



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN  
*Moniliophthora roreri* DE FRUTOS DE CACAO (*Theobroma cacao*  
*L*) DE EXTRACTOS DE LÁTEX DE SANDE DE *Brosimum utile*  
KUNTH”**

**TESIS DE GRADO**  
**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTOR: ALICIA ABIGAIL MORETA MANOTOA**

**TUTOR: Lic. KAREN ACOSTA M.Sc**

**Riobamba–Ecuador**

**2015**

## ***DEDICATORIA***

A Dios por darme su bendición y sabiduría, por enseñarme a caminar por el camino correcto y por ser mi amigo incondicional en los buenos y malos momentos.

A mis padres María y Segundo como recompensa al sacrificio y esfuerzo de cada día, por el ejemplo de humildad, lucha y perseverancia, por su comprensión y motivación en los momentos más difíciles.

A mi hermana Diana por su formidable cariño, amistad y apoyo en los momentos de tristeza y felicidad

Alicia

## ***AGRADECIMIENTO***

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por contribuir en mi formación ética y profesional.

A Dios por regalarme la salud y la vida para cumplir mis objetivos. A mis padres y hermana por sus consejos, amor, confianza y su apoyo incondicional para lograr cada una de mis metas.

A mi tutora Lic. Karen Acosta y colaboradora Ing. Paola Arguello por su valioso asesoramiento y apoyo en el desarrollo de esta investigación. Gracias por su colaboración, paciencia, tiempo, y por compartir sus conocimientos para resolver cada uno de los problemas de esta investigación.

A mis maestros y a todos quienes de una u otra manera fueron parte de mi enseñanza aprendizaje.

Alicia

# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

## FACULTAD DE CIENCIAS

### ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN *Moniliophthora roreri* DE FRUTOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L) DE EXTRACTOS DE LÁTEX DE SANDE DE *Brosimum utile* KUNTH**” de responsabilidad de la señorita egresada Alicia Abigail Moreta Manotoa, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Nancy Veloz  
**DECANA DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS**

-----

-----

Dra. Ana Albuja  
**DIRECTOR DE LA ESCUELA  
DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

-----

-----

Lic. Karen Acosta. M.Sc.  
**DIRECTOR DE TESIS**

-----

-----

Ing. Paola Arguello. M.Sc.  
**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

-----

-----

Abg. Bertha Quintanilla.  
**COORDINADORA  
SISBIB - ESPOCH**

-----

-----

**NOTA DE TESIS ESCRITA**

-----

Yo, Alicia Abigail Moreta Manotoa, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

**ALICIA ABIGAIL MORETA MANOTOA**

## INDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1 MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
1.1 <b>Moniliasis o podredumbre de las mazorcas de cacao.</b>	<b>6</b>
1.1.1 <b>Origen y distribución</b>	<b>6</b>
1.1.2 <b>Epidemiología</b>	<b>7</b>
1.1.3 <b>Impacto de la moniliasis del cacao en América Latina</b>	<b>7</b>
1.1.4 <b>Taxonomía de <i>Moniliophthora roreri</i>.</b>	<b>9</b>
1.1.5 <b>Morfología</b>	<b>9</b>
1.1.6 <b>Control de moniliasis</b>	<b>9</b>
1.1.7 <b>Manejo Integrado de Plagas (MIP)</b>	<b>9</b>
1.2 <b>Control de fitopatógenos mediante el uso de extractos de plantas.</b>	<b>10</b>
1.3 <b>Árbol de Sande (<i>Brosimum utile</i>)</b>	<b>14</b>
1.3.1 <b>Generalidades</b>	<b>14</b>
1.3.2 <b>Taxonomía de <i>B. utile</i></b>	<b>15</b>
1.3.3 <b>Habitad y distribución</b>	<b>15</b>
1.3.4 <b>Descripción del árbol de Sande (<i>Brosimum utile</i>)</b>	<b>15</b>
1.3.5 <b>Fenología</b>	<b>16</b>
1.3.6 <b>Usos</b>	<b>16</b>
1.4 <b>Importancia de los metabolitos secundarios de las plantas</b>	<b>17</b>

<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Lugar de Experimentación</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Materiales, Equipos y Reactivos</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Materia Prima</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Recolección de la materia prima</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Materiales</b>	<b>20</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Reactivos</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Equipos</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Control de calidad de la materia prima</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Estudio Fitoquímico del látex de Sande de <i>Brosimum utile</i></b>	<b>22</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Evaluación de solubilidad del látex de Sande</b>	<b>22</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Tamizaje fitoquímico</b>	<b>23</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Obtención, aislamiento e identificación cualitativa de la fracción terpénica y alcaloide del látex de Sande de <i>Brosimum utile</i></b>	<b>30</b>
<b>2.5.3.1</b>	<b>Extracción de la fracción terpénica del látex de Sande de <i>Brosimum utile</i></b>	<b>30</b>
<b>2.5.3.2</b>	<b>Extracción de la fracción alcaloide del látex de Sande de <i>Brosimum utile</i></b>	<b>32</b>
<b>2.6</b>	<b>Obtención de <i>Moniliophthora roreri</i> de frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) infectado por monilia</b>	<b>34</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i></b>	<b>34</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Purificación de <i>Moniliophthora roreri</i> de frutos de cacao infectado por monilia.</b>	<b>35</b>
<b>2.7</b>	<b>Evaluación de la actividad antifúngica in vitro mediante el método de dilución con suspensión de esporas</b>	<b>36</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Preparación de esporas de <i>Moniliophthora roreri</i></b>	<b>36</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Preparación de extractos</b>	<b>36</b>
<b>2.7.3</b>	<b>Preparación de Agar Sabouraud</b>	<b>36</b>
<b>2.7.4</b>	<b>Evaluación de la actividad antifúngica</b>	<b>37</b>

<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Análisis de solubilidad del látex de sande de <i>Brosimum utile</i></b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Análisis de las características organolépticas y parámetros físicoquímicos del látex de sande de <i>Brosimum utile</i>.</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Tamizaje fitoquímico</b>	<b>41</b>
<b>3.4.</b>	<b>Rendimiento de extracción de la fracción terpénica y alcaloide</b>	<b>43</b>
<b>3.5</b>	<b>Pruebas de identificación de la fracción terpénica y alcaloide</b>	<b>44</b>
<b>3.6</b>	<b>Cromatografía TLC para la fracción terpénica</b>	<b>44</b>
<b>3.7</b>	<b>Cromatografía TLC para la fracción alcaloide</b>	<b>46</b>
<b>3.8</b>	<b>Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i> de frutos de cacao infectado.</b>	<b>47</b>
<b>3.9</b>	<b>Evaluación de la actividad antifúngica</b>	<b>55</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>60</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AECID</b>	Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo
<b>CATIE</b>	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
<b>UICN</b>	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
<b>INIAP</b>	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
<b>MIP</b>	Manejo Integrado de Plagas
<b>PNUMA</b>	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
<b>FAO</b>	Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>INEC</b>	Instituto de Normalización de Estadísticas y Censos.
<b>pH</b>	Puente de hidrógeno
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>°T</b>	Temperatura
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>EtOAc</b>	Acetato de etilo
<b>E.A</b>	Extracto Acetónico
<b>A.H</b>	Extracto Hexánico
<b>E.AC</b>	Extracto Acuoso
<b>E.ET</b>	Extracto Etéreo
<b>CH<sub>2</sub>O</b>	Formaldehído
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico

<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de amonio
<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio
<b>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O</b>	Éter etílico
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>M</b>	Molar
<b>L</b>	Litro
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>C</b>	Concentración
<b>mg</b>	Miligramos
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>mL</b>	Militros
<b>ESPOCH</b>	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
<b>PDA</b>	Agar Papa Dextrosa
<b>V/v</b>	Volumen: volumen
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>μL</b>	Microlitros
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>Cm</b>	Centímetros
<b>Ø</b>	Diámetro
<b>%</b>	Porcentaje

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-1</b>	PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE CACAO (ICCO Y CACAO MÉXICO).	8
<b>FIGURA 2-1</b>	FRUTOS DE CACAO AFECTADOS POR MONILIASIS	8
<b>FIGURA 3-1</b>	ÁRBOL DE SANDE ( <i>Brosimum utile</i> )	14
<b>FIGURA 4-2.</b>	EXTRACCIÓN SUCESIVA DEL LÁTEX DE SANDE DE <i>Brosimum utile</i> PARA EL ANÁLISIS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO.	23
<b>FIGURA 5-2.</b>	ESQUEMA DE OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN TERPÉNICA DEL LÁTEX DE SANDE DE <i>Brosimum utile</i>	30
<b>FIGURA 6-2</b>	ESQUEMA DE OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDE DEL LÁTEX DE SANDE DE <i>Brosimum utile</i>	32

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>FOTOGRAFÍA 1-2</b>	MUESTRAS RECOLECTADAS DEL CACAO INFECTADO POR MONILIA	34
<b>FOTOGRAFÍA 2-3</b>	CCF DEL EXTRACTO HEXÁNICO	45
<b>FOTOGRAFÍA 3-3</b>	UV DE LA CCF DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO LUEGO DE REVELAR CON DRAGENDORFF (A). VISTA DIRECTA DE CCF DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO LUEGO DE REVELAR EN NaNO <sub>2</sub> 10 % (B)	46
<b>FOTOGRAFÍA 4-3</b>	APARIENCIA MICROSCÓPICA DE <i>Moniliophthora roreri</i>	53
<b>FOTOGRAFÍA 5-3</b>	CULTIVO EN SABOURAUD DEXTROSA AGAR DE <i>Moniliophthora roreri</i>	54
<b>FOTOGRAFÍA 6-3</b>	APARIENCIA MICROSCÓPICA DE <i>M. RORERI</i> :	55
<b>FOTOGRAFÍA 7-3</b>	MATERIA PRIMA: LÁTEX DE SANDE ( <i>Brosimum utile</i> )	78
<b>FOTOGRAFÍA 8-3</b>	TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL LÁTEX DE SANDE ( <i>Brosimum utile</i> )	78
<b>FOTOGRAFÍA 9-3</b>	EXTRACCIÓN DE TERPENOS DEL LÁTEX DE ( <i>Brosimum utile</i> )	79
<b>FOTOGRAFÍA 10-3</b>	EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES DEL LÁTEX DE ( <i>Brosimum utile</i> )	80
<b>FOTOGRAFÍA 11-3</b>	EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i> EN <i>Moniliophthora roreri</i> MEDIANTE EL MÉTODO DE DILUCIÓN CON SUSPENSIÓN DE ESPORAS	81

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1-2.</b>	REACCIONES DE COLORACIÓN Y PRECIPITACIÓN APLICADAS EN EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL LÁTEX DE SANDE ( <i>Brosimum utile</i> )	24
<b>TABLA 2-2.</b>	CODIFICACIÓN DE LAS CAJAS PETRI PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	37
<b>TABLA 3-3.</b>	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL LÁTEX DE SANDE DE <i>Brosimum utile</i>	39
<b>TABLA 4-3</b>	RESULTADOS DEL ANÁLISIS CUALITATIVO DE DIFERENTES EXTRACTOS DEL LÁTEX DE SANDE DE <i>Brosimum utile</i>	41
<b>TABLA 5-3</b>	ANÁLISIS CUALITATIVO DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y CLOROFÓRMICO DEL LÁTEX DE SANDE DE <i>Brosimum utile</i> .	44
<b>TABLA 6-3</b>	DATOS DE LA CROMATOGRAFÍA TLC DE LA FRACCIÓN ALCALOIDE DEL LÁTEX DE SANDE DE <i>Brosimum utile</i>	46
<b>TABLA 7-3</b>	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCOÓPICA DE <i>Moniliophthora roreri</i> EN DOS MEDIOS DE CULTIVO	48
<b>TABLA 8-3</b>	RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE <i>M. roreri</i> , OBTENIDA DE LA RESIEMBRA	53
<b>TABLA 9-3</b>	APARIENCIA MACROSCÓPICAS Y MICROSCOPICA DE <i>Moniliophthora roreri</i>	54
<b>TABLA 10-3</b>	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA EN <i>Moniliophthora roreri</i>	56

## RESUMEN

Se realizó la evaluación de la actividad antifúngica en *Moniliophthora roreri* aislados de frutos de Cacao (*Theobroma cacao L*) de extractos de látex de Sande de *Brosimum utile* Kunth, desarrollada en los Laboratorios de: Productos Naturales de Fitoquímica de la Escuela de Bioquímica Farmacia y microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para determinar los metabolitos con posibles aplicaciones en el tratamiento de plagas y enfermedades. Se recolectó adecuadamente una muestra del látex de Sande de la especie *B.utile*, de la parroquia La Belleza, provincia de Orellana. Posteriormente se determinó las características organolépticas, parámetros fisicoquímicos, se realizó el tamizaje fitoquímico y la extracción de la fracción terpénica y alcaloide. Mientras, que el fitopatógeno fue aislado satisfactoriamente en agar Sabouraud, para ello, se localizaron parcelas de cacao infectado por el hongo y se realizó un muestreo aleatorio simple de frutos enfermos. En el tamizaje se determinó la presencia de compuestos grasos, terpenos y/o esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, resinas y saponinas. El rendimiento a escala de laboratorio de la fracción terpénica fue mejor en relación a la de los alcaloides. En la evaluación de la actividad antifúngica el extracto total y el terpénico mostraron actividad en *M. roreri* a 2000 ppm mientras que el extracto alcaloide a 500 ppm ya muestra actividad antifúngica sobre el fitopatógeno. Por tanto, se puede realizar aplicaciones a nivel de la agricultura principalmente en el control de plagas y enfermedades. Se concluye que los terpenos identificados en el extracto hexánico y alcaloides en el extracto clorofórmico del látex de Sande de *Brosimum utile* presentan actividad antifúngica *in vitro*. Se recomienda identificar molecularmente el tipo de terpenos y alcaloides presentes en el látex de Sande para atribuir con mayor exactitud los responsables de la actividad antifúngica.

## SUMMARY

An evaluation of antifungal activity in *Moniliophthora roreri* isolated from fruit of cacao tree (*Theobroma cacao L*) latex Sande *Brosimum utile* Kunth extract was developed in the laboratories of: natural phytochemical products from Biochemistry and Microbiology pharmacy School of Sciences Faculty at the Polytechnic School of Chimborazo to determine the metabolites with potential applications in the pests and diseases treatment. It collected a sample of latex Sande of *B.utile* specie from la Belleza parish at Orellana province. After that were determined the organoleptic characteristics, physicochemical parameters, phytochemical screening was performed and the removal of terpene fraction and alkaloid. While, the plant pathogen was isolated successfully in agar Sabouraud, for this were located cocoa plots infect by the fungus and a simple random of spoil fruits was performed. In screening was determined fatty compounds, terpenes and/or steroids, alkaloids, phenolic compounds, resins and saponins. The performance laboratory scale of terpene fraction was better from the alkaloids. In the evaluation of the antifungal activity the total terpene extract showed activity in *M. roreri* to 2.000 ppm while the alkaloid extract 500 ppm shows antifungal activity against the phytopathogen. Therefore applications can be performed in the agriculture mainly in the control of pest and diseases. The terpenes identified in the hexane extract and chloroform extract alkaloids of latex Sande *Brosimum utile* have antifungal activity *in vitro*. It is recommend to identify molecularly the type of terpenes and alkaloids existent in latex Sande to attribute more accurately the responsible for the antifungal activity.

## INTRODUCCIÓN

La salud y el medio ambiente están intrínsecamente relacionados. El aire, el agua, el entorno que nos rodea están involucrados en nuestro bienestar y nuestra salud, por lo tanto la calidad y el cuidado de nuestro entorno son trascendentales para mantener una buena salud. (Comisión Europea, 2007). El ambiente es uno de los medios más afectado por un sinnúmero de factores entre ellos, el uso de plaguicidas es un problema que aumenta en las últimas décadas (Bruno, 2008)

Un informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) reveló que hasta el 2020 la producción y uso de agroquímicos en América Latina crecerá un 33% (Vindas, 2014). Además los países en vías de desarrollo son los más grandes usuarios de plaguicidas con un consumo del 75% de la producción mundial (Ministerio de la Salud., et al. 2007). Después de Brasil, México y Colombia, el Ecuador es el cuarto país en consumir plaguicidas organofosforados en América Latina. En nuestro país el uso de plaguicidas superó los 28 millones de kilogramos de los cuáles el 97% de correspondieron a los insecticidas (organofosforados y carbamatos) principalmente herbicidas y fungicidas (Villafuerte, 2010)

Según el Ministerio del Ambiente, Ecociencia y Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, (2000), el Ecuador es un país biodiverso con variados ecosistemas y recursos, entre los datos indicativos de estas particularidades están 20000 especies de plantas, 394 especies de reptiles, 1616 especies de aves, 1340 especies de peces y 369 especies de mamíferos (Ministerio del Ambiente, Instituto de Ciencias Químicas, & Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2004), estas especies son amenazados por la degradación y la contaminación que ocasiona la producción agrícola.

