el cual se utiliza para controlar varios patógenos fúngicos en una amplia gama de cultivos (PPDB:

Pesticide Properties DataBase, 2018). Asimismo, el compuesto trans-2-Caren-4-ol encontrado en la composición de *Mentha piperita* en un (1.15 %) y evaluado frente a fitopatógenos *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium graminearum* y *Fusarium langsethiae*, se encuentra también presente en este estudio en bajas cantidades (5.14 %) como posible cofactor en la reducción del número de conidios presentes del fitopatógeno en suspensión (Mehani *et al.*, 2015). Mientras que los otros compuestos de este estudio se encuentran en proporciones tan bajas que pueden considerarse como trazas.

En el análisis cromatográfico realizado por López, (2017) se reportan 8 compuestos obtenidos del producto del extracto macerado en etanol comercial, de los cuales solo 2 picos fueron identificados en este estudio, pertenecientes al compuesto -3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol o Phytol en sus formas cis-trans que no se ha reportado en investigaciones de plantas biofungicidas. Sin embargo, este compuesto tiene un uso común por ser precursor de para la fabricación de formas sintéticas de vitamina E (PubChem, 2018a); insinuando que tal vez su acción biofungicida se deba a otros compuestos presentes que no fueron detectados en este estudio; pues muchas veces es difícil que la presión de la muestra alcance la requerida (igual o superior a 10^6 mm de mercurio) para poder realizar la detección de un amplio espectro de compuestos presentes (Yagues, 2008).

Por otro lado, el único compuesto obtenido del producto del macerado en etanol de caña, Actylol también conocido como Lactato de etilo; producto que puede obtenerse de manera natural en la fermentación del plantas o de otras materias primas renovables (PubChem, 2018b); lo que sugiere contaminación del solvente producto de su fermentación.

Finalmente, el compuesto encontrado en el producto macerado en agua, trans-2-Caren-4-ol, aunque no se encuentra agrupado en investigaciones contra el desarrollo de fitopatógenos, es el principal compuesto de las hojas de *Hyptis suaveolens* una planta con comprobada acción antibacterial (Joy *et al.*, 2013).

Es de resaltar que en este estudio al igual que el evaluado en tres especies del género *Piper* no se percibió la presencia de fenilpropanoides como constituyentes de las extracciones compuestos característicos en muchos de las especies de estas plantas (Sagastume, 2008). Sin embargo, la composición química de un extracto vegetal depende de varios factores, entre ellos; del método de extracción, las condiciones ambientales de donde se muestrea, el manejo del material en el laboratorio (limpieza, secado), la parte de la planta utilizada, entre otros; por lo cual, su identificación por distintas técnicas puede ser limitada (Celis *et al.*, 2008).