En el Ecuador, la superficie agropecuaria en el 2012 fue de 7,3 millones de hectáreas, siendo las provincias con mayor superficie agraria Manabí, Guayas, Los Ríos y Loja. Los cultivos permanentes representan el 18,74% de la superficie y los transitorios el 13,83%

de la producción (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2012). Considerando la cantidad y extensión de cultivos en el país, ha sido necesario el uso de agroquímicos para combatir plagas y enfermedades. Sin embargo, dado el impacto ambiental que esto provoca se utilizan otras alternativas de fitocontrol, tales como el manejo integrado de plagas o el uso de extractos de metabolitos secundarios de origen natural. Los metabolitos secundarios son de gran importancia comercial y son usados como aromas, sabores y colores en industrias de alimentos, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico y medicinal (Rocha, 2010).

En la región de la costa ecuatoriana, destaca la producción de los cultivos de banano, café, cacao y arroz, los mismos que predominan por las condiciones del clima y suelo (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2012). La producción agrícola del Ecuador varía de acuerdo a las condiciones climáticas pero éstas también provocan un sinnúmero de plagas, enfermedades y malezas en los diversos cultivos (Llumiquinga, 2009). Este problema en los cultivos se genera por fitopatógenos como hongos, bacterias, parásitos, virus nemátodos y protozoarios; pero la clave es controlar las enfermedades o plagas garantizando el rendimiento de los cultivos, para ello la mayoría de agricultores utilizan agroquímicos afectando de manera negativa al medio ambiente. El cacao es uno de los productos de gran importancia económica en Ecuador, lastimosamente el bajo rendimiento de la producción es una de las consecuencias provocadas por enfermedades fúngicas, tales como: moniliasis, la mazorca negra, mal del machete, antracnosis, escoba de brujas (Barrera & Hurtado, 2012). Principalmente el hongo *Moniliophthora roreri* es el causante de la moniliasis, infectando a los frutos de cacao de diferentes edades, siendo capaz de afectar hasta el 95% de la producción total en un cacaotal, lo cual trae grandes pérdidas económicas (Gonzalez & Roble, 2014). Los agricultores cacaoteros usan plaguicidas de diferentes sellos con el fin de controlar plagas y enfermedades que afectan a este cultivo. Así en el 10,2 % de las hectáreas de los cultivos de cacao se emplean plaguicidas de sello rojo (extremadamente tóxicos), en el 24,4 % se aplican plaguicidas de sello amarillo (altamente tóxicos), en el 14.4 % se utilizan plaguicidas de sello azul (medianamente tóxicos), en el 39,9 % se usan plaguicidas de sello verde (ligeramente toxico) y en el 11,2 % de las hectáreas, el cacaotero no sabe el tipo de plaguicidas que usan en el cultivo de cacao (Instituto Nacional de

Estadísticas y Censos, 2013). El uso de estos plaguicidas ocasiona problemas en la salud especialmente intoxicaciones, ya que según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, este problema en los últimos 5 años ha aumentado un 24,4% anualmente en nuestro país. Por esta razón, actualmente, la investigación indaga nuevas iniciativas que ofrezcan plaguicidas o pesticidas naturales, que sean benéficos y específicos, que no sean tóxicos para el hombre ni para los organismos benéficos, sino más bien que sean biodegradables y de bajo costo (Luna & Lara, 2007).

Algunos metabolitos secundarios cumplen una función ecológica específica, ya que son capaces de atraer a los insectos, animales, actuar como pesticidas naturales de protección contra herbívoros o microorganismos patógenos e incluso como agentes alelopáticos (Ávalos & Pérez, 2009). Según Raven (1999), los principales metabolitos secundarios con actividad fúngica tenemos a los terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos. Estos metabolitos son capaces no solo de actuar sobre los sistemas nerviosos de diversos animales, sino también imitan a las hormonas naturales de insectos evitando que no se desarrollen, dañan tractos digestivos de algunos herbívoros, otros pueden actuar como tóxicos para pestes fúngicas. El ser humano usa estos metabolitos secundarios como fungicidas, insecticidas, rodenticidas, farmacéuticos (Purves, 2009).

Por lo anterior, es importante investigar nuevas sustancias antifúngicas vegetales, extrayendo sus metabolitos secundarios con el objetivo de probar su actividad biológica, frente a herbívoros, infecciones microbianas, fúngicas o virales. Por ende, algunos metabolitos secundarios de las plantas les dan la capacidad para actuar como pesticidas naturales de defensa, siendo efectivos contra fitopatógenos tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que estudios indican que extractos de un sinnúmero de especies han mostrado actividad antifúngica, especialmente de las familias Fabaceae, Euphorbiaceae, Moraceae.

En Ecuador existe la especie *Brosimum utile*, perteneciente a la familia Moraceae, con escasa información sobre los componentes y beneficios de su látex, sin embargo es utilizado por las etnias cofanes como gastroprotector, cuya utilidad ha sido confirmada mediante la determinación de la actividad gastroprotectora de savia de sande (*Brosimum*

*utile*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con lesiones gástricas inducidas, realizada en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Gaibor, 2013), siendo en Ecuador el único estudio al respecto. Sin embargo, en Perú ya se estudió la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Brosimum rubescens* (palisangre) sobre *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Fachín., et al. 2012). Además, en Gran Bretaña el látex rojo de una especie del género *Brosimum* (*Brosimum acutifolium*) perteneciente también a la familia Moraceae ha sido estudiado, identificando un alcaloide altamente tóxico derivado de serotonina, la bufotenina, con importantes efectos alucinógenos (Moretti., et al. 2006) y efectos ecológicos en fitopatógenos.

A pesar de estas investigaciones, no hay ningún estudio publicado sobre el poder antifúngico en fitopatógenos del látex de *Brosimum utile* Kunth, he ahí la importancia de realizar esta investigación. Este estudio representa una alternativa para la agricultura en el control de plagas causadas por fitopatógenos garantizando el fitocontrol mediante el aprovechamiento de ciertos metabolitos secundarios como terpenos y alcaloides, siendo una base para el desarrollo de productos fitosanitarios con materia prima ecuatoriana. Todo esto fomenta el cambio de la matriz productiva de Ecuador y contribuye con uno de objetivos del Milenio: garantizar la sostenibilidad del medio ambiente y evitar la pérdida de diversidad biológica, debido a la contaminación ambiental ocasionada por el uso de productos químicos para combatir plagas y enfermedades de los diferentes cultivos, entre ellos el cacao.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad antifúngica en *Moniliophthora roreri* de frutos de Cacao (*Theobroma cacao L*) de extractos de látex de Sande de *Brosimum utile* Kunth

### **Objetivos específicos**

1. Realizar el tamizaje fitoquímico del látex de sande de *Brosimum utile* (Kunth).
2. Obtener la fracción terpénica y alcaloide del látex de *Brosimum utile* (Kunth).
3. Aislar el fitopatógeno, *Moniliophthora roreri*, de frutos de cacao (*Theobroma cacao*).
4. Comprobar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de látex de *Brosimum utile* (Kunth) en *Moniliophthora roreri*.

# CAPITULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Moniliasis o podredumbre de las mazorcas de cacao.

#### *1.1.1 Origen y distribución*

La moniliasis se observó por primera vez en Ecuador, en 1914 y se extendió rápidamente por todo el país provocando considerables daños. También se ha propagado a Colombia, Perú y al Occidente de Venezuela, siendo predominante en las regiones lluviosas (Urquhart, 1993). Sin embargo, Phillips-Mora (2003) mediante el uso de marcadores moleculares y estudios de genética demostró que Colombia contiene mayor diversidad genética que supera a la encontrada en Ecuador, por lo cual ubica a Colombia como uno de los puntos de origen más probable (Torres, 2010).

La enfermedad es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, que ataca sólo a las mazorcas de cacao (Braudeaun, 1970). En el Ecuador y en Colombia donde la enfermedad es grave, ocasiona la destrucción del 15 al 80% de las mazorcas, lo que provoca grandes pérdidas económicas y al parecer está correlacionada con las condiciones climáticas, siendo predominante en la época de cuajado de los frutos (Wood, 1982)

Rorer en 1918 describió por primera vez el hongo (Ampuero, 1967) causante de la moniliasis. Rorer Smith lo identificó como una especie de monilia, más tarde Ciferri y Parodi (1993) nombraron el hongo *Monilia roreri*. Recientemente, Evans (1978) redescubrió el hongo. Encontraron en el dolíporo en la septa del micelio, que indica que es un hongo basidiomiceto y por consiguiente propusieron el género *Moniliophthora* para el hongo.

### ***1.1.2 Epidemiología***

Según Desrosiers y Cols (1995), el hongo permanece como una espora asexual en las mazorcas viejas enfermas, entre la estación húmeda y la seca. Las esporas son diseminadas por el viento, los insectos y la lluvia hacia la superficie externa de la mazorca de cacao; allí por la alta humedad y temperatura germinan y penetran la mazorca ocasionando daños internos en las primeras etapas de la enfermedad. Se cree que en Ecuador el viento es el principal agente de dispersión (Wood, 1982).

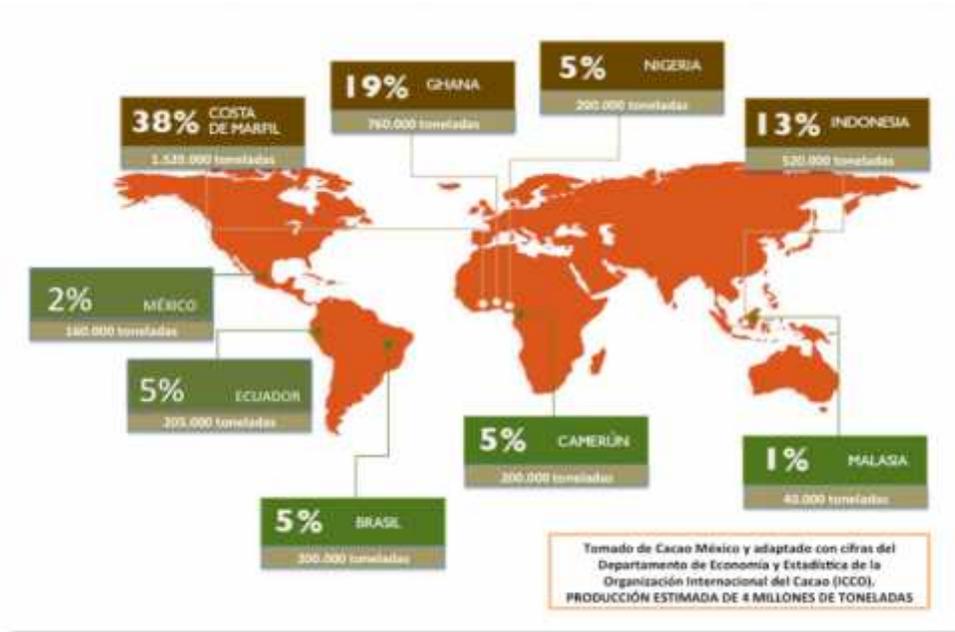
Este hongo solo infecta a los frutos jóvenes del cacao que, sin embargo, al inicio se desarrollan normalmente, luego en el interior de la mazorca las habas se pudren y se transforman en una masa parda más o menos licuefacta pero sin ningún síntoma externo para detectarlo (Braudeaun, 1970). Puede haber pocas señales externas de infección, de manera que estos síntomas aparecen después de los 40 a 80 días como pequeñas manchas oscuras en la superficie o su vez la mazorca puede estar cubierta de un revestimiento blanco. Una mazorca enferma es más pesada que una sana del mismo tamaño, es más difícil de abrirla, está envuelta en una sustancia acuosa y las almendras son inservibles (Urquhart, 1993). La incidencia de la enfermedad varía con la variedad de cacao, la edad de los frutos y las precipitaciones. Por lo general, la mayor incidencia se da cuando la precipitación es alta. El hongo infecta sólo a los tejidos en crecimiento, especialmente frutos jóvenes (Sánchez., et al. 2003).

### ***1.1.3 Impacto de la moniliasis del cacao en América Latina***

La enfermedad está presente en 13 países de América Latina (Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Perú, Panamá, Bolivia y Venezuela) con pérdidas estimadas en 80% de la cosecha anual. De cada tres frutos del cacao afectados por diversas enfermedades, dos mazorcas son lesionadas por moniliasis (Sánchez, et al. 2003).

Actualmente México es el país más afectado, en el 2005, la producción disminuyó alrededor del 60%. En 2013 afectó al 70% la producción debido a las condiciones del clima. En Colombia las pérdidas anuales es el 40% de cacao, en Venezuela causa pérdidas

mayores al 50% de la cosecha en plantaciones de cacao lo que impide desarrollar nuevas usos en la tecnología de alimentos (Phillips-Mora, 2012).



**Figura 1-1.- Principales países productores de cacao (ICCO y Cacao México).**  
Fuente: Wilberth Phillips - CATIE

En la región amazónica norte de Ecuador (Sucumbíos, Orellana y Napo), se malgasta más del 40% de la producción de cacao, ya que se pierde 8.000 toneladas de cacao que representa 20 millones de dólares de pérdidas al año. (Amores & INIAP, 2010).



**Figura 1-1. Frutos de cacao afectados por Moniliasis**  
FUENTE: Wilberth Phillips – CATIE

### ***1.1.4 Taxonomía de Moniliophthora roreri.***

De acuerdo a Evans (1978) y Aime Phillips-Mora (2005), la clasificación taxonómica de *Moniliophthora roreri* es la siguiente:

- Clase: Basidiomycetes
- Orden: Agaricales
- Familia: Tricholamataceae
- Género: *Moniliophthora*
- Especie: *Moniliophthora roreri*

### ***1.1.5 Morfología***

Según Evans (1978) *Moniliophthora roreri* posee un micelio septado con doliporos, los conidios son hialinos, se forman en cadenas de maduración basipétala (Evans 1981) fácilmente desprendibles de los micelios, su pared es gruesa, de color amarillo pálido o café cuando forman masas de esporas. Phillips-Mora (2003) afirma que las esporas son globosas a subglobosas o elipsoidales (Thurston & CATIE, 1889).

### ***1.1.6 Control de moniliasis***

Los productos cúpricos han dado buenos resultados en el control de la enfermedad, estos tratamientos se los realiza al comienzo de la floración y continuados cada 2 o 3 semanas durante el periodo de fructificación (Braudeaun, 1970). En Ecuador, pruebas recientes mostraron que el azufre mojable y el zineb, un fungicida de zinc orgánico, son efectivos para el combate de la enfermedad (Urquhart, 1993). La moniliasis es una plaga que se controla no solo con el uso de pesticidas químicos sino también aplicando técnicas de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

#### ***1.1.6.1 Manejo Integrado de monilia mediante el MIP.***

Según la FAO (1967), el manejo integrado de plagas (MIP) consiste en agrupar principios basados en aspectos ecológicos, económicos y en teorías sociológicas. Irwin (1999) dice

que los métodos para reducir las plagas deben ser económicamente factibles y ambientalmente aceptables, ya que tiende a reducir la aplicación de pesticidas en áreas donde son comúnmente empleados (Jaimes & Aranzazu, 2010).

Según Irwin, (1999) el MIP es un conjunto de herramientas o armas para suprimir las poblaciones de la plaga, retardar el progreso o reducir la incidencia de la enfermedad, y cada tipo de arma es a menudo considerada como una táctica; que maximiza el control natural de las poblaciones de una plaga o patógeno, basándose en el conocimiento de la biología del organismo, su ambiente, los enemigos naturales y las prácticas de agricultura

## **1.2 Control de fitopatógenos mediante el uso de extractos de plantas.**

En la actualidad, se ha incrementado gradualmente la investigación centrada en la búsqueda de alternativas para el manejo integral de plagas y enfermedades producidas por fitopatógenos, dado que el uso de plaguicidas químicos es la causa principal del deterioro del medio ambiente. Ante esta situación se busca reducir el uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura mediante el uso y aplicación de sustancias naturales para el control de fitopatógenos (Barrera & García, 2008).

Duke (1990) afirma que los productos vegetales han llegado a ser explotados como pesticidas botánicos porque son más biodegradables que los pesticidas sintéticos, lo que ha generado interés en la búsqueda de nuevos productos bioactivos de las plantas, especialmente se está aprovechando las propiedades que brindan los aceites esenciales y los extractos vegetales. Varios autores como Decanos (1989), Lee (2008) y Chang (2008) afirman que los aceites esenciales muestran propiedades antimicóticas y son posibles productos antifúngicos. Investigaciones anteriores de Kosuge (1978) y Zeng (2004) atribuyen que el metileugenol es el responsable de la actividad antifúngica contra una variedad de fitopatógenos de plantas, especialmente *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum fragariae*.

Otros autores realizaron un estudio en el aceite esencial de *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* mediante GC / MS y su actividad antimicrobiana contra cinco hongos

fitopatógenos; uno de los principales componentes del aceite fue el metileugenol (59,42%), eucarvone (24,10%), 5-alil-1,2,3-trimetoxibenceno (5,72%), y 3,7,7-trimetilbicyclo (4.1.0%) hept-3-eno (4,93%). En este estudio el aceite esencial y el componente más abundante, metileugenol, se analizaron por separado para la inhibición de la 5 patógenos: *Alternaria Humicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Cactorum Phytophthora* y *Fusarium solani* (Dan., et al. 2009).

El aceite esencial de flores y extractos de hojas de de *Silene armería* L. presentan actividad antifúngica en *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinérea* y *Rhizoctonia solani* (Bajpai, et al. 2008 ). Según Mihaliak (1997), algunas especies de plantas producen aceites esenciales que les da la capacidad de protegerse contra fitopatógenos. Estudios de Wilson (1997), Gogoi (1997); Pitarokili (1999); Meepagala (2002) demuestran que los aceites esenciales tienen un efecto fungicida natural, los mismos que son inocuos para los ecosistemas, para los consumidores y para reducir las plagas y enfermedades de poscosecha.

Muller-Riebau (1995) reporta actividad antifúngica de los aceites esenciales en 4 especies de fitopatógenos; además Wilson, (1997) evaluaron 49 aceites esenciales contra *Botrytis cinérea*, cuya actividad antifúngica está asociada con fenoles monoterpénicos: timol, carvacrol y eugenol de Bullerman (1997), Soliman y Badeaa (2002), ya que reportan que los aceites esenciales del tomillo y canela a 500 ppm inhibieron totalmente el desarrollo micelial de 4 hongos fitopatógenos.

Otros metabolitos secundarios son los alcaloides con propiedades ecológicas son la lupanina, 3 -hidroxilupanina, multiflorina, afilina, epiafilina y -isolupanina, que desempeñan un papel muy importante ya que han mostrado actividad inhibitoria del crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii* (Zamora., et al. 2008). Estudios preliminares de Bravo (2000) y Zamora (2002), también indican actividad fungicida de polvos y extractos crudos obtenidos de semillas de *L. campestris*, *L. montanus* y *L. exaltatus* gracias a su alto contenido de alcaloides en sus semillas (Zamora., et al, 2008).

Así mismo, existen estudios en hojas frescas de *Ricinus communis L* con una moderada actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* (Caceres, 2007). Además, se observó la actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, cuyos extractos muestran un 90% de inhibición del crecimiento micelial a las 72h después de la inoculación del hongo (Rodríguez., et al. 2012). En México, la medicina natural usa la tintura obtenida de raíces de *Eliopsis longipi* para aliviar afecciones de la piel causadas por hongos, pero la ciencia también aprovecha esta tintura para evaluar actividad fungicida del terpeno afinina purificada, la alcanida mayoritaria en raíces de *Heliopsis longipes*, y del extracto crudo de la raíz de la misma planta, sobre los fitopatógenos *Sclerotium cepivorum* y *S. rolfsii*, en donde evalúan el efecto sobre el contenido de ácidos grasos y ergosterol presentes en el micelio (Chávez., et al. 2000)

Según Lim (2012) y Tam (2010), las plantas de la familia Apocynaceae son una buena fuente de alcaloides indólicos monoterpénoides, estos metabolitos según Jagetia (2006) y Chen (1983), proceden de la condensación de triptófano y son de formidable interés de muchos investigadores debido a sus estructuras complicadas y potente actividad biológica como anticancerígeno, antibacteriano, antifertilidad, y actividades antitusivos (Zhang., et al. 2014). En una investigación química realizada por Zhang, Hua, Song, Yan; Feng (2014), del extracto de EtOH 80% de la planta *Alstonia rupestris*, en la que identificaron cuatro nuevos alcaloides de indol monoterpénoides, 6,7-epoxi-8-oxo-vincadiformina (1), 11-acetil-6,7-epoxi-8-oxo-vincadiformina (2), 11-hidroxi-14-cloro-15-hidroxi-vincadiformina (3), y perakine N1, N4-dióxido de (4), junto con dos compuestos conocidos, 11-hidroxi-6,7-epoxi-8-oxovincadiformine (5) y vinorine N1, N4-dióxido de (6). Los alcaloides 1, 2 y 5 mostraron citotoxicidad significativas contra toda la prueba líneas celulares de tumores de la cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas con valor de IC50 de menos de 20  $\mu$ M y las actividades antimicrobianas contra dos fitopatógenos (*Alternaria alternata* y *Phytophthora capsici*).mientras que los alcaloides 4 y 6 mostraron actividad contra la bacteria *Staphylococcus aureus* (Zhang., et al. 2014). Uno de los alcaloides indólicos es la bufotenina que además de existir en las especies vegetales también existe en las secreciones de la piel de los anfibios, ya que son una fuente rica de compuestos naturales y

biológicamente activos, según Stebbins y Cohen (1995), Toledo y Jared (1993), las secreciones tóxicas son secretada por las glándulas granulares como defensa contra los microorganismos y depredadores, dado que contienen productos químicos clasificados en cuatro categorías: (1) aminas biogénicas (según Basir (2000), serotonina, histamina, bradiquinina:), mientras que Lazarus y Attila (1993); Mor (1994) y Clarke (1997), notifica las demás categorías 2) bufadienolides; (3) alcaloides y esteroides y (4) péptidos y proteínas. Químicamente las aminas biogénicas y péptidos de las secreciones de las glándulas granulares de sapos según Steyn y Heerden (1998), pueden contener casi 86 tipos de bufadienolidos, junto con otros componentes como bufotoxina, bufagin y bufotenina, entre los bufadienolidos más importantes tenemos bufalin, bufogenin, bufotalin, cinobufagin, marinobufagin, resibufagin (Mohamed., et al. 2009). Los bufadienolidos se caracterizan por sus actividades antimicrobianas, especialmente el telocinobufagin y marinobufagin ya que inhibió el crecimiento líquido de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 128 mg / ml y *Escherichia coli* a una concentración de 64,0 y 16,0 mg / ml (Cunha., et al. 2005). Algunos bufadienolidos poseen antitumoral actividad, como se describe Kamano (2002) y Nogawa (2001), para Bufalin, scillarein, bufotalin, gamabufotalin, cinobufotalin, cinobufagin, y otros. Según Steyn y Heerden (1998) también tienen actividad tóxica hacia el ganado, insectos y según Supratman (2001) tiene propiedades insecticidas.

Otros alcaloides como stephanine y crebanine extraídos de *Toddalia asiatica* también inhibe el crecimiento de las hifas de fitopatógenos: *Cercospora kaki*, *Gymnosporangium haraeum*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Colletotrichum graminicola* e inhibe la germinación esporas de *Thielaviopsis paradoxa*, *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*, *Sphaceloma fawcettii* y *G. haraeum* (Hu, y otros, 2013).

Ajala (2011), Medeiros (2011) y Rojas (1979) notifican que en algunas especies del género de *Kopsia*, los alcaloides indólicos son metabolitos biológicamente activos. En *Kopsia hainanensis*, cuatro alcaloides indólicos: kopsinate (1), ácido chanofruticosinic N1-decarbomethoxy (2), metil-N1-decarbomethoxy chanofruticosinate N (4) -óxido (3) y

chanofruticosinate metil N (4) -óxido (4) presentaron actividades antibacterianas contra cinco bacterias y el compuesto 2 presentó actividad antifúngica contra cuatro hongos fitopatógenos (Chen., et al. 2013).

## **1.2 Árbol de Sande (*Brosimum utile*)**

### **1.2.1 Generalidades**

Según Datwyler y Weiblen (2004), la familia Moraceae comprende cerca de 37 géneros y más de 1.100 especies en todo el mundo y es una de las más abundantes familias de importancia ecológica que crecen en los bosques tropicales de América Central y del Sur. En el Ecuador, están representados 20 géneros, especialmente en las zonas bajas. En plantas, la familia Moraceae son árboles y arbustos monoicas o dioicas, y están adaptados a una amplia gama de bosques tropicales húmedos incluidos hábitat forestales bien drenados de tierra firme (Burn & Mayle, 2008)

El árbol de Sande (*Brosimum utile*) es una planta introducida perteneciente a la familia Moraceae.



**Figura 3-1: Árbol de Sande (*Brosimum utile*)  
Fuente: Doris Gaibor, 2013.**

### ***1.2.2 Taxonomía***

- **Familia:** *Moraceae*
- **Género:** *Brosimum*
- **Especie:** *B. utile*
- **Nombre científico:** *Brosimum utile* Kunth
- **Nombre común:** Sande, Sandi (Ecuador), lechero, sande, guáimaro, árbol de vaca (Colombia), palo de vaca (Costa Rica y Panamá), panguana (Perú), vacuno, sande, marina, palo de vaca (Venezuela) y amapa (Brasil) (Tejada, Arévalo, & Vinueza, 2010).

### ***1.2.3 Habitat y distribución***

El árbol de Sande (*B. utile*) se extiende desde la cuenca del río Amazonas en Brasil, Centro América, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Tejada, Arévalo, & Vinueza, 2010), encontrándose su límite al norte en el suroeste de Costa Rica. Según Berg (1972), *B. utile* es una especie polimorfa debido a sus diferencias morfológicas a nivel regional. La presencia de esta especie se limita a los bosques húmedos tropicales hasta alturas de 900 msnm (Oppelet, 1997).

### ***1.2.4 Descripción del árbol de Sande (Brosimum utile)***

Árbol monoico de hasta 50 m de altura y diámetro de 75 a 150cm (Castaño, Cárdenas, & Otavo, 2007). Su tronco se caracteriza por ser recto y cilíndrico, con una copa densa siempre verde y amplia (López & Montero, 2005). Presenta raíces tablares bajas y redondeadas medianamente profundas y superficiales, con corteza externa de color marrón rojizo y pintas plateadas, con lenticelas abundantes y prominentes, de apariencia lisa o finamente agrietada y corteza interna de color anaranjado, que una vez que se corta exuda abundante látex blanco. Sus hojas son grandes y simples con estípula terminal, en cuya axila se encuentran flores diminutas que da lugar a una inflorescencia globosa cerca de

1,5cm de diámetro. Las semillas se recolecta entre febrero a abril (Tejada, Arévalo, & Vinueza, 2010).

### ***1.2.5 Fenología***

Según Brealey (1982), *B. utile* florece entre noviembre y enero y los frutos maduran entre febrero y marzo. Según observaciones propias en el área de estudio la mayoría de frutos caen entre enero y febrero. Hartshorn (1983) afirma que la germinación de las semillas en el bosque natural es muy buena, la regeneración natural es muy abundante en las cercanías del árbol madre (Oppelet, 1997).

### ***1.2.6 Usos***

En la Amazonía se usa como fuente de fibra denominada “yanchama” colorada; el látex caliente se emplea para impermeabilizar botes y canoas. Además el látex de *Brosimum utile* se usa para prevenir y curar úlceras y como remedio astringente. Este exudado también, aporta galactina, que es utilizada durante la fabricación de velas, también se piensa en la utilización del látex como sustituto de goma de mascar (Maráz., et al. 1997).

Sus frutos son consumidos como alimento por mamíferos y aves (Castaño., et al. 2007). Para construcción, su madera sirve para enchapados, elementos de mobiliaria, vigas, viguetas, muebles, molduras, carpintería de interiores, estructuras ligeras, mangos de herramientas, cañas de pescar, paraguas, chapas para triplex, cajonería, lápices, palos de fósforos y juguetes (Tejada., et al. 2010).

En medicina tradicional, el duramen (madera) se usa en infusión para las hemorragias postparto, la corteza como esterilizante y el látex como antidiarreico (Castaño, Cárdenas, & Otavo, 2007). Las semillas son altamente nutritivas de sabor agradable y son consumidas cocidas con sal o acompañadas de guisos (López & Montero, 2005).

### 1.2.6 Usos de los metabolitos secundarios de la especie *Brosimum*.

Los metabolitos secundarios de la especie de *Brosimum* se caracterizan por poseer un sinnúmero de propiedades ya que han sido confirmados por varios autores. Un estudio realizado en el extracto etanólico de hojas y cortezas de *Brosimum rubescens* reportan la presencia de acetato de lupeol y lupeol, en la madera también se identificaron la presencia de tres cumarinas: xantiletina, suberosina y 7-demetil suberosina. En el mismo estudio se determinó que el extracto etanólico de madera tiene mejor actividad antimalárica in vitro, contra *Plasmodium falciparum* (Sandoval, Martha, & Cuca, Luis, 2007). Otro estudio en *Brosimum rubescens* realizado por Fachin., et al (2012) se evidenció la presencia de cumarinas, quinonas, taninos, flavonoides y triterpenos en el extracto etanolico. Además este extracto tiene actividad antifúngica in vitro sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* en concentraciones de 20 mg/L y 10 mg/L.

A pesar de no existir estudios de actividades antifúngicas en fitopatógenos en el género *Brosimum*, se ha realizado un estudio en el látex rojo de *Brosimum acutifolium* donde se identificó el alcaloide 5-hidroxi-triptamina (bufotenina), compuesto psicotrópico usado en la meseta de Guyana como alucinógeno. Además de la bufotenina, se confirmó la presencia de 4-OH-DMT (psilocina), 5-MeOH-DMT (5-methoxydimethyltryptamine), harmina, harmanol, harmol, tetrahydro harmina. Según Pepin (2001), las concentraciones de 5-OH-DMT fueron de 23,4 y 25 µg/ mL, aproximadamente diez veces menores que la concentración de DMT determinada en muestras de ayahuasca. Una sola dosis de 500 mL de látex (12,5mg de bufotenina) parece ser suficiente para producir un efecto alucinógeno, ya que la corteza de *Brosimum acutifolium* son los medios esenciales para los chamanes. Según Lyttle (1996), la bufotenina es secretado por ciertos sapos Bufo de México y el sur de Estados Unidos, Ott (2001).afirma que este alcaloide suele ser inhalado, dado que es activo por vía oral (Moretti., et al. 2006).

Estudios etnobotánicos por Macedo y Ferreira (2004) encontraron que la *Brosimum gaudichaudii* es usada para el tratamiento del vitíligo y enfermedades de la piel (Steiner et. al., 2004).Según Su uso medicinal se le atribuye a la presencia de cumarinas como

psoraleno, bergapteno y sus derivados, furocumarinas que tienen potencial fotosensibilizadores, (Leon et. al., 2005).

Según Freitas y Fernández, (2006); medicinalmente el látex (Leche Amapá) de *Brosimum parinarioides* se usa para el tratamiento de gastritis, cicatrización de heridas, enfermedades pulmonares, y respiratorias). El extracto crudo y sus fracciones también presentan actividades antioxidantes.

## CAPÍTULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 Lugar de Experimentación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

#### 2.2 Materiales, Equipos y Reactivos

##### 2.2.1 *Materia Prima*

- **Fuente de extractos:** Látex de *Brosimum utile*, fue tomado del cantón Francisco de Orellana de la parroquia La Belleza, provincia de Orellana. Dicho cantón está ubicado a 240 m.s.n.m, presenta un clima húmedo tropical, una temperatura media anual de 24°C y humedad relativa de 90% (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2002).
- **Fuente de microorganismo (*Moniliophthora roreri*):** Mazorcas de cacao infectado con monilia fueron obtenidas del cantón Loreto ubicado a 320 m.s.n.m en la provincia de Orellana.

##### 2.2.2 *Recolección de la materia prima*

- La recolección del látex del árbol de *Brosimum utile* (leche de Sande) se realizó una madrugada del mes de Octubre de 2014 por personas de la comunidad Cofán, expertas en la extracción del látex.
- Para aislar el fitopatógeno (*Moniliophthora roreri*), se localizaron parcelas de cacao infectado por el hongo y se realizó un muestreo aleatorio simple de frutos enfermos y

fueron trasladados en bolsas estériles al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

### **2.2.3 Materiales**

- Vasos de precipitación 250, 100 y 50 mL
- Balón aforado 250 y 100mL
- Pipetas 10 y 1 mL
- Probetas 100, 50 y 10 mL
- Frascos de vidrio ámbar 500, 100 y 30 mL
- Embudos de separación 250 mL
- Tubos de ensayo pírrex
- Varilla de agitación
- Trípode
- Kitasato 250mL
- Embudo Buchner
- Embudo
- Manguera
- Piceta
- Cuba cromatográficas
- Papel cromatográfico
- Placas de cromatografía TLC
- Pipetas Pasteur
- Capilares
- Cajas Petri
- Guantes
- Calculadora
- Capuchones para los tubos pírrex
- Porta y cubre objetos
- Asa de platino
- Lámpara de alcohol

- Hisopos
- Erlenmeyer
- Lámpara de alcohol
- Marcador
- Papel aluminio
- Algodón
- Puntas azules
- Puntas amarillas
- Viales
- Gradillas

#### **2.2.4 Reactivos**

- Metanol
- Hexano
- Etanol
- Acetato de etilo
- Formaldehido
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido sulfúrico 2%
- Hidróxido de amonio concentrado
- Éter etílico
- Cloroformo
- Goma arábiga
- Hidróxido de potasio 0,1M
- Medios de cultivo DIFCO™ Agar Papa Dextrosa (PDA) y BBL™ Sabouraud
- Gentamicina

#### **2.3 Equipos**

- Agitador magnético
- Balanza analítica

- Peachímetro
- Estufa
- Equipo de evaporación a presión reducida: Rotavapor
- Espectrofotómetro UV.
- Microscopio óptico
- Ultrasonido
- Agitador vórtex
- Autoclave
- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Refrigeradora

## **2.4 Control de calidad de la materia prima**

Una vez obtenido el látex de Sande se procedió a evaluar sus características organolépticas (color, olor, aspecto, textura, sabor) además se realizaron los análisis de: pH, densidad, índice de refracción y grados Brix, con el fin de establecer las condiciones de calidad de la muestra empleada en la investigación.