Ante todo lo expuesto, se puede deducir que la actividad antifúngica del mejor tratamiento (HD 90 %), corresponde al sinergismo entre los compuestos detectados por el GC-MS, que influyeron en la membrana celular de *S. pannosa* var. *rosae* provocando la disminución en la concentración de conidios.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- El análisis comparativo (ANOVA) a las 12 y 24 horas reveló que existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de extracción estudiados macerado e hidrodestilado ($p < 0.005$); con un porcentaje menor de variable de respuesta (conidios/mL) en el método de extracción por hidrodestilado sugiriendo que este es el método más eficaz empleado.
- De las distintas diluciones empleadas por solvente, se determinó que el tratamiento más eficaz en la reducción de conidios/mL fue para el método de extracción por hidrodestilado, el hidrolato al 90 % (HD3), y para los macerados: el etanol comercial al 90 % (ME3), el etanol de caña al 60 % (MC2), el macerado en agua al 30 % (MA1).
- Al contrastar las mejores diluciones evaluadas de los cuatro extractos (HD3,ME3,MC2,MA1), el producto del hidrodestilado (hidrolato 90 %) fue el más efectivo con valores menores al 3 % de esporas observadas a las 24 horas; siendo el producto del macerado en agua (MA1) el tratamiento menos efectivo en la reducción de conidios.
- De los análisis cromatográficos complementarios se puede concluir la presencia de compuestos monoterpénicos en la especie *Piper carpunya*; muchos de los cuales poseen actividad biológica antifúngica comprobada.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un bioensayo en campo del efecto de los extractos estudiados en rosas afectadas con Mildiú polvoso.
- Se recomienda evaluar los extractos estudiados de la especie *Piper carpunya* contra otros tipos de especies de *Oidium*.
- Se recomienda realizar análisis exhaustivos de identificación y cuantificación de los compuestos presentes en la especie *Piper carpunya* para determinar todos los componentes que puedan contribuir con el control biológico de Oídio en el rosal.
- Se recomienda especificar las características físico-químicas del alcohol de caña para eliminar factores de error y corroborar los resultados del estudio.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (ProEcuador), I. de P. de exportaciones e inversiones. (2013). *Análisis sectorial de flores*. Ecuador.
- (ProEcuador) Instituto de Promoción de Exportaciones e inversiones. (2015). *Principales productos de la oferta exportable de Ecuador*. Quito, Ecuador.
- (ProEcuador) Instituto de Promoción e inversiones. (2016). *Boletín Mensual de Comercio Exterior*. Quito, Ecuador. Retrieved from <http://www.globishecuador.com/en/comercio.php>
- (SATA), G. para la protección y nutrición vegetal. (2010). *Oidio del rosal, Powdery mildew*. Uruguay.
- Abiomed. (2015). *Tratamientos fitosanitarios en áreas forestales, parques y otros espacios ajardinados*. Salamanca.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (Quinta Edi). Florida, USA.
- Agrolimpia. (2018). *Hidrolato de Cola de Caballo - Comercialización y distribución productos organicos*.
- Aialanet S.L. (2016). *Negrilla*. Bogotá - Colombia.
- Albarracín, G., & Gallo, S. (2003). *Esencial Utilizando Piper Aduncum (Cordoncillo) Procedente De La Zona Cafetera*. Universidad de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/989/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>
- Alvarez, C., Acevedo, J., Hernandez, C., & Arias, P. (2007). *Gestión y certificación agroambiental : camino a la sustentabilidad de la floricultura. Producción + Limpia*, 2(1), 24. Retrieved from federicoalvarez@fragmento.org

- Álvarez, D. (2013). *Proyecto de factibilidad para la ampliación de 5 Has. de cultivo de la parroquia Alaquez - Provincia de Cotopaxi*. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Andrews, H., Marquez, E., & Martínez, E. (2016). Los compuestos Bioactivos y Tecnologías de Extracción. *NanoBio*, 5(1), 145.
- Arredondo, B., & Voltolina, D. (2007). Concentración, Recuento Celular y Tasa de Crecimiento. In *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (Segunda Ed, pp. 21–29). México.
- Bastidas, S. (2016). *Exportación de Hypericum hacia Estados Unidos*. Universidad de las Américas (UDLA).
- Bayer. (2014). Oidium del Rosal. El Caribe.
- Bravo, P., & Del Castillo, J. (2005). *Incidencia de la siembra y la eficacia de los principios activos del extracto de tomillo Tyus vulgaris en el control de Botrytis cinerea en Rosa sp. var, Peckoubo*. Escuela Politécnica del Ejército. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161>
- Brown-Pérez, R., Caviedes, M., Uzcátegui, E., & León-Reyes, A. (2013). Efecto del manejo de cortinas sobre los días a cosecha y la calidad en rosa de exportación (Rosa sp. var. Freedom) cultivada bajo invernadero. *Avances*, 5(2), C50–C60.
- Caldas, A. (2012). *Optimización escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido*. Universidad de Cuenca.
- Campelo, M., Lorenzana de la Varga, A., & Fernández, M. (2000). Revisión: Sphaerotheca pannosa. *Grupo de Trabajo Fitosanitario de Laboratorios, Ficha 383*, 383–384.
- Cárdenas, C., Pozo, W., Almirall, E., & Roque, A. (2016). Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos* (canela amazónica) y *Piper carpunya* (guaviduca), potenciales fungocontroladores.

- Qualitas*, 11(1), 56–83.
- Cárdenas, M. (2012). *Extracción de aceites esenciales de la flor de jazmín (Jasminum officinale) para la elaboración de una formulación de interés agroindustrial*. Universidad de San Buenaventura.
- Carrión, A., & García, C. (2010). *Preparación De Extractos Vegetales: Determinación De Eficiencia De Metódica*. Universidad de Cuenca. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
- Cativa Natureza. (2018). Hidrolato de Tea Tree Organico Natural Vegano - Cativa Natureza.
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97–105.
- Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilacion de aceites esenciales: Modelado y caracterización*. Universidad de Valladolid.
- Cervantes, F. (2014). *Evaluación de efectos de resistencia-susceptibilidad a plagas y enfermedades, productividad y calidad frente a la aplicación de citoquininas y auxinas en plantas de rosa (Rosa sp.)*. Universidad San Francisco de Quito.
- Chacon, M. (2010a). *ANTRACNOSIS*. Buenos Aires - Argentina.
- Chacon, M. (2010b). *Roya*. Buenos Aires - Argentina.
- Delgado, G., Kato, M., Vásquez, N., Minchala, J., & Rojas, C. (2012). Cultivo de tejidos de Piper sp. (Piperaceae): Propagación, organogénesis y conservación de germoplasma in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 49–60.
- Diario el Comercio. (2017). *Estados Unidos será el principal destino de las rosas*. Quito, Ecuador.

- Diario El Telégrafo. (2016). *En 2015, la exportación de flores generó \$ 820 millones*. Quito, Ecuador.
- Diario El Telégrafo. (2017). *Exportación de flores creció por época del Día de la Madre*. Quito, Ecuador.
- Diario El Universo. (2010). Ecuador experimenta nuevo mercado de rosas comestibles. Guayaquil, Ecuador.
- Diario Metro. (2017). Regalan rosas ecuatorianas en China. Quito, Ecuador.
- Díaz, N. (2012). *Obtención y evaluación in vitro de la eficiencia de extractos con principios activos de eucalipto (Eucalyptus globulus), ajo (Allium sativum) y Crisantemo (Chrysanthemum cinerariaefolium) como fungicidas naturales para el control de Botrytis cinerea, Phra*. Escuela Politécnica del Ejército. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/6840>
- Domínguez-Serrano, D., García-Velasco, R., Mora-Herrera, M. E., & Salgado-Siclan, M. L. (2015). Identificación y alternativas de manejo de la cenicilla del rosal. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 22–42. <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1509-1>
- El Telégrafo. (2015). Ecuador vende más de \$ 200 millones en flores por San Valentín (Infografía).
- Expoflores. (2015). Informe de los principales exportadores de flores. Quito, Ecuador.
- Expoflores. (2016). Variedades: La estrategia exitosa de la floricultura ecuatoriana. Quito, Ecuador.
- Félix, R., Herrera, G., & Martínez, C. (2014). First Report of Powdery Mildew (*Podosphaera pannosa*) of Roses in Sinaloa México. *The American Phytopathological Society*, 98(10),

1442–1443.

- García, P. (2014). *Aceites Esenciales: Mitos y Realidades*. Universidad D'Alacant. Retrieved from <http://zaguan.unizar.es/taz/eucs/2014/14180/taz-tfg-2014-408.pdf>
- Giral, N. (2011). Obtención y aplicación de extractos naturales. *Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria*, 1(8), 6.
- González, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>
- Hansen, M. A. (2009). Powdery Mildew of Ornamental Plants. *Physiology and Weed Science*, 20(5), 1–2.
- Heffer, V., Johnson, K. B., Powelson, M. L., & Shishkoff, N. (2006). Identification of Powdery Mildew Fungi. *The American Phytopathological Society*, 10(5), 1–7.
- InfoAgro. (2016). El cultivo de las rosas para corte. Costa Rica.
- Infojardin. (2015a). Chancro, Cancro, Cancros, Chancros.
- Infojardin. (2015b). Mildiu, Mildius, Mildium.
- Infojardin. (2015c). Oidio, Blanca, Blanquilla, Blanqueta, Mal blanco, Cenizo, Oidiopsis, Oidios, Oidium.
- Joy, B., Omanakutty, M., & Mathew, M. (2013). Antibacterial effects and chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens* poit leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(4), 384–390. <http://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643644>
- Landino, C. (2017). *Potencialidad del género Piper como fuente de sustancias para el control de hongos fitopatógenos*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from http://bdigital.unal.edu.co/64874/1/Cristobal_Ladino_4238394_Monografia.pdf