## **2.5 Estudio Fitoquímico del látex de Sande de *Brosimum utile***

### ***2.5.1 Evaluación de solubilidad del látex de Sande***

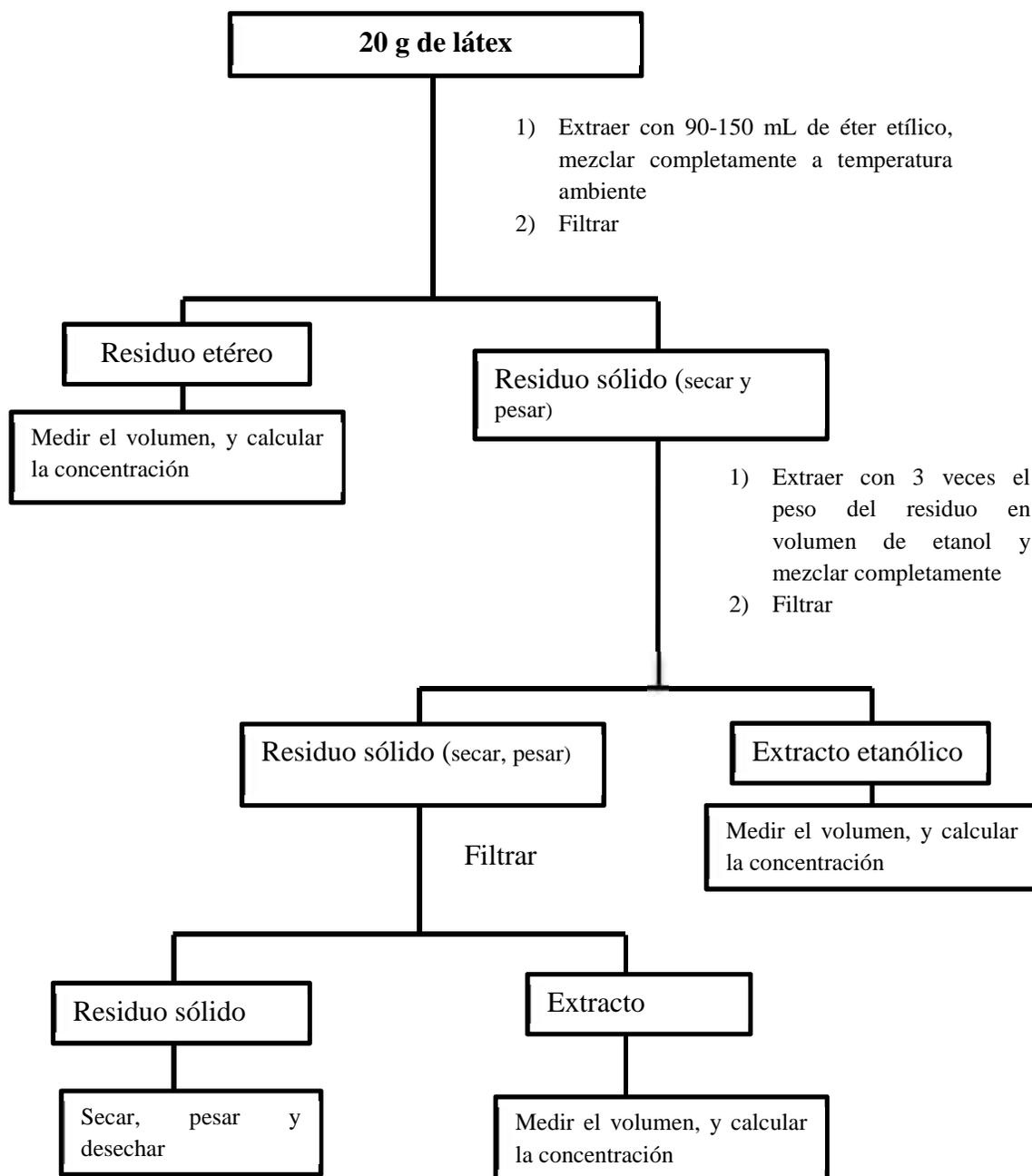
Antes de empezar el estudio fitoquímico se llevó a cabo los análisis de solubilidad en agua, metanol y etanol. Para ello se mezcló una determinada cantidad de látex de Sande con un volumen conocido de los diferentes solventes, hasta conseguir una mezcla homogénea. La mezcla realizada fue la siguiente:

- 10 mL de látex + 50 mL de metanol
- 15 mL de látex + 15 mL de metanol
- 20 mL de látex + 20 mL de agua
- 25 mL de látex + 25 mL de etanol

### 2.5.2 Tamizaje fitoquímico

- **Extracción sucesiva del látex**

Se realizaron tres extracciones sucesivas con éter etílico, etanol y agua, según el siguiente esquema (Ayala, 2005).



**Figura 4-2. Extracción sucesiva del material vegetal para el análisis del tamizaje fitoquímico.**

Fuente: (Miranda, M.2006) (Ayala, G. 2005)

- **Reacciones de coloración y precipitación**

Con el extracto etéreo, etanólico y acuoso de la etapa anterior, se procedió a determinar los metabolitos secundarios del látex de Sande mediante los siguientes ensayos cualitativos (Miranda, 2006):

**TABLA 1-2. REACCIONES DE COLORACIÓN Y PRECIPITACIÓN APLICADAS EN EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL LÁTEX DE SANDE (*Brosimum utile*). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES- ESPOCH. Octubre de 2014.**

<b>Metabolito a identificar</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Interpretación</b>
<b>Compuestos grasos</b>	Sudan	Se debe tomar alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.	Se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.
		Si la alícuota del extracto está disuelta en éter etílico y etanol, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado,	Si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	(calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff.	
	Mayer	Proceder de forma similar al descrito anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Posteriormente se debe añadir una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer	Si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).
	Wagner	Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.	Si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).
<b>Compuestos lactónicos</b>	Baljet	Si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo.	La aparición de coloración o precipitado rojo ( ++ y +++ ) se considera positivo.
	Hidroxamato férrico	Una gota del extracto se coloca en una placa de porcelana y se añade una gota de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en etanol al 10 %. Se añaden unas gotas de hidróxido de potasio al 10% en etanol	El desarrollo de una coloración violeta (+), claro (++) , intenso (+++).

<b>Cumarinas</b>		y se calienta a la llama hasta burbujeo, se añaden unas gotas de ácido clorhídrico 0.5 mol/L y una gota de cloruro férrico al 1% en agua.	
<b>Quinonas</b>	Borntrager	Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.	Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).
<b>Triterpenos y/o esteroides</b>	Liebermann-Burchard	Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar	Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:  <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Rosado-azul muy rápido.</li> <li>2- Verde intenso-visible aunque rápido.</li> <li>3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.</li> </ol> <p>A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El</p>

			tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.
<b>Catequinas</b>	Catequinas	Se toma de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio.	La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.
<b>Resinas</b>	Resinas	Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada.	La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.
<b>Azúcares</b>	Fehling	Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla.	El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.
<b>Saponinas del tipo esteroidal como</b>	Espuma	Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.	El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 milímetros de altura y persistente por más de 2 minutos.

<b>triterpénica</b>			
<b>Compuestos fenólicos y/o taninos</b>	Cloruro férrico	Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica	un ensayo positivo puede dar la siguiente información general: <ul style="list-style-type: none"> <li>•Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.</li> <li>•Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.</li> <li>•Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.</li> </ul>
<b>Aminoácidos libres o de aminos</b>	Ninhidrina	Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua.	Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y	El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo,

		<p>un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.</p>	<p>naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.</p>
--	--	---	---

**Fuente: (Miranda, M.2006), (Ayala, G. 2005)**

### 2.5.3 Obtención, aislamiento e identificación cualitativa de la fracción terpénica y alcaloide del látex de *Sande de Brosimum utile*

Para la obtención de terpenos y alcaloides se emplearon diferentes métodos químicos que ayudaron a la obtención eficaz de estos metabolitos a escala de laboratorio.

#### 2.5.3.1 Extracción de la fracción terpénica del látex de *Sande de Brosimum utile*

- **Proceso de extracción de la fracción terpénica**

La fracción terpénica fue extraída utilizando diversos solventes: agua, metanol, acetona, éter y hexano (Gonzalez., et al. 1987). Para ello se aplicó el esquema de la Figura 5-2.

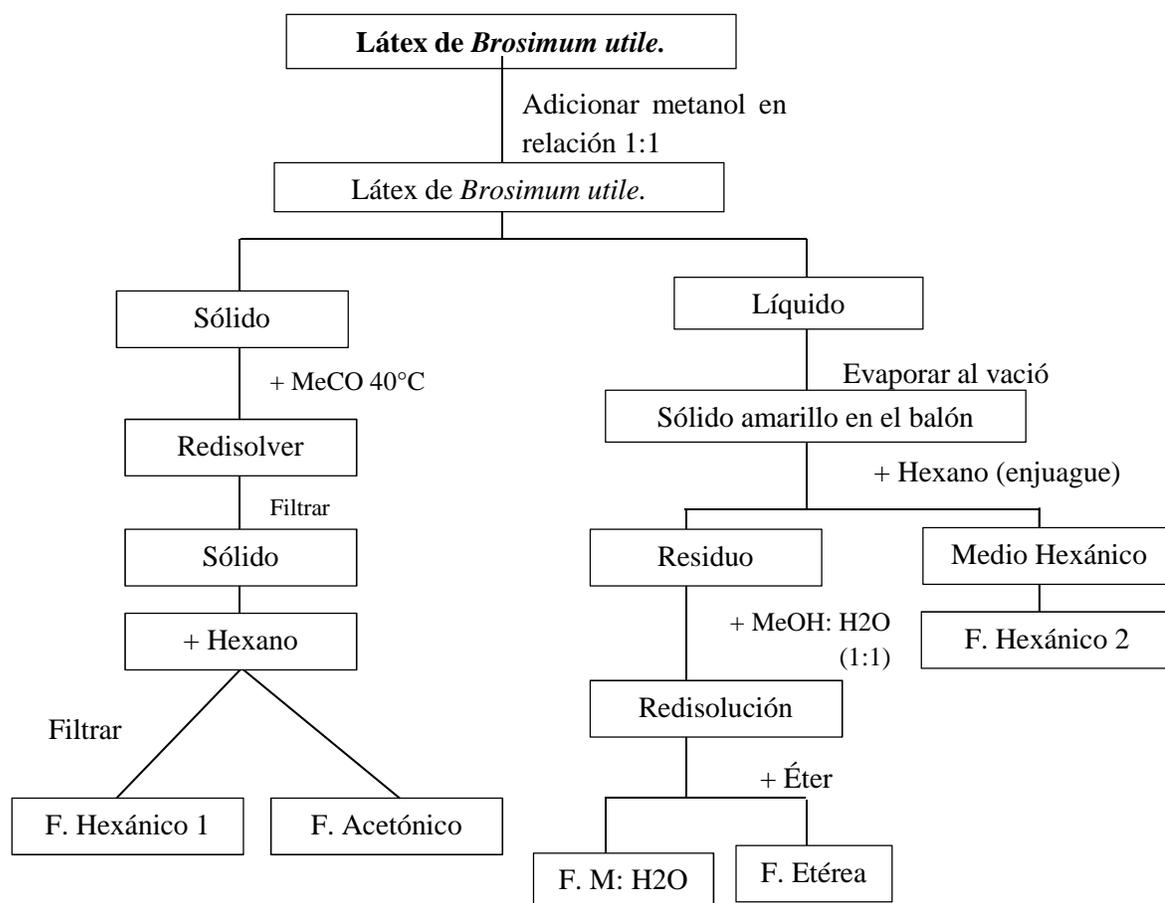


Figura 5-2. Esquema de obtención de la fracción terpénica del látex de *sande de Brosimum utile*. Fuente:(González, J; Basabe, P; Sexmero, J; Sánchez, I; 1987)

Una vez finalizado el desarrollo del todo el proceso del esquema, cada subextracto obtenido del látex de sande fue concentrado a sequedad en baño maría, posteriormente se reconstituyó en cada solvente de extracción hexano, acetona, agua y éter etílico (Gonzalez., et al. 1987). Cada subextracto fue sembrado en cromatoplacas hasta concentrar la muestra, utilizando como fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3) y como agente revelador  $H_2SO_4$  concentrado: vainillina (1:1).

Para la purificación de la fracción terpénica, solo se procedió a obtener el extracto hexánico debido a que a través de los resultados obtenidos en la cromatografía, el hexano fue uno de los solventes que extrajo exhaustivamente este metabolito. Para ello, el látex se mezcló con metanol en relación 1:1 (v/v) y se dejó en refrigeración durante 10 minutos para precipitar todas las resinas propias de la savia de Sande. La mezcla se agitó vigorosamente y se filtró al vacío, el residuo sólido se redisolvió con acetona, se filtró y el residuo sólido nuevamente se redisolvió con hexano y finalmente se filtró. Posteriormente, el extracto hexánico se concentró al vacío para eliminar todo el solvente de extracción (Ver Figura 5-2) (Gonzalez, et al. 1987).

- **Identificación cualitativa de la fracción terpénica**

La determinación cualitativa de la fracción terpénica se realizó mediante el ensayo de Lieberman- Burchard. Para confirmar la presencia de terpenos se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF) y se procedió a la siembra del extracto hexánico en cromatoplacas utilizando como Fase Móvil (FM) tolueno: acetato de etilo en relación (7:3) y como revelador  $H_2SO_4$  concentrado: vainillina (1:1) y se calculó los  $R_f$  de mancha obtenida.

### 2.5.3.2 Extracción de la fracción alcaloide del látex de Sande de *Brosimum utile*

- **Proceso de extracción de la fracción alcaloide**

Para la obtención del extracto puro de alcaloides se estableció una metodología, tal y como se muestra en la Figura 6-2 debido a la falta de información sobre extracción de alcaloides en los látex vegetales.

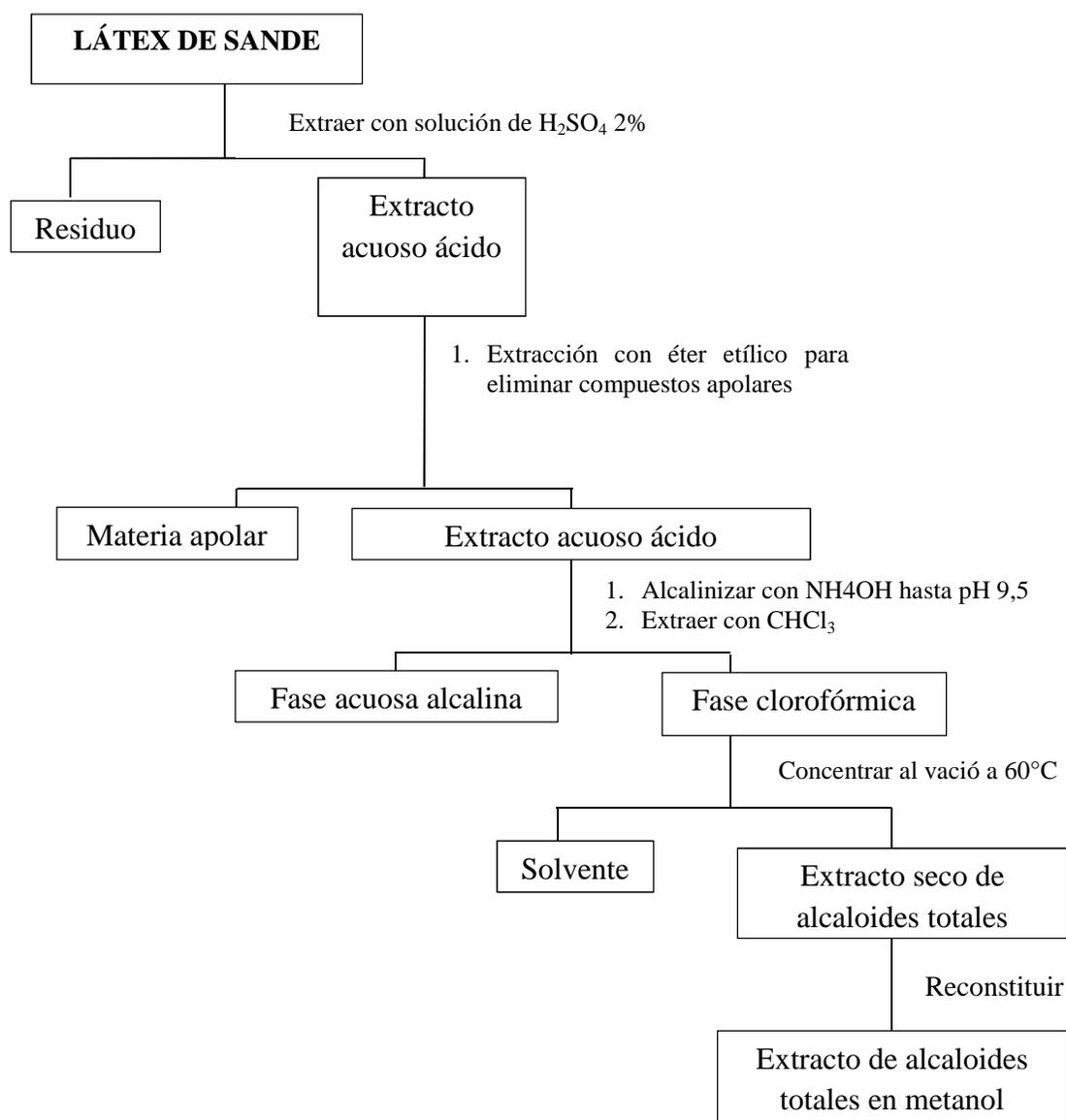


Figura 6-2. Esquema de obtención de la fracción alcaloide del látex de Sande de *Brosimum utile*

La extracción de alcaloides se realizó utilizando agua acidulada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2%) debido a que los alcaloides se encontraban en forma de sal. Para ello, se mezcló el látex de Sande con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2%, se agitó vigorosamente y se procedió a filtrar. Al filtrado se añadió éter etílico para eliminar las materias neutras solubles en este solvente (ceras, mucílagos, grasas, etc.) y nuevamente se filtró.