- López, J. (n.d.). Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos.
- López, L. (2009). *Análisis de la Producción Florícola en el Ecuador y su exportación durante el periodo 2006-2007*. Universidad del Azuay.
- López, L. (2017). *Identificación y caracterización de los metabolitos secundarios específicos de Piper carpunya, con acción anti fúngica*. Universidad de las Fuerzas Armada (ESPE).
- Márquez, T. (2009). *Problemática de oídio en cultivo de frutales. Situación actual y perspectivas de futuro*. Barcelona.
- Mehani, M., Segni, L., Terzi, V., Morcia, C., Ghizzoni, R., Goudjil, M. B., & Bencheikh, S. E. (2015). Antibacterial, antifungal activity and chemical composition study of essential oil of *Mentha pepirita* from the South Algerian. *Der Pharma Chemica*, 7(12), 382–387.
- Mejía, L., & Cuaran, H. (2004). *Identificación de alternativas de producción más limpia en Flores del Cacique Ltda*. Universidad de la Sabana. Retrieved from <http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/4993/130108.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ministerio del Comercio Exterior. (2014). Ecuador fortalecerá sector florícola. Quito, Ecuador.
- Montes, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Americana de Micología*, 29(1), 73–82. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v29/v29a10.pdf>
- Morales, J. (2015). Oidio rosas o rosal. Barcelona.
- Morcía, C., Malnati, M., & Terzi, V. (2013). *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol , eugenol , carvone , 1 , 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants*, 29(3), 415–422.

<http://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>

- Neria, M. (2010). *Estudio fitofarmacológico del manejo del oídio (Oidium sp.), Trips (Frankliniella occidentalis) y pulgones (Mysus sp.), en rosas de exportación con la utilización de extractos vegetales*. Universidad Técnica de Ambato.
- Noreiga, P., Mosquera, T., Baldisserotto, A., Abad, J., Aillon, C., Cabezas, D., ... Manfredini, S. (2015). Chemical Composition and in vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 2(24), 29–31.
- Noticias Telesur. (2016). Ecuador exporta 15 mil toneladas de rosas por San Valentín. Ecuador.
- Nusret, G., Huseyin, A., Mahfuz, E., Zeynep, A., Isa, K., & Bedrettin, S. (2017). Essential oil composition and antifungal and antibacterial activity of *Achillea Cappadocica*. *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, 15(5), 1507–1510.
- Orlando, G. (2009). *Control de Botrytis (Botrytis cinerea) y Mildiu vellosa (Peronospora sparsa) en el cultivo de rosa (Rosa sp. Variedad Forever Young) mediante el uso de Trichoderma harzianum Rifai*. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- Ortega, V. (2011). *Evaluación in vitro en laboratorio de seis fungicidas con diferentes mecanismos de acción, como alternativa para el control de Oídio (Sphaeroteca pannosa) en el cultivo aislado de rosas*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Padrón, B. (2010). *Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia Myrtaceae y Lauraceae*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
Retrieved from http://eprints.uanl.mx/2710/1/tesis_doctorado_BPM.pdf
- Panjón, Á., & Vintimilla, V. (2008). *Manejo integrado de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de rosas (Rosa sp.) bajo invernadero*. Universidad de Cuenca.

- Parra, J. (2011). *Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de Piper cf. cumanense Kunth (Piperaceae)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Pârvu, M., & Pârvu, A. (2012). *Parasitic fungi on roses. Current microscopy contributions to advances in science and technology* (Vol. 12). Cluj-Napoca, Rumania.
- Pataky, N. (2000). Powdery Mildews of ornamentals. *Plant Disease*, 617(1), 1–8.
- Peredo, H., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24–32.
- Pérez, A., Fernández, D., De Vicente, A., Tóres, J., & López, F. (2015). Resistencia a inhibidores de la biosíntesis de ergosterol y a estrobilurinas en oídio de cucurbitáceas. *Phytohemeroteca*, 173(1), 1–10.
- Pérez, Y., Rodríguez, E., Aguilar, B., Gonzáles, M., & Hung, B. (2016). Caracterización físico-química de extractos de *Spondias mombin* L. Physico-chemical characterization of extracts of *Spondias mombin* L. Resumen Introducción Materiales y métodos. *Revista Cubana de Química*, 28(1), 444–449.
- Perilla, L., & Sanabria, A. (2007). *Condiciones que favorecen el desarrollo del mildew polvoso (Sphaerotheca pannosa var rosae) en los cultivos de rosa de la Sabana de Bogotá*. Pontificia Universidad Javeriana.
- PPDB: Pesticide Properties DataBase. (2018). alpha-terpineol. Reino Unido.
- Pressreader. (2018). Los Hidrolatos. Ecuador.
- PubChem. (2018a). Compound Summary for CID 5366244: Phytol. Estados Unidos.
- PubChem. (2018b). Compound Summary for CID 7344: Ethyl lactate.
- Revista Líderes. (2015). El 2015 es un año de ajustes para el sector floricultor ecuatoriano. Quito, Ecuador.

- Riofrío, J. (2012). *Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de los metabolitos secundarios de Piper carpunya*. Universidad Católica de Loja.
- Rodríguez, M., Alcaráz, L., & Real, S. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. México.
- Rodríguez, M. del P. (2001). Biodiversidad de los hongos Fitopatógenos en los suelos de México. *Acta Zoológica*, 1(1), 53–78.
- Roque, L. (2012). OIDIUM. Tacna.
- Sagastume, D. (2008). *Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género piper y evaluación de la actividad citotóxica*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Sánchez, J. (2015). *Plagas y enfermedades de las plantas*. Barcelona.
- Sánchez Martín, M., & Sánchez Camazano, M. (2006). *Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Salamanca, España. Retrieved from <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>
- Sarmiento, O. (2016). *Evaluación de la cinética de extracción del aceite esencial de Calendula officinalis l. mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación*. Universidad nacional abierta y a distancia unad.
- Sepúlveda, P. (2017). *Enfermedades causadas por hongos y su manejo*. Chile.
- Setlow, P. (2004). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*, 10(9), 1–14. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Taborda, L. (2013). *Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de LippiaoriganoidesHBK y ThymusvulgarisL como alternativas de manejo de Colletotrichummusae en banano y Botrytiscinerea en fresa*. Universidad Nacional de

- Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/12710/>
- Tijerina, N., Lira, K., Moreno, V., González, J., & Mayek, N. (2014). Efecto del estrés osmótico in vitro en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Micología*, 39(1), 31–39.
- Torés, J., & Segarra, J. (2014). Oídios. In G. Llácer, M. López, A. Trapero, & A. Bello (Eds.), *Patología Vegetal* (Tomo II, pp. 821–845). España.
- Torres, J. (2004). *Las explotaciones florícolas como fuente de mano de obra rural en la sierra norte*. Instituto de Altos Estudios Nacionales, Quito, Ecuador.
- Tuttle, M. (2014). *¿Qué son los fungicidas? The Plant Health Instructor* (Vol. 1). Estados Unidos.
- Van Rooi, C. (2002). *Infection by dry , airborne Botrytis cinerea conidia and fungicide efficacy on different parts of grape bunches and vinelets*. Universidad de Stellenosch.
- Vásquez, V. (2013). *Control de Trips (Frankliniella occidentales) mediante a aplicación de tres extractos botánicos en el de Rosas (Rosa sp.) Variedad Mohana*. Universidad Central del Ecuador.
- Velásquez, M., Álvarez, R., Tamayo, P., & Carvalho, C. (2014). Evaluation in vitro of the fungistatic activity of the mandarin essential oil on the growth of *Penicillium* sp. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 7–14. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-
- Yagues Gomis, V. (2008). Espectrometría de masas. *Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química*, 1–43. Retrieved from <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8249>
- Yong, A. (2004a). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, 25(2), 53–67.
- Yong, A. (2004b). Técnicas de formación y manejo del rosal. *Cultivos Tropicales*, 25(4), 53–60.