El filtrado ácido obtenido se dividió en tres vasos en volúmenes iguales y se basificó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta pH 8, 9 y 10. La fase alcalina (pH 8, 9 y 10) fue sometida a una extracción exhaustiva de los alcaloides utilizando dos solventes de extracción: acetato de etilo y cloroformo. Los subextractos obtenidos (pH 8, 9 y 10) fueron concentrados a sequedad en baño maría, posteriormente se reconstituyó en cada solvente de extracción acetato de etilo y cloroformo. Inmediatamente 10 $\mu\text{L}$  de cada subextracto fue sembrado cromatoplas, como fase móvil se utilizó metanol: amoniaco puro (100:1,5) y como revelador el reactivo de Dragendorff.

Para la purificación de los alcaloides solo se procedió a obtener el extracto clorofórmico, ya que la extracción fue mejor en cloroformo a pH 9. Para ello, se aplicó el esquema anterior (Figura 6-2), se basificó hasta pH 9 y se procedió a extraer la fracción alcaloide con el cloroformo. Finalmente, el extracto clorofórmico se concentró al vacío a una temperatura no mayor a 70 °C a 150 rpm para eliminar todo el solvente de extracción. Para su conservación se reconstituyó en metanol hasta el momento de utilizar.

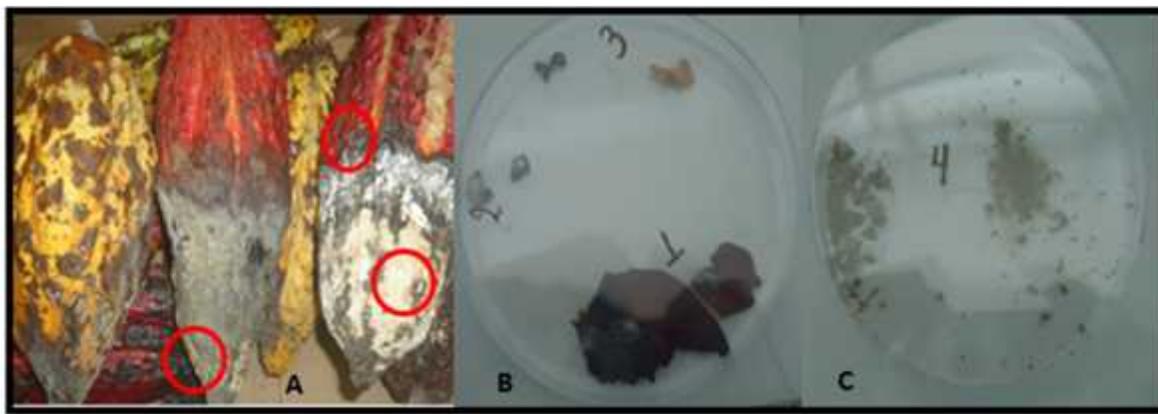
- **Identificación cualitativa de la fracción alcaloide**

Con el extracto clorofórmico reconstituido en metanol, se realizaron las pruebas de identificación de alcaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner y el test de Marquis. Posteriormente, se realizó CCF, para lo cual se activó la cromatoplasca aspergeando  $\text{KOH}$  0,1M, dejando secar a temperatura ambiente. Luego se procedió a sembrar el extracto clorofórmico concentrado en la placa sin difuminar la muestra. Se usó como fase móvil metanol: amoniaco puro (100:1,5) y como revelador el reactivo de Dragendorff. Finalmente se calculó el  $R_f$  de la mancha obtenida.

## 2.6 Obtención de *Moniliophthora roreri* de frutos de cacao (*Theobroma cacao*) infectado por monilia

### 2.6.1 Aislamiento de *Moniliophthora roreri*

El hongo *Moniliophthora roreri* se obtuvo de las mazorcas de cacao infectado por monilia. Para realizar el aislamiento y purificación se eligieron 4 mazorcas infectadas con mayor sintomatología. Estas mazorcas presentaban síntomas externos e internos de moniliasis como partes necrosadas en el pericarpio y mesocarpio, además de polvo blanco debido a la presencia de numerosas esporas, como se observa en la Figura 1-2 A).



**Fotografía 1-2.** A) Muestras recolectadas del cacao infectado por monilia. B1) Polvo blanco del epicarpio, B2) epicarpio del cacao infectado, B3) Porción enferma del mesocarpio del fruto de cacao y C) Polvo de color crema.

**Fuente:** Moreta, A. 2014

Para la siembra del microorganismo se tomaron 4 muestras: B1) Polvo blanco del epicarpio, B2) epicarpio del cacao infectado, B3) Porción enferma del mesocarpio del fruto de cacao y C) Polvo de color crema. Estas muestras fueron tomadas de la siguiente manera:

- **Muestra 1:** Con una aguja previamente esterilizada, se tomó las muestras esporuladas del hongo de color blanco de la corteza externa (pericarpio) de la mazorca y se realizó la siembra directa en cajas Petri que contienen el medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa y Sabouraud reforzado con 500 $\mu$ Lde Gentamicina litro de agar.

- **Muestra 2:** Con un cuchillo estéril se cortó muestras de la parte externa de la mazorca de cacao infectado (pericarpio) con el hongo de color blanco y se colocó en forma invertida en la caja Petri con agar Papa Dextrosa y Sabouraud con 500µL de Gentamicina litro de agar.
- **Muestra 3:** Se colocó los frutos de cacao en una solución de hipoclorito de sodio 2.5% durante 5 min. Posteriormente, con ayuda de un cuchillo estéril se cortó el fruto por la mitad. Seguidamente, se tomó con una pinza estéril dos porciones enfermas del mesocarpio del fruto de cacao de 0.5 cm y se desinfectó con hipoclorito de sodio 2.5% sumergiendo la muestra durante 3 min. Luego, se lavó las porciones sumergiéndolas en agua estéril durante 2 minutos para eliminar los restos del hipoclorito de sodio. Colocar la primera porción de endocarpio ya desinfectada en placas de Agar.
- **Muestra 4:** Con un asa microbiológica se raspó el polvillo de hongo de color pardo claro y se sembró en las placas de agar.

Una vez sembradas las cuatro muestras, se incubó a 28°C en la oscuridad durante 15 días. La siembra se realizó por duplicado.

Desde el tercer al octavo día se evaluó características macroscópica (borde, textura, coloración, tipo de crecimiento y tamaño de las colonias) y se realizó la identificación microscópica de esporas e hifas del hongo en KOH 10%, lugol y azul de metileno.

#### ***2.6.2 Purificación de *Moniliophthora roreri* de frutos de cacao infectado por monilia.***

Para la purificación del fitopatógeno se utilizó la muestra que mejor desarrollo presentó en el aislamiento, se realizó la resiembra de las colonias obtenidas en la muestra 3 de cacao (porción enferma del mesocarpio del fruto de cacao) tanto de la placa de PDA y Sabouraud, se incubó a 28°C en la oscuridad durante 7 días. La siembra se realizó por duplicado.

Posteriormente se realizó una segunda resiembra tomando muestras solo de la placa con agar Sabouraud para purificar y conservar el hongo. Además se conservaron en tubos con

agar Sabouraud en refrigeración hasta su utilización en la evaluación de la actividad antifúngica.

## **2.7 Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* mediante el método de dilución con suspensión de esporas**

### ***2.7.1 Preparación de esporas de *Moniliophthora roreri****

El fitopatógeno conservado en tubos microbiológicos en Sabouraud se activó, para lo cual se sembró en el mismo medio y se incubó durante 15 días a 28°C, tiempo en el que presenta esporas. Transcurrido este tiempo, se agregó 3mL de suero fisiológico estéril y se levantó cuidadosamente con un asa estéril el hongo que creció sobre la superficie del agar, obteniéndose una suspensión de esporas, que se transfirió a un tubo estéril. El tubo se agitó en un Vórtex de 1-2min. Inmediatamente, se contaron las esporas en una cámara de Neubauer y se realizaron diluciones sucesivas con suero fisiológico hasta llegar a una concentración de 1000 esporas/mL y se guardó en viales estériles en refrigeración hasta su utilización (Brancato & Golding, 1970).

### ***2.7.2 Preparación de extractos***

Los extractos totales, terpénico y alcaloide, fueron guardados en frascos estériles protegidos completamente de la luz y el calor. En el extracto total y terpénico se tomaron 800 mg de cada extracto y se diluyeron en 8 mL de DMSO dando lugar a un extracto de concentración 100.000 mg/mL. En cambio, en el extracto alcaloide debido a su bajo rendimiento solo se pesaron 100 mg y se añadieron 2 mL de DMSO dando como resultado un extracto de 50.000 mg/mL.

### ***2.7.3 Preparación de Agar Sabouraud***

Se prepararon 620 mL de agar Sabouraud y se repartieron 15mL en 39 tubos de ensayo pírex individuales cada uno con su tapón. Se autoclavaron a 121°C por 15 minutos 15 psi. Posteriormente, se mantuvieron a 45°C en un baño maría hasta el momento de usarlos.

### 2.7.4 Evaluación de la actividad antifúngica

Se codificaron 39 cajas Petri estériles como se observa en la Tabla 2-2. Del extracto total y terpénico se evaluaron cuatro concentraciones y dos del extracto alcaloide.

**TABLA 2-2. CODIFICACIÓN DE LAS CAJAS PETRI PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA. Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias. Noviembre de 2014.**

		<b>Codificación</b>	<b>Número de cajas</b>
<b>Blanco o Testigo</b>		Testigo	3
<b>Control positivo (DMSO)</b>		C(+): DMSO	3
<b>Control negativo ( Fungicida comercial Cuprofix)</b>		C(+): F	3
<b>Extracto total</b>	500 µg/mL	C <sub>1</sub> : L	3
	1000 µg/mL	C <sub>2</sub> : L	3
	1500 µg/mL	C <sub>3</sub> : L	3
	2000 µg/mL	C <sub>4</sub> : L	3
<b>Extracto terpénico</b>	500 µg/mL	C <sub>1</sub> : T	3
	1000 µg/mL	C <sub>2</sub> : T	3
	1500 µg/mL	C <sub>3</sub> : T	3
	2000 µg/mL	C <sub>4</sub> : T	3
<b>Extracto alcaloide</b>	500 µg/mL	C <sub>1</sub> : A	3
	1000 µg/mL	C <sub>2</sub> : A	3

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

En el blanco únicamente se dejó solidificar el medio de cultivo Sabouraud, mientras que en el control positivo se utilizó el mayor volumen requerido de DMSO para la dilución de los extractos, y en el control negativo se utilizó la dosis del antifúngico cuprofix (mancozeb, cobre y etileno-thiourea) al 0,3% para inhibir el crecimiento de *Moniliophthora roreri*. Se pipeteó 350µL de cada sustancia y se colocó en los tubos con 15 mL de agar Sabouraud,

inmediatamente se mezcló en un agitador vórtex y se dispensaron en las cajas hasta solidificación.

Tanto del extracto total como terpénico de concentración de 100.000 µg/mL se pipetearon 75, 150, 225 y 3750 µL y se colocaron en los tubos con 15mL de agar Sabouraud para obtener las concentraciones que se muestran en la tabla 1, se mezclaron en un vórtex y se procedió a plaquear en las cajas Petri. Posteriormente, se realizó un agujero de 6 mm de diámetro en el centro de las 39 cajas Petri, se colocaron 30µL de la suspensión de esporas y se incubaron a 28°C por 7 días.

Para interpretar los resultados, se midió el halo de crecimiento en milímetros (mm) y se comparó con el control.

El porcentaje de crecimiento del hongo fue calculado mediante la fórmula Brancato (1953).

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{Diámetro de la muestra}}{\text{Diámetro del control}} \times 100$$

Donde un porcentaje de crecimiento menor al 25% corresponde a una inhibición positiva y un % superior a 25% corresponde a una inhibición negativa (Brancato & Golding, 1970).

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis de solubilidad del látex de sande de *Brosimum utile*

El látex de *Brosimum utile* es soluble en agua, metanol y etanol hasta proporciones 1:1 y disminuye cuando se aumenta la concentración de látex. Se observó mejor solubilidad en metanol, lo que indica que el látex presenta compuestos polares y medianamente polares.

#### 3.2 Análisis de las características organolépticas y parámetros fisicoquímicos del látex de sande de *Brosimum utile*.

Los análisis se partieron con la determinación de las características organolépticas y parámetros fisicoquímicos del látex de Sande, cuyos resultados se muestra en la Tabla 3-3.

**TABLA 3-3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL LÁTEX DE SANDE DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES- ESPOCH. Octubre del 2014.**

Características organolépticas del látex	Parámetros fisicoquímicas
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Color:</b> Blanco lechoso</li><li>• <b>Olor:</b> Penetrante</li><li>• <b>Sabor:</b> Desagradable</li><li>• <b>Aspecto:</b> Grumoso</li><li>• <b>Textura:</b> No deslizable</li><li>• <b>Consistencia:</b> Blanda y pegajosa</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>pH inicial:</b> 4,96</li><li>• <b>Densidad:</b> 0,966 mg/mL (25°C)</li><li>• <b>Índice de refracción:</b> 1,332 (20°C)</li><li>• <b>Grados Brix:</b> 6</li></ul>

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

Posterior a su recolección, el látex de Sande tenía un color blanco lechoso, olor fuerte y penetrante con un sabor desagradable. El color observado es característico de los látex de *Brosimum* (Moretti, Gaillardb, Grenand, Bevalotb, & Prevosto, 2006). La mayoría de los látex son recolectados por incisión más o menos profunda de la corteza de los árboles maderables (Matteini & Moles, 2001), ya que estos circulan por los canales lactíferos en los cuales se pueden encontrar cantidades significativas de resinas, ácidos grasos y materia insaponificable (Rodriguez, 2003 ).

Los exudados vegetales así como la savia de Sande son secreciones resinosas que le dan un aspecto grumoso, difícil de deslizar debido a la pegajosidad propia de los aceites esenciales en estado líquido.

Los parámetros fisicoquímicos nos indican la calidad del látex, el pH muestra una leve acidez pero a medida que transcurre el tiempo se va fermentando y va disminuyendo el valor, la densidad es idéntica a la de los exudados vegetales y el índice de refracción nos indica la ausencia de sacarosa (uno de los sólidos solubles) como se observa en el Anexo B, estos resultados son similares a los de Gaibor (2013).

Los resultados tanto organolépticos como fisicoquímicos obtenidos en nuestra investigación coinciden con los obtenidos en el estudio de Gaibor (2013) en el látex de *Brosimum utile*.

### **3.3 Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico se realizó mediante una extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente como éter, etanol y agua, obteniéndose resultados positivos para compuestos grasos, terpenos y/o esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, resinas y saponinas como se observa en la Tabla 4-3.

**TABLA 4-3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS CUALITATIVO DE DIFERENTES EXTRACTOS DEL LÁTEX DE SANDE DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES-ESPOCH. Octubre del 2014.**

<b>Extracto</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultado</b>
<b>Etéreo</b>	Compuestos grasos	Sudán	+
	Alcaloides	Dragendorff	-
		Mayer	-
		Wagner	-
	Compuestos lactónicos	Baljet	-
	Terpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	++
<b>Acuoso</b>	Alcaloides	Dragendorff	+
		Mayer	+
		Wagner	+
	Cloruro férrico	Taninos, compuestos fenólicos	+
	Shinoda	Flavonoides	-
	Fehling	Azúcares reductores	-
<b>Etanólico</b>	Catequinas	Catequinas	-
	Resinas	Resinas	+++
	Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	+
	Compuestos lactónicos	Baljet	-
	Saponinas	Espuma	+
	Quinonas	Borntrager	-

(-) Ausencia del metabolito analizado. (+) Presencia del metabolito analizado, turbidez. (++) Reacción positiva, turbidez definida, (+++) Reacción positiva, precipitado.

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

En el extracto etéreo hay menor porcentaje de extracción de metabolitos secundarios dado que el éter es un solvente menos polar y solo se encontraron compuestos grasos y terpenos y/o esteroides. A pesar de no existir suficiente información bibliográfica para comparar, hay un estudio realizado por Gaibor (2013) con similares resultados excepto para compuestos lactónicos. Esta variación puede estar dada por varios factores como los cambios climáticos, edad del árbol, sitio geográfico y tiempo de recolección de la savia de sande.

La presencia de terpenos y esteroides se justifica con el ensayo positivo de Liebermann-Burchard en los tres extractos etéreo, acuoso y etanólico del látex de Sande de *B.utile*. Generalmente los exudados de las cortezas de los árboles presentan un alto contenido de ácidos diterpénicos pero su composición varía de un árbol a otro (Marcano & Hasegawa, 2002). Según Steel, 1998 los diterpenos actúan como agentes tóxicos para insectos invasores y hongos patógenos. Los triterpenos son ampliamente utilizados por sus usos terapéuticos como antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, antihiper glucémicos, antiinflamatorios, antioxidantes, antiparasitarios e inmunomoduladores (Gopal & Mérillon, 2013).

En el extracto acuoso se evidenció la presencia de alcaloides. La concentración de estos metabolitos secundarios puede variar según la especie, estación del año y la parte de la planta (Hans & Wolfgang, 1987). Los alcaloides son metabolitos nitrogenados muy diversos ya que son producidos por una gran variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales. A bajas concentraciones ejercen funciones ecológicas de defensa y pueden tener un papel muy importante en el manejo químico de plagas (Gopal & Mérillon, 2013).

Los terpenos y alcaloides son metabolitos considerados como fitoalexinas (Kemp & Burden, 1985), estos metabolitos se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas sanas pero aumenta su concentración cuando sufren algún daño ya sea generados por factores bióticos producidos por el patógeno como hongos, bacterias y virus o por la propia planta en respuesta al patógeno como los oligopolisacáridos y polisacáridos, proteínas y ácidos grasos y por factores abióticos como fungicidas, sales de metales pesados como cobre y el mercurio, rayos UV, altas temperaturas y heridas (Zhao., et al. 2005).

Una ligera turbidez en el ensayo de cloruro férrico mostró la presencia de taninos y compuestos fenólicos, responsables del color característico del látex dado que son moléculas con gran número de instauraciones conjugadas y grupos cromóforos.

En el extracto etanólico se evidenció la presencia de resinas, triterpenos y esteroides así como también saponinas. Las resinas son polímeros muy complejos, propios de los exudados de árboles tropicales producidas por algunas plantas entre ellas *Brosimum utile*, las resinas son sustancias protectoras especialmente para tapar heridas y actúan como defensa contra ciertos parásitos (Lastra, 2001). Desde el punto de vista químico, las resinas son mezclas de sustancias constituidas por cadenas largas de moléculas simples y otras pueden ser mucho más complejas, la mayoría de estos componentes son parte de los hidrocarburos terpénicos (Matteini & Moles, 2001). Las saponinas también se caracterizan por su propiedad biológica como hemolítica, antimicrobiana, hipocolesterolémica, antioxidante, antifúngica, insecticida. (Días, et al. 2013).

#### **3.4. Rendimiento de extracción de la fracción terpénica (extracto hexánico) y alcaloide (extracto clorofórmico)**

Por cada 200 mL de látex de *Brosimum utile* se obtuvo 19,5758 g de fracción terpénica equivalente a 98 mg/ mL mientras que para extraer 0,1 g de fracción alcaloide se empleó 600 mL de látex de Sande que equivale a 0,17 mg/ mL. Por lo tanto, el rendimiento de obtención de la fracción terpénica es mayor en relación a los alcaloides. Esta variación puede estar dada por la propia composición química de los metabolitos secundarios de la savia de Sande ya que de acuerdo al tamizaje fitoquímico, los terpenos están presentes en mayor cantidad en relación a los alcaloides.

#### **3.5 Pruebas de identificación de la fracción terpénica y alcaloide**

Una vez realizado el aislamiento y obtención de la fracción terpénica y alcaloide, se realizaron pruebas de identificación a cada uno de los extractos y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5-3).

**TABLA 5-3. ANÁLISIS CUALITATIVO DEL EXTRACTO HEXÁNICO Y CLOROFÓRMICO DEL LÁTEX DE SANDE DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES- ESPOCH. Octubre del 2014.**

<b>Extracto</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Resultado</b>
<b>Hexánico</b>	Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	+++
		Dragendorff	+
<b>Clorofórmico</b>	Alcaloides	Mayer	+
		Wagner	+
		Marquis	+

(-) Ausencia del metabolito analizado. (+) Presencia del metabolito analizado, turbidez. (++) Reacción positiva, turbidez definida, (+++) Reacción positiva, precipitado.

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

El cambio de coloración verde oscuro-negro indica la presencia de Triterpenos y/o esteroides en el ensayo de Lieberman- Burchard (Fotografía 9E). En el extracto clorofórmico se obtuvieron resultados positivos en los ensayos Dragendorff, Mayer y Wagner (Fotografía 11G) y para confirmar la presencia de alcaloides indólicos se realizó el test de Marquis (Fotografía 11H), que se aplica generalmente para identificar morfina, codeína, anfetaminas y alucinógenos como la bufotenina.

### **3.6 Cromatografía en capa fina para la fracción terpénica**

Antes de realizar la purificación de la fracción terpénica se realizó la cromatografía en capa fina de los 4 extractos obtenidos: Extracto Acetónico, Extracto Hexánico, Extracto Acuoso y Extracto Etéreo utilizando como fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3) y como revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado: Vainillina. En la placa cromatográfica se observó que en el extracto hexánico existió mejor separación de los compuestos y se aprecia manchas visibles de color violeta mientras que en los demás extractos no se observan compuestos separados.

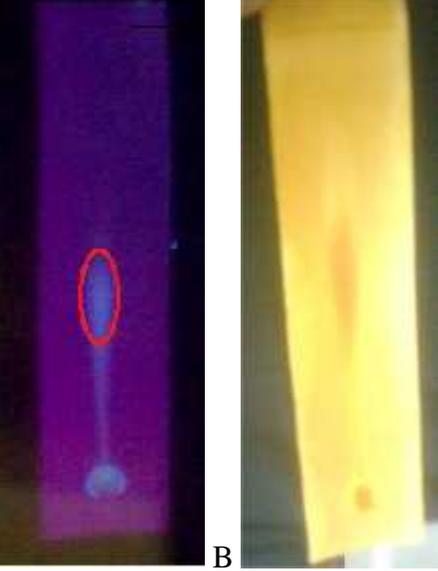
Para la purificación de la fracción terpénica solo se obtuvo el extracto hexánico debido a su correcta separación de compuestos, como se observa en la Fotografía 3-3. CCF del extracto Hexánico. En la cromatografía en capa fina del extracto hexánico se observó una mancha color violeta visiblemente clara con un  $R_f=0.5$ .



**Fotografía 2-3. CCF del extracto Hexánico**

### 3.7 Cromatografía TLC para la fracción alcaloide

**TABLA 6-3. DATOS DE LA CROMATOGRAFÍA CCF DE LA FRACCIÓN ALCALOIDE DEL LÁTEX DE SANDE DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES- ESPOCH. Noviembre del 2014.**

MUESTRA ANALIZADA	REFERENCIA (Moffat, Osselton, & Widdop, 2011)
<b>FM:</b> Metanol: Amoníaco puro (100: 1,5) <b>Revelador:</b> Dragendorff <b>Rf:</b> 0,33. % de error: 5.7	<b>FM:</b> Metanol: Amoníaco puro (100: 1,5) <b>Revelador:</b> Dragendorff <b>Rf:</b> 0,35
	
<p><b>Fotografía 3-3.</b> UV de CCF del extracto clorofórmico luego de revelar con Dragendorff (A). Vista directa de CCF del extracto clorofórmico luego de revelar en NaNO<sub>2</sub> 10 % (B)</p>	

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

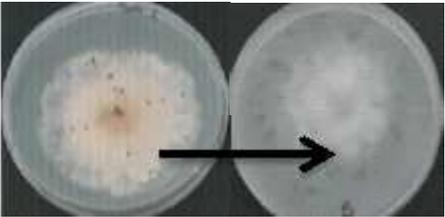
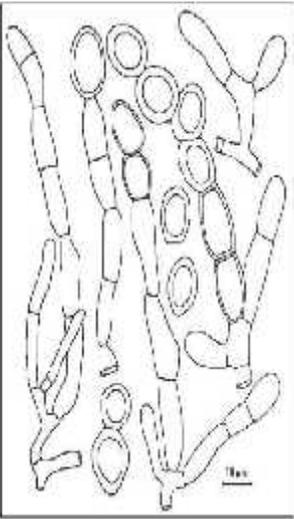
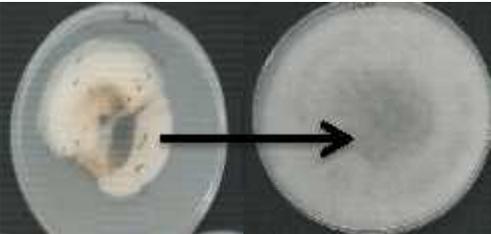
A pesar de no existir una cromatografía CCF de referencia para comparar el color de la mancha, se observó una mancha visible de los alcaloides en el extracto clorofórmico del látex de Sande, cuyo Rf y condiciones de revelado es parecido al de los alcaloides indólicos (bufotenina) encontrados en los estudios de Moffat, y otros (2011). El porcentaje de error es mínimo entre el de referencia y el encontrado en nuestra investigación. La bufotenina uno se los alcaloides indólicos ha sido obtenido de semillas y las hojas de *Peregrina*

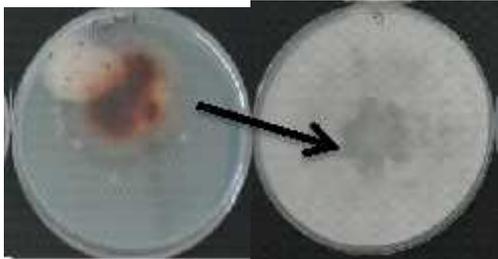
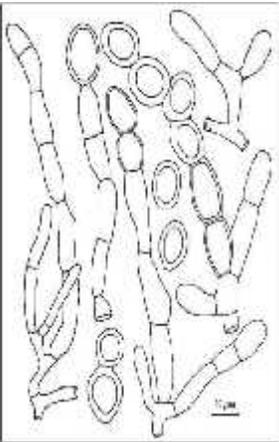
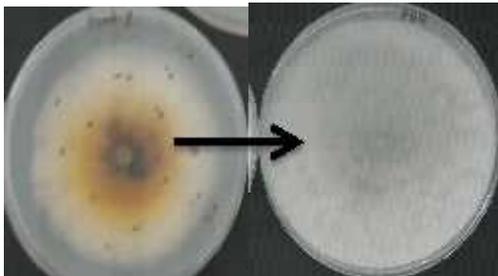
*piptadenia* y *P. macrocarpa* de la familia Mimosaceae, también ha sido aislado de especies de *Amanita* (Agaricaceae) y de las glándulas de la piel de sapos *Bufo spp* (Moffat, et al. 2011). Este alcaloide indólico también fue identificado en *Brosimum acutifolium*, por lo que es muy probable que también exista en *Brosimum utile*. Es muy importante tener en cuenta, que algunos alcaloides desempeñan un papel defensivo contra los herbívoros y patógenos, ya algunos de ellos presentan actividad biológica (Almagro, et al. 2013).

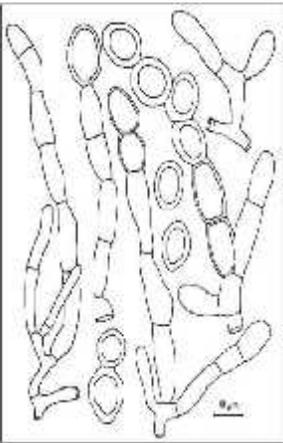
### **3.8 Aislamiento de *Moniliophthora roreri* de frutos de cacao infectado.**

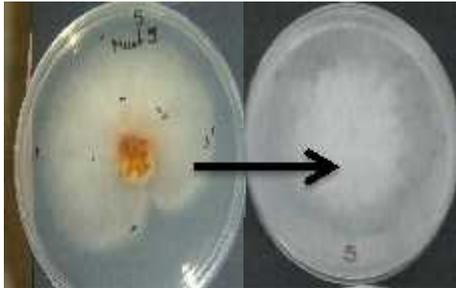
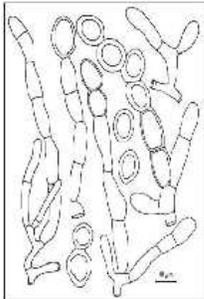
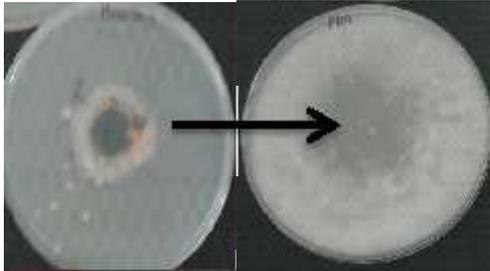
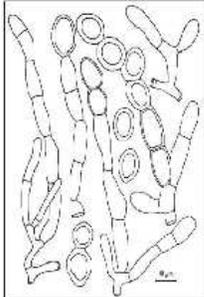
En la Tabla 7-3 se muestran los resultados del aislamiento *Moniliophthora roreri*, obtenidas de la primera siembra y resiembra de 4 partes de mazorcas de cacao infectado, sembrados en dos medios de cultivo, para su identificación fisiológica se evaluaron las características macro y microscópicas.

**TABLA 7-3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCOÓPICA DE *Moniliophthora roreri* EN DOS MEDIOS DE CULTIVO. LABORATORIO MICROBIOLÓGICO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS-ESPOCH. Noviembre de 2014.**

Muestra	Siembra de la muestra y resiembra de las colonias obtenidas	Características macroscópicas	Características microscópicas (Tinción: Azul de metileno)	
			15 <sup>avo</sup> Día	Referencia bibliográfica Fuente: Evans, 1981.
1 (Polvo blanco del pericarpio)	 <p>Agar Sabouraud</p>	<p>Crecimiento lento Color café claro- blanco Textura polvosa y afelpada Borde irregular</p>		
	 <p>PDA</p>	<p>Crecimiento lento Color café oscuro- café claro- blanco Textura polvosa y afelpada Borde regular</p>		

<p>2 (Pericarpio del cacao infectado)</p>	 <p>Agar Sabouraud</p>	<p>Crecimiento lento Color café oscuro-café claro- blanco Textura afelpada Borde irregular</p>		
	 <p>PDA</p>	<p>Crecimiento lento Color café oscuro- café claro- blanco Textura algodonosa Borde regular</p>		

<p><b>3</b> <b>(Porción enferma del mesocarpio del fruto)</b></p>	 <p>Sabouraud</p>	<p>Crecimiento rápido Color café claro-blanco Textura algodonosa Borde irregular</p>		
	 <p>PDA</p>	<p>Crecimiento rápido Color café oscuro-blanco Textura algodonosa Borde regular</p>		

<p><b>4</b> <b>(Polvillo de color crema)</b></p>	 <p>Sabouraud</p>	<p>Crecimiento lento Café claro- blanco Textura afelpada Borde irregular</p>		
	 <p>PDA</p>	<p>Crecimiento lento Color café oscuro- crema- blanco Textura polvosa y afelpada Borde regular</p>		

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

Las colonias fueron evaluadas diariamente durante 15 días en base a la morfología macroscópica como el crecimiento, color, textura y borde de la colonia. El color fue evaluado según el rango de colores (Anexo A) especificado en los trabajos realizados por Phillips-Mora (2006) para aislamientos de *M.roreri*.

El crecimiento radial de las colonias de *M. roreri* fue lento y en anillos con tonalidades diferentes desde un color café claro a oscuro durante los primeros días hasta un color crema- blanco en los días posteriores. Esta variación de color se da incluso dentro de una misma colonia desde el centro hasta el borde, tal como se observa en las cuatro muestras sembradas en agar PDA y Sabouraud (Tabla 7-3), cuyos datos coinciden con los resultados obtenidos en estudios realizados (Suárez & Rangel, 2013). Según CATIE (1989), el color y tipo de crecimiento varía de acuerdo a las condiciones nutritivas y físicas entre ellas tipo de medio de cultivo, temperatura, pH del medio, períodos alternos de luz y oscuridad, fuentes de nitrógeno, carbono.