CAPÍTULO IX

ANEXO A.

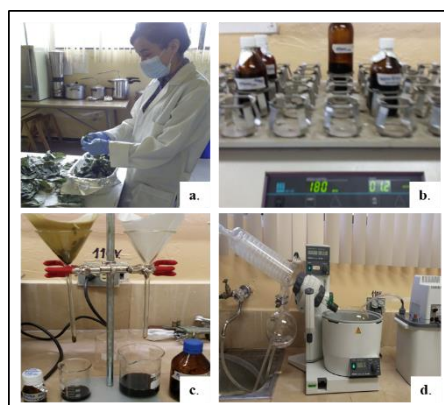
Materiales y Metodología

ANEXO A.1. Recolección de muestras



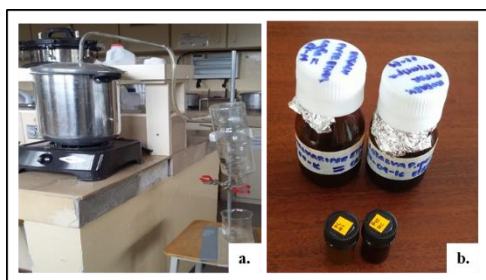
a) Hojas de *Piper carpunya*, b) Rosal con evidencia de Mildiú polvoso c) Hojas de rosa “wow”, infectas d) esporas colectadas.

ANEXO A.2. Procesamiento de muestras para la obtención de extractos en maceración



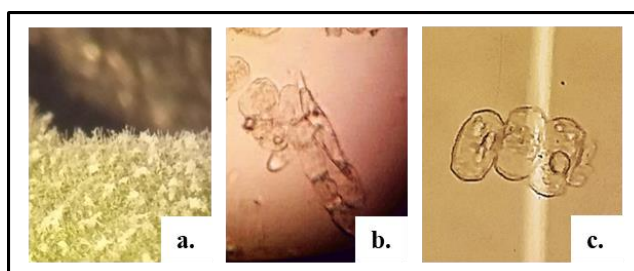
a) Desinfección de las muestras, b) Agitación del material pulverizado, c) filtrado de los macerados, d) rotaevaporado.

ANEXO A.3. Procesamiento de muestras para la obtención del hidrolato



a) Proceso de arrastre por vapor, b) muestras de hidrodestilación

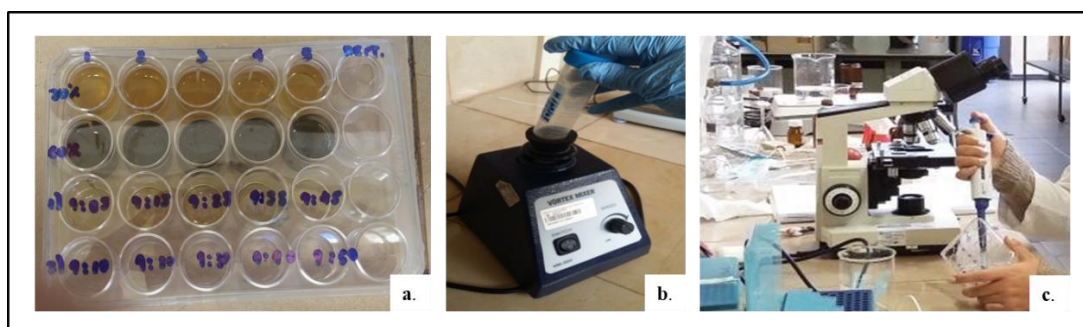
ANEXO A.4. Evaluación microscópica del fitopatógeno



a) *S. pannosa* visto por estereomicroscopio, b) Conidióforos visto por microscopio c)