La mayoría de las colonias del fitopatógeno se caracterizaron por tener una textura afelpada con un borde irregular en Sabouraud y un borde regular en PDA. La porción enferma del endocarpio (muestra 3 de la Tabla 7-3) fue una de las muestras que presentó un crecimiento rápido, con coloración café claro- blanco cremoso, textura afelpada y algodonosa cuyos bordes variaron de acuerdo al agar utilizado.

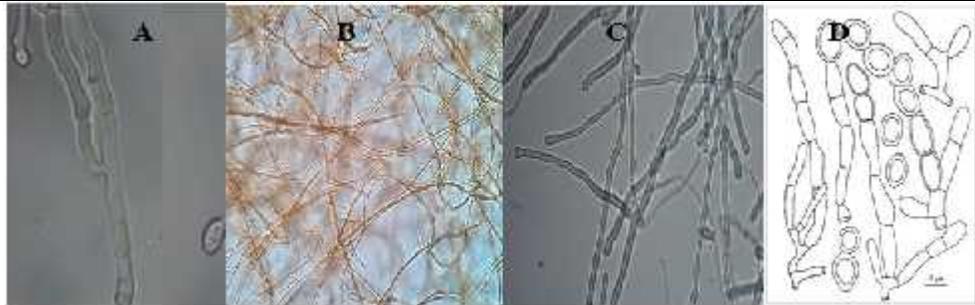
El estudio microscópico se realizó al octavo y quinceavo día, obteniendo resultados similares en todas las muestras como se observa en la Tabla 7-3. La morfología microscópica varía a medida que transcurre el tiempo. Al tercer día de incubación solo se aprecia numerosas hifas, septadas y escasas esporas, en los días posteriores se observan algunas esporas globosas y subglobosas, mientras que en el día 18 existen numerosas esporas elípticas, estas características son propias de *M.roreri* encontradas por Evans (1981).

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con las características macroscópicas y microscópicas encontradas en el estudio aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (Monilia) en frutos de *Theobroma cacao L.* (Cacao) del

cultivar San José del real de la carrera, Usulután realizado por (González & Roble, 2014). Además se encontraron resultados similares en el estudio: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la costa Ecuatoriana realizadas por el Centro de Investigación Científica y Tecnología de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (Villavicencio & Jiménez, 2010).

En la Tabla 8-3 se muestran los resultados de las características microscópicas de *M. roreri*, obtenida de la resiembra.

**TABLA 8-3. RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE *M. roreri*, OBTENIDA DE UNA RESIEMBRA. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS-ESPOCH. Noviembre de 2014.**

	KOH	LUGOL	AZUL DE METILENO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA Fuente: Evans, 1981.
<b>Hifas</b>	+++	+++	+++	Micelio septado
<b>Esporas</b>	+	+	+	Esporas de pared gruesa
<b>Gemación</b>	++	++	++	++
<b>Vista al microscopio</b>	 <p><b>Fotografía 4-3.</b> Apariencia microscópica de <i>Moniliophthora roreri</i> en KOH (A), lugol (B), azul de metileno (C), referencia(D)</p>			

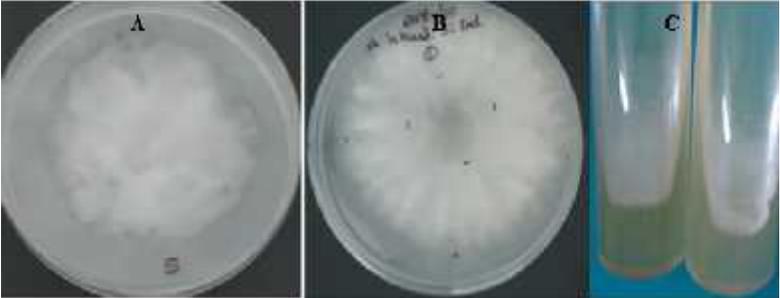
+++ : Numerosas. ++ : Algunas. + : Escasas. FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

Las características microscópicas de la Tabla 8-3 fueron analizadas a los 8 días en KOH, lugol y azul metileno (Fotografía 4-3). Las muestras analizadas se caracterizaron por la presencia de numerosas hifas hialinas, septadas, también se muestra algunas esporas

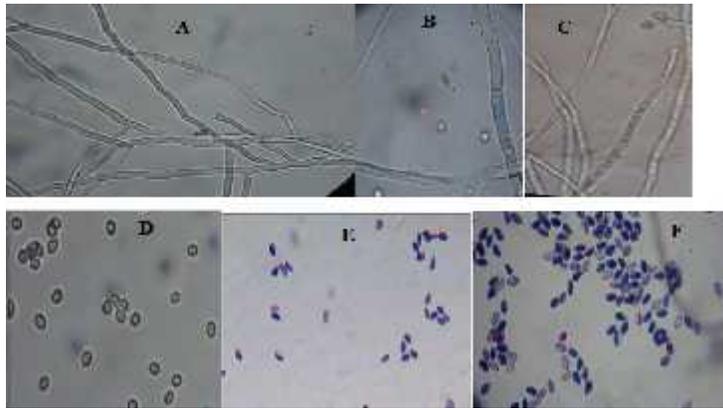
hialinas globosas, subglobosas y elípticas con pared celular gruesa, bifurcadas en la parte distal (Pinochet, 1987), similares a las características de referencia Evans (1981). A medida que pasaba el tiempo se observaba la presencia de algunos tubos germinativos, según (Suárez, Moreira, & Vela, 1993) los tubos germinativos en la planta de cacao son los responsables de la infección superficial ya que estos ingresan en los estomas a través de la epidermis y desarrolla micelio intracelular e intercelular hasta su total destrucción, estos resultados coinciden con los resultados por González, y otros (2014).

El aislamiento de *Moniliophthora roreri* se realizó satisfactoriamente en Sabouraud Dextrosa Agar mediante resiembra de las colonias de la muestra 3 (Porción enferma del mesocarpio del fruto de cacao) ya que presentó un crecimiento rápido durante los primeros días, debido a la adaptación del fitopatógeno al medio de cultivo, cuyas características macroscópicas y microscópicas son idénticas a las obtenidas en todas las muestras del primer ensayo confirmándose que se trata de *M. roreri*, como se muestra en la Tabla 9-3.

**TABLA 9-3. APARIENCIA MACROSCÓPICAS Y MICROSCOPICA DE *Moniliophthora roreri* LABORATORIO CLÍNICO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS-ESPOCH. Noviembre del 2014.**

	<b>Fotografías</b>
<b>APARIENCIA MACROSCÓPICA</b>	<div style="text-align: center;">  </div> <p data-bbox="557 1612 1406 1682"><b>Fotografía°5-3.</b> Cultivo en Sabouraud Dextrosa Agar de <i>M. roreri</i> en placa (A,B) y en tubos microbiológicos (C)</p>

**APARIENCIA  
MICROSCÓPICA**



**Fotografía 6-3.** Apariencia microscópica de *M. roreri*: hifas en azul de metileno (A,B), hifas y esporas en KOH (C), esporas (D), tinción Gram de las esporas (E,F)

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

### **3.9 Evaluación de la actividad antifúngica**

En la Tabla 10-3 se aprecian los resultados de la evaluación antifúngica durante 25 días de los diferentes tratamientos sobre *Moniliophthora roreri*, para esto se midió el diámetro de crecimiento hasta que el fitopatógeno cubrió el diámetro total de la caja Petri. Al quinto día aún fue posible medir el diámetro de crecimiento del control positivo (C (+): DMSO), por tanto, el porcentaje de crecimiento se muestra hasta ese día, considerando que este parámetro relaciona el diámetro del control positivo con el diámetro de cada tratamiento, multiplicado por 100. Un crecimiento menor o igual a 25% corresponde a una inhibición positiva (Brancato & Golding, 1970).

**TABLA 10-3. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA EN *Moniliophthora roreri*. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS-ESPOCH. Diciembre de 2014.**

<b>DÍAS</b>	<b>3</b>		<b>5</b>		<b>10</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>25</b>
<b>Tratamiento</b>	<b>D<sup>1</sup></b>	<b>% C<sup>2</sup></b>	<b>D<sup>1</sup></b>	<b>% C<sup>2</sup></b>	<b>D<sup>1</sup></b>				
<b>C(-): F</b>	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	-	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	-	0 ± 0,00 <sup>a</sup>				
<b>C(+): DMSO</b>	72,67 ± 0,58 <sup>g</sup>	-	84 ± 0,00 <sup>g</sup>	-	*	*	*	*	*
<b>L 500 ppm</b>	71,00 ± 1,00 <sup>g</sup>	97,7	83,66 ± 0,57 <sup>g</sup>	99,6	*	*	*	*	*
<b>L 1000 ppm</b>	68,00 ± 1,00 <sup>g</sup>	93,5	83,33 ± 1,15 <sup>g</sup>	99,2	*	*	*	*	*
<b>L 1500 ppm</b>	55,00 ± 1,00 <sup>d</sup>	76,1	81,00 ± 1,00 <sup>f</sup>	96,1	*	*	*	*	*
<b>L 2000 ppm</b>	7,33 ± 1,15 <sup>b</sup>	10,1	17,00 ± 1,00 <sup>c</sup>	20,2	60,33 ± 1,15 <sup>d</sup>	75,00 ± 1,15 <sup>e</sup>	83,67 ± 0,57 <sup>e</sup>	*	*
<b>E.T 500ppm</b>	76,00 ± 1,00 <sup>h</sup>	100,0	84,00 ± 0,00 <sup>g</sup>	100,0	*	*	*	*	*
<b>E.T 1000ppm</b>	71,33 ± 1,15 <sup>f</sup>	98,1	83,33 ± 1,15 <sup>g</sup>	99,2	*	*	*	*	*
<b>E.T 1500ppm</b>	58,67 ± 1,15 <sup>e</sup>	79,8	75,00 ± 0,00 <sup>e</sup>	89,3	*	*	*	*	*
<b>E.T 2000ppm</b>	18,67 ± 1,15 <sup>c</sup>	24,8	32,67 ± 1,15 <sup>d</sup>	37,3	43,67 ± 1,52 <sup>c</sup>	60,67 ± 2,30 <sup>d</sup>	72,00 ± 2,00 <sup>d</sup>	74,67 ± 1,15 <sup>d</sup>	79,00 ± 0,57 <sup>d</sup>
<b>E.A 500 ppm</b>	5,67 ± 0,58 <sup>b</sup>	7,8	11,33 ± 1,15 <sup>b</sup>	13,5	29,67 ± 1,52 <sup>b</sup>	46,00 ± 1,73 <sup>c</sup>	50,33 ± 2,30 <sup>c</sup>	58,67 ± 1,53 <sup>c</sup>	61,66 ± 1,52 <sup>c</sup>
<b>E.A 1000 ppm</b>	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,0	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,0	0 ± 0,00 <sup>a</sup>	9 ± 1,00 <sup>b</sup>	13,33 ± 1,53 <sup>b</sup>	18,33 ± 0,57 <sup>b</sup>	21,33 ± 1,15 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Diámetro expresado en mm. ± Desviación estándar. <sup>2</sup>Expresado como el porcentaje de crecimiento. \* Se excluye por alcanzar el diámetro máximo de la caja Petri. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

FUENTE: MORETA A, 2014 ESPOCH

Los resultados de los tratamientos fueron comparados por días, presentando diferencia estadística significativa en cada día evaluado. El fungicida comercial C (-): F no presentó crecimiento durante los 25 días. A los días 3, 5 y 10, dicho tratamiento no tiene diferencia estadística significativa con el tratamiento E.A 1.000 ppm, siendo el porcentaje de inhibición sobre *M. royeri* positiva. En el día 3 el mejor resultado luego de E.A. 1000ppm corresponden a E.A 500 ppm y L 2.000 ppm que estadísticamente son iguales, seguido de E.T 2.000 ppm, presentando inhibición positiva. El resto de tratamientos no presentan inhibición, siendo L 500 ppm, L 1.000 ppm, E.T 500ppm, tratamientos estadísticamente iguales o mayores que el blanco positivo C (+) DMSO.

Al quinto día los tratamientos que muestran inhibición positiva son: L 2.000 ppm y E.A 500 ppm, este último estadísticamente presenta un menor % de crecimiento. Los demás tratamientos no inhibieron el crecimiento de *M. royeri*. A partir del décimo día, se pudo evaluar el crecimiento del fitopatógeno, solo en la concentración más alta (2000 ppm) de los tratamientos con látex de Sande y extracto terpénico, mientras que el tratamiento con extracto alcaloide fue evaluado en sus dos concentraciones durante los 25 días.

En el día 10 los tratamientos en orden ascendente con base en su diámetro fueron: E.A 500 ppm, E.T 2.000 ppm y L 2.000 ppm presentando diferencias estadísticamente significativas. En los días 14 y 17, el único tratamiento que no permitió el crecimiento del fitopatógeno fue el fungicida comercial, en los demás tratamientos existió crecimiento, sin embargo E.A 1000 ppm mostró el menor crecimiento, seguido de E.A 500 ppm, E.T 2000 ppm y L 2000 ppm. En las dos últimas evaluaciones (días 21 y 25), solamente los tratamientos E.A 1000 ppm, E.A 500 ppm y E.T 2000 ppm permitieron la medición del diámetro de la colonia, existiendo diferencias estadísticamente significativas, por lo que el mejor tratamiento fue E.A 1000 ppm con un diámetro de 21.33 mm seguido de E.A 500 ppm, con 61.66 mm y E.T 2000 ppm con 79 mm.

Por lo anterior, los tratamientos de mejor desempeño corresponden al extracto alcaloide (E.A), en concentración de 1.000 ppm ya que actúa de manera similar al fungicida comercial hasta el décimo día, permaneciendo en estado de latencia ya que al día 14 se observa crecimiento, seguido del E.A 500 ppm, coincidiendo con resultados obtenidos por Zamora (2008) en el estudio composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus*

(Fabaceae) y evaluación antifúngica del extracto alcaloideo, concluyendo que la lupamina, es uno de los alcaloides más abundante y sobre todo mostró actividad inhibitoria del crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii* a 500 ppm. Así mismo en otro estudio ee extracto clorofórmico exhibió una fuerte actividad antifúngica in vitro en *Fusarium graminearum* a una concentración de 1.500 ppm (Vogt, Cifuentes, Tonn, Sabini, & Rosas, Antifungal activity in vitro and in vivo of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus., 2012).

Los alcaloides indólicos provocan efectos citotóxicos, ya que actúan de forma selectiva durante la fase mitótica del ciclo celular y restringen el crecimiento celular. A elevadas concentraciones interrumpen el ciclo celular, provocando la muerte del microorganismo, además puede inhibir la síntesis de proteínas, ADN y ARN (Calvo, 2010). En forma general, el extracto clorofórmico del látex de Sande presenta mejor actividad fungistática sobre *M. royeri*, aunque hasta el momento no hay investigaciones llevadas a cabo para probar el efecto del látex de *Brosimum utile* contra otros fitopatógenos de importancia agrícola.

## CONCLUSIONES

- El látex de Sande de *Brosimum utile* Kunth presenta: ácidos grasos, terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos, resinas y saponinas.
- Las fracciones, terpénica y alcaloidea del látex de *Brosimum utile* fueron obtenidas satisfactoriamente mediante procedimientos químicos usando diferentes solventes, cuyo rendimiento de extracción es mayor en los terpenos. Posiblemente, en el extracto clorofórmico existe alcaloides tipo indólicos propios de la especie *Brosimum*.
- Las colonias del fitopatógeno de *Moniliophthora roreri* de frutos de cacao (*Theobroma cacao L*) se aislaron con éxito en agar Sabouraud ya que presentaron una morfología macroscópica y microscópica uniforme en todas las muestras analizadas, las cuales se caracterizaron por la presencia de hifas hialinas septadas, esporas globosas, subglobosas y elípticas con pared gruesa propias del fitopatógeno.
- El extracto total y terpénico de látex de Sande de *Brosimum utile* presentaron inhibición positiva a 2.000 ppm en *Moniliophthora roreri* durante 5 días, mientras que el extracto alcaloide mostró actividad antifúngica a 500 y 1.000 ppm durante 25 días, ya que son altamente tóxicos. Por lo tanto los metabolitos secundarios del látex tienen actividad biológica frente a los fitopatógenos de la monilia del cacao y se podría utilizar como una alternativa ecológica al manejo de plagas del cacao.

## RECOMENDACIONES

- El látex de Sande de *Brosimum utile* se debe guardar en frascos ámbar en refrigeración para evitar la degradación de los compuestos.
- Antes de realizar los diferentes análisis se debe verificar que el látex sea completamente puro y no adulterado, ya que impide la extracción de la fracción terpénica y alcaloide.
- Identificación de la cepa *M. roreri* aislado en esta investigación mediante técnicas de biología molecular.
- Aumentar la concentración del extracto de alcaloides y usar un extracto combinado de alcaloides y terpenos, para evaluar la actividad antifúngica y observar si los resultados son equivalentes al uso del fungicida comercial.
- Utilizar el extracto alcaloide como materia prima para la elaboración de un producto fungistático biodegradable.
- Mediante técnicas cromatográficas y de identificación avanzadas caracterizar molecularmente los terpenos y alcaloides presentes en el látex de Sande de *Brosimum utile*
- Una vez identificadas las estructuras moleculares, especialmente de alcaloides, realizar síntesis química de éstas para su evaluación *in vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

**ABALLAY, Erwin., & INSUNZA, B.** Evaluación de plantas con propiedades nematocidas en el control de *Xiphinema index* en vid de mesa cv. Thompson Seedless en la zona central- Chile. Agricultura Técnica, 2002. pp. 357-365.