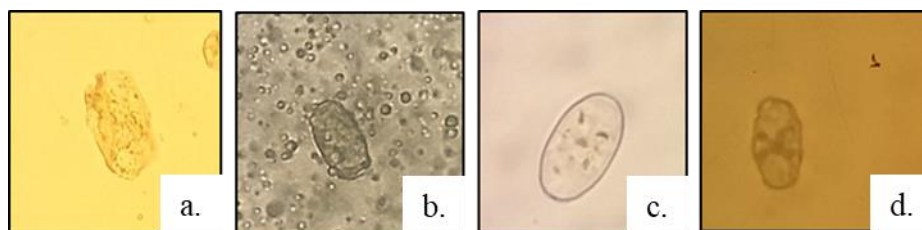
conidios observados en cámara de Neubauer

ANEXO A.5. Análisis *in vitro* de los extractos



a) Extractos en pocillos dispuestos en placas de cultivo múltiple celular b) suspensión de conidios homogenizada c) transferencia de los conidios a los pocillos con los extractos

ANEXO A.6. Evaluación microscópica de los tratamientos



- a) Hidrodestilado, b) macerado en etanol comercial, c) macerado en agua, d) macerado en etanol de caña

ANEXO B.

Diseño Experimental

ANEXO B.1. Resultados del hidrodestilado a las 12 y valores similares a las 24 horas

TRATAMIENTO	CONTEO 12 HORAS
HIDRODESTILADO 30	40,91
HIDRODESTILADO 30	35,71
HIDRODESTILADO 30	42,50
HIDRODESTILADO 30	40,00
HIDRODESTILADO 30	38,64
HIDRODESTILADO 60	31,82
HIDRODESTILADO 60	34,09
HIDRODESTILADO 60	33,33
HIDRODESTILADO 60	34,88
HIDRODESTILADO 60	35,00
HIDRODESTILADO 90	2,22
HIDRODESTILADO 90	2,38
HIDRODESTILADO 90	4,08
HIDRODESTILADO 90	4,17
HIDRODESTILADO 90	2,13

Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV
 Columna2 15 0,99 0,99 6,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

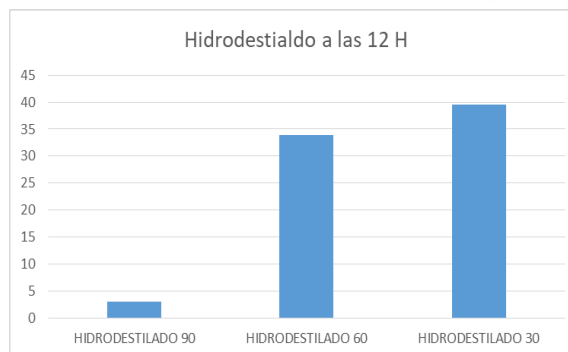
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3865,86	2	1932,93	619,49	<0,0001
Columnal	3865,86	2	1932,93	619,49	<0,0001
Error	37,44	12	3,12		
Total	3903,30	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,98046

Error: 3,1202 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.
HIDRODESTILADO 90	3,00	5	0,79 A
HIDRODESTILADO 60	33,82	5	0,79 B
HIDRODESTILADO 30	39,55	5	0,79 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



ANEXO B.2. Resultados del macerado en etanol a 12 y valores similares a las 24 horas

TRATAMIENTO	CONTEO 12 HORAS
ETANOL 30	53,61
ETANOL 30	54,95
ETANOL 30	55,91
ETANOL 30	52,53
ETANOL 30	53,85
ETANOL 60	49,37
ETANOL 60	46,43
ETANOL 60	45,00
ETANOL 60	48,10
ETANOL 60	45,45
ETANOL 90	34,15
ETANOL 90	34,21
ETANOL 90	33,77
ETANOL 90	32,47
ETANOL 90	32,91

Análisis de la varianza

Variable N R² R² A_j CV
 Columna2 15 0,98 0,97 3,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1118,89	2	559,45	245,81	<0,0001
Columna1	1118,89	2	559,45	245,81	<0,0001
Error	27,31	12	2,28		
Total	1146,20	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,54551

Error: 2,2760 gl: 12

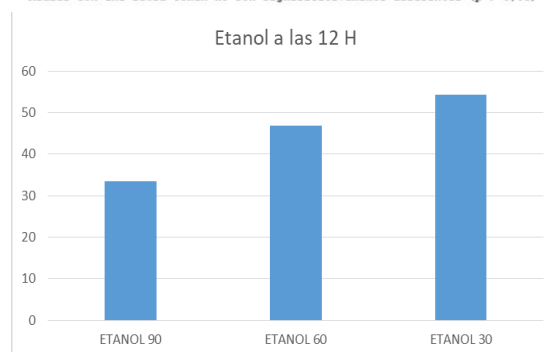
Columnal Medias n E.E.

ETANOL 90 33,50 5 0,67 A

ETANOL 60 46,87 5 0,67 B

ETANOL 30 54,39 5 0,67 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



ANEXO B.3. Resultados del macerado en etanol caña a las 12 y valores similares a las 24 horas

TRATAMIENTO	CONTEO 12 HORAS
CAÑA 30	71,43
CAÑA 30	76,60
CAÑA 30	74,00
CAÑA 30	78,26
CAÑA 30	75,00
CAÑA 60	60,42
CAÑA 60	61,22
CAÑA 60	67,35
CAÑA 60	62,75
CAÑA 60	62,75
CAÑA 90	64,47
CAÑA 90	63,16
CAÑA 90	61,84
CAÑA 90	62,50
CAÑA 90	61,97

Análisis de la varianza

Variable N R² R² A_j CV
 Columna2 15 0,89 0,87 3,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	497,38	2	248,69	49,45	<0,0001
Columna1	497,38	2	248,69	49,45	<0,0001
Error	60,35	12	5,03		
Total	557,74	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,78405

Error: 5,0295 gl: 12

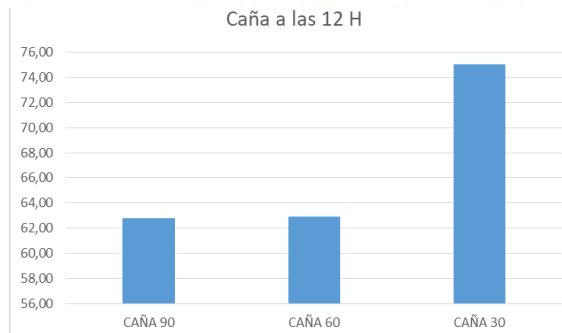
Columnal Medias n E.E.

CAÑA 90 62,79 5 1,00 A

CAÑA 60 62,90 5 1,00 A

CAÑA 30 75,06 5 1,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



ANEXO B.4. Resultados del macerado en agua a las 12 y valores similares a las 24 horas

TRATAMIENTO	CONTEO 12 HORAS
AGUA 30	79,17
AGUA 30	78,26
AGUA 30	77,19
AGUA 30	71,11
AGUA 30	78,57
AGUA 60	74,58
AGUA 60	79,66
AGUA 60	77,78
AGUA 60	75,00
AGUA 60	75,86
AGUA 90	75,00
AGUA 90	74,42
AGUA 90	77,92
AGUA 90	71,79
AGUA 90	76,60

Análisis de la varianza

Variable N R² R² A_j CV
 Columna2 15 0,09 0,00 3,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,44	2	4,22	0,61	0,5592
Columnal	8,44	2	4,22	0,61	0,5592
Error	82,95	12	6,91		
Total	91,39	14			

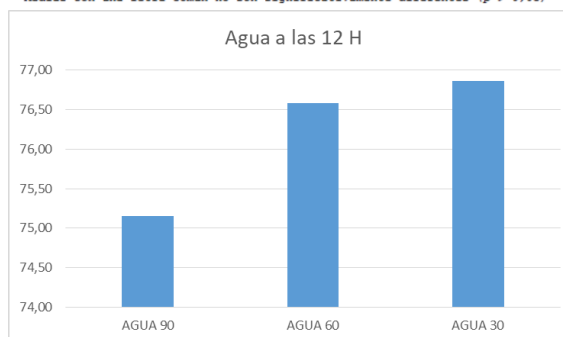
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,43628

Error: 6,9128 gl: 12

Columnal Medias n E.E.

AGUA 90	75,15	5	1,18	A
AGUA 60	76,58	5	1,18	A
AGUA 30	76,86	5	1,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



ANEXO C.

GC_MS: cromatógrafo de gases Varian 3900 y espectrofotómetro de masas Varian Saturn 2100