[http://scholar.google.es/scholar?q=plantas+con+actividad+alelopatica+&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5](http://scholar.google.es/scholar?q=plantas+con+actividad+alelopatica+&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5)

2015-01-12

**AL-REZA, Sharif., et al.** Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L (Elsevier: Pesticide Biochemistry and Physiology). Vol. 96, N° 96. Korea, 2009, pp. 1-4.

<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.org/science/article/pii/S0048357509001369>

2015-01-26

**AMORES, Freddy.** Moniliasis del Cacao: Frutos de cacao afectada por Moniliasis. CropLife Latin America. INIAP. 2012, pp. 1.

<http://www.croplifela.org/es/plaga-del-mes.html?id=472>

2015-01-05

**ARGENTINA,** Ministerio de la Salud; Organizacion Panamericana de la Salud; Secretaria del Ambiente y Desarrollo Sustentable. *La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente.* Buenos Aires-Argentina. Gráfica Laf S.R.L. 2007. pp. 11-15.

<http://www.ops.org.ar/publicaciones/otras%20pub/agroquimicos.pdf>

2014- 10-12

**ÁVALOS, Adolfo., & PÉREZ, Elena.** Metabolismo Secundario de las Plantas (Reduca). Vol. 2, N° 3. 2009, España, pp. 1-20.

<http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>

2014-10-16

**AVILLA, M.** Situación Fitosanitaria y evaluación de los productos alternativos y convencionales para manejar *Fusarium oxysporum* en *Vasconcella spp.* (Tesis). (Biólogo del Medio Ambiente). Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Biología del Medio Ambiente. Cuenca, Ecuador. : INIAP Archivo Historico. 2010, pp. 61-63.

<http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/163/1/07630.pdf>

2014-10-18

**AYALA, G.** Diseño del proceso de fabricación de un comprimido fitofarmacéutico adelgazante. Riobamba, Ecuador. Interamericana. 2005, pp. 12-20.

**BAJPAI, Vivek., et al.** Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria L* (Elsevier: Bioresource Technology). Vol. 99, N° 18. 2008, Korea, pp. 1-4.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408003817>

2015-01-16

**BARRERA, José., & HURTADO, Norman.** Enfermedades en el cultivo de Cacao: Revista El Agro. Guayaquil- Ecuador. Unimasa. 2012. pp. 1. <http://www.revistaelagro.com/2014/07/29/enfermedades-en-el-cultivo-de-cacao/>

2014-11-01

**BARRERA, Laura., & GARCÍA, Laura.** Actividad antifúngica de los aceites esenciales y sus compuestos sobre el el crecimiento de *Fusarium sp* aislado de papaya (*Carica papaya*) (UDO Agrícola). Vol. 8, N° 1, 2008. Yautepec- México, pp. 1-3.

<file:///C:/Users/Personal/Downloads/Dialnet->

[ActividadAntifungicaDeAceitesEsencialesYSusCompues-3094829%20\(1\).pdf](ActividadAntifungicaDeAceitesEsencialesYSusCompues-3094829%20(1).pdf)

2014-10-16

**BRANCATO, F., & GOLDING, N.** The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycología. Brasil. Brazilian Archives of Biology and Technology* 1970, pp. 310.

**BRAUDEAUN, Jean.** El cacao. Barcelona- España. Blume. 1970, pp. 94,95.

**BRUNO, Alfredo.** Estimación de los efectos ambientales y socioeconómicos del uso de plaguicidas. Uruguay. MGAP. 2008. Pp.1-4.

<http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/uruguay/Documentos%20de%20la%20Oficina/CoyunturaAgropecuaria/coy-enero2008.pdf>

2014-10-05

**BURN, Michael., & MAYLE, Francis.** Palynological differentiation between genera of the Moraceae family and implications for Amazonian palaeoecology (Elsevier: Review of Palaeobotany and Palynology). Vol. 149. N° 187–201. 2008, Edimburgo, pp. 1-13.

<http://www.sciencedirect.com.sci-hub.org/science/article/pii/S0034666707001479>

2014- 10- 12

**CÁCERES, A.** Actividad antifúngica del extracto total en etanol de la hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (Ultimorrial) (Scientia et Technica). Vol. 1, N° 33. Sincelejo –Colombia, 2007, pp. 1-6.

<http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/viewFile/6171/3201>

2014-10-26

**CALVO, María.** Formulario nacional de medicamentos: vinblastina. La Habana. Infomed. 2010, pp. 1.

<http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=233>

2015-01-26

**CASTAÑO, Nicolas., et al.** Ecología, aprovechamiento y manejo sostenible de nueve especies de plantas del departamento del Amazonas, generadoras de productos maderables y no maderables. Bogotá- Colombia. corpoica . 2007, pp. 159-169.

<http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/55169/9especiesfinal.pdf>

2015-01-14

**CHACIN, Luz.** Algunos aspectos biológicos y patogénicos del hongo *Monilia roleri* Ciferri y Parodi, agente causal de moniliasis en cacao. (Tesis). (Ing Agr). Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía. Maracaibo- Venezuela. 1975, pp. 1.

<http://orton.catie.ac.cr/cgi->

[bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=031983](http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=031983)

2014-10-15

**CHÁVEZ, Enrique., et al.** Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium* (Agrociencia). Vol. 34. N° 34. 2000, Jalisco- México, pp. 1-4.

<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2000/mar-abr/art-10.pdf>

2014-10-16

**CHEN, Jia., et al.** New broad-spectrum antibacterial and antifungal alkaloids from *Kopsia hainanensis* (Elsevier: Phytochemistry Letters). Vol. 7, N° 7. 2013, China, pp. 1-3.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390013002127>

2015-01-14

**COMISIÓN EUROPEA,** Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Salud y Medio Ambiente. 2007.

<https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/medioAmbiente/home.htm>

2014-10-05

**CUNHA, Geraldino., et al.** Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens* (Elsivier: Toxicon). Vol. 45, N° 6. 2005, China, pp. 1,2.

<http://www.sciencedirect.com.sci-hub.org/science/article/pii/S0041010105000334>

2015-01-16

**DAN, Yang., et al.** Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens (Elsevier: Crop Protection). Vol. 29, N° 3. 2010, China, pp. 1,2.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219409003056>

2015-01-16

**DIAS, Bernardo., et al.** Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities (Elsevier: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects). Vol. 436, N° 436. 2013, Brazil, pp. 1-4.

<http://www.sciencedirect.com.sci-hub.org/science/article/pii/S0927775713006092>

2015-01-12

**ECUADOR**, Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria. Quito- Ecuador, [ecuadorencifras.gob.ec](http://ecuadorencifras.gob.ec). 2012. pp. 4-36.

<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/PRESENTACION-Espac.pdf>

2014- 10- 15

**ECUADOR**, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). Uso de Plaguicidas en la Agricultura. Quito- Ecuador, [ecuadorencifras.gob.ec](http://ecuadorencifras.gob.ec). 2013. pp. 8-22.

[http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas\\_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Presentacion\\_resultados\\_principales-Uso\\_de\\_Plaguicidas\\_en\\_la\\_Agricultura\\_2013.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Presentacion_resultados_principales-Uso_de_Plaguicidas_en_la_Agricultura_2013.pdf)

2015- 01- 03

**ECUADOR**, Ministerio del Ambiente., et al. Inventario De Plaguicidas COPs. Quito – Ecuador. ESPOL- ICQ- LC. 2004 pp. 13-15.

<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/16314/1/Inventario%20de%20Plaguicidas%20COPs%20en%20el%20Ecuador.pdf>

2014- 09-28

**FACHÍN, Maria., et al.** Actividad antifúngica del extracto de *Brosimum rubescens* (Palisangre) (Ciencia Amazónica). Vol. 2, N° 2. 2012, Iquitos- Perú, pp. 1-8.

<file:///C:/Users/Personal/Downloads/44-219-1-PB.pdf>

2014-10-16

**GAIBOR, Doris.** Determinación de la actividad gastroprotectora de Savia de sande (*Brosimum utile*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con lesiones gástricas inducidas. (Tesis). (BQF). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba- Ecuador. 2014, pp. 58-95.

<http://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3098/1/56T00400.pdf>

2014-10-18

**GONZALEZ, Adriana., & ROBLE, Alba.** Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (monilia) en frutos de *Theobroma cacao* L. (cacao) del cultivar San Jose Del Real De La Carrera, Usulután. (Tesis). (Licenciatura en Química y Farmacia). Universidad de El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. El Salvador- Centroamérica. 2014, pp. 39-132.

<http://ri.ues.edu.sv/5698/1/16103425.pdf>

2014- 10- 15

**GONZALEZ, Julio. Et al.** Diterpenes from the latex of *Euphorbia broteri* (Elsevier: Phytochemistry). Vol. 27, N° 27. 1988, España, pp. 1-6.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942288806150>

2015-01-14

**GOPAL, Kishan., & MÉRILLON, Jean.** Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Berlin- New York. Springer. 2013, pp. 2972- 2988.

**HANS, Beyer., & WOLFGANG, Walter.** Manual de química orgánica. Barcelona-España.: Reverte. 1987, pp. 653- 712.

[http://books.google.com.ec/books/about/Manual de qu%C3%ADmica org%C3%A1nica.html?id=Pm7lNZzKlaoC](http://books.google.com.ec/books/about/Manual_de_qu%C3%ADmica_org%C3%A1nica.html?id=Pm7lNZzKlaoC)

2014-12-18

**HU, J.,** Alkaloids from *Toddalia asiatica* and their cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities (Elsevier: Food Chemistry ). Vol. 148, N° 1. 2013, China, pp. 1-3.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613000277>

2015-01-16

**JAIMES, Yierme., & ARANZAZU, Favio.** Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Coproica. Colombia. 2010, pp. 42-50.

[http://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub\\_doctecnicos/fedecacao-pub-doc\\_04B.pdf](http://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_04B.pdf)

2014- 10- 19

**KEMP, M., & BURDEN, R.** Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees (Elsevier: Phytochemistry). Vol. 25, N° 6. USA, 1985, pp. 1-3.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200812698>

2014-12-18

**LASTRA, Juan.** Bosques naturales de Asturias. Oviedo. Universidad de Oviedo. 2001, pp. 104.

[https://books.google.com.ec/books?id=R9tif4trf2AC&pg=PA104&lpg=PA104&dq=Bosques+naturales+de+Asturias+%2B+resinas&source=bl&ots=l3cBheFN0E&sig=vpqJNQTbhjubZNHZ-m\\_dCGKS52g&hl=es&sa=X&ei=Q7nSVPC9PMWegwS07oOACQ&ved=0CCgQ6AEwA#v=onepage&q=Bosques%20naturales%20de%20Asturias%20%2B%20resinas&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=R9tif4trf2AC&pg=PA104&lpg=PA104&dq=Bosques+naturales+de+Asturias+%2B+resinas&source=bl&ots=l3cBheFN0E&sig=vpqJNQTbhjubZNHZ-m_dCGKS52g&hl=es&sa=X&ei=Q7nSVPC9PMWegwS07oOACQ&ved=0CCgQ6AEwA#v=onepage&q=Bosques%20naturales%20de%20Asturias%20%2B%20resinas&f=false)  
2015-01-12

**LLUMIQUINGA, Ana.** Evaluación Del Impacto Ambiental De Tecnologías Para Producción De Papa Con Alternativas Al Uso De Plaguicidas Peligrosos En El Cantón Píllaro – Provincia De Tungurahua. (Tesis). (Ingeniera Agrónoma). Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica. 2009. Ambato- Ecuador. pp. 24-27.

<ftp://ftp.cgiar.org/cip/DIV1/Anexos%20HortiSana%20report/alcance%201/Anexo%2031%20Tesis%20ambiental%20Cristina.pdf>

2014- 10- 15

**LÓPEZ, René., & MONTERO, Martín.** Manual de identificación de especies forestales con manejo certificable por comunidades. Bogotá- Colombia. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas "SINCHI". 2007, pp. 1.

<http://www.sinchi.org.co/index.php/revista-colombia-amazonica/item/93-manual>

2015-01-14

**LÓPEZ, R., et al.** Manual de plantas medicinales para guinea Ecuatorial. Agencia Española- España. Fundación de Religiosos para la salud (FRS). 2012, pp. 12-17. .

[http://www.fundacionfrs.es/archivos/manual\\_plantas\\_medicinales\\_v2.pdf](http://www.fundacionfrs.es/archivos/manual_plantas_medicinales_v2.pdf)

2014-11- 14

**LUNA, Luz., & LARA, Guillermo.** Alelopatía y extractos vegetales: alternativas para el manejo de insectos plagas y enfermedades en cultivos. Produmedios. Cali- Colombia. 2007, pp. 2-10.

<http://www.horticulturaalternativa.com/docuweb/alelopatia2.pdf>

2014-10-17

**MARÁZ, Lázló., et al.** Descripción de siete especies forestales nativas del bosque húmedo tropical en el Sur de Costa Rica. Eschborn- Costa Rica. CATIE. 1997, pp. 24-33.

<http://www2.gtz.de/dokumente/bib/97-1456.pdf>

2015- 01- 08

**MARCANO, Deanna., & HASEGAWA, Masahisa.** Fitoquímica Organica. 2<sup>da</sup> ed. Caracas- Venezuela. Torino. 2002, pp. 237-242.

<https://books.google.com.ec/books?id=hPkjgPwXD->

[https://books.google.com.ec/books?id=hPkjgPwXD-QC&pg=PA237&lpg=PA237&dq=Fitoquimica+Organica+%2B+terpenos&source=bl&ots=N8M8ifXhID&sig=SFk4YOEa5btERwENJucMMZVz7rc&hl=es&sa=X&ei=2X\\_SVJGmN4yyggSDpoSwAQ&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=Fitoquimica%20Organica%20%2B%20terpenos&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=hPkjgPwXD-QC&pg=PA237&lpg=PA237&dq=Fitoquimica+Organica+%2B+terpenos&source=bl&ots=N8M8ifXhID&sig=SFk4YOEa5btERwENJucMMZVz7rc&hl=es&sa=X&ei=2X_SVJGmN4yyggSDpoSwAQ&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=Fitoquimica%20Organica%20%2B%20terpenos&f=false)

2015-01-14

**MATTEINI, Mauro., & MOLES, Arcangelo.** La química en la restauración. Donostia-San Sebastián. NEREA. 2001, pp. 201-210.

[https://books.google.com.ec/books?id=D7mMueTik38C&pg=PA499&lpg=PA499&dq=La+qu%C3%ADmica+en+la+restauraci%C3%B3n+%2B+latex&source=bl&ots=z7FK-qK9fw&sig=C\\_wKakZRMKdqqW4hgexVoC7kHzw&hl=es&sa=X&ei=dHvSVJ\\_4JKHIsQSIw4LgAw&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=La%20qu%C3%ADmica%20en%20la%20restauraci%C3%B3n%20%2B%20latex&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=D7mMueTik38C&pg=PA499&lpg=PA499&dq=La+qu%C3%ADmica+en+la+restauraci%C3%B3n+%2B+latex&source=bl&ots=z7FK-qK9fw&sig=C_wKakZRMKdqqW4hgexVoC7kHzw&hl=es&sa=X&ei=dHvSVJ_4JKHIsQSIw4LgAw&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=La%20qu%C3%ADmica%20en%20la%20restauraci%C3%B3n%20%2B%20latex&f=false)

2015-01-14

**MIRANDA, M.** *Farmacognosia y productos naturales.* La Habana- Cuba. Universidad de la Habana. Interamericana. 2006, pp. 12-15.

**MOFFAT, Anthony.,et al.** Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. . Italy:. 4<sup>ta</sup> ed. Noidia- India. Pharmaceutical Press. 2011, pp. 1005.

**MOHAMED, A., et al.** Cardiotoxicity in vitro and mechanism of action of the Egyptian green toad *Bufo viridis* skin secretions (Elsevier: Toxicology in Vitro). Vol. 24, N° 2. 2009, Egipto, pp. 1.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233309002902>

2015-01-16

**MORETTI, Christian., et al.** Identification of 5-hydroxy-tryptamine (Bufotenine) in Takini (*Brosimum acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* CC. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau (Elsevier Journal of Ethnopharmacology). Vol 106, N° 198-202. 2006, Francia, pp. 1-5.

<http://www.sciencedirect.com.sci-hub.org/science/article/pii/S0378874105008433>

2014-10-20

**OPPELET, Armin.** Descripción de siete especies forestales nativas del bosque húmedo tropical en el Sur de Costa Rica. Eschborn- Costa Rica. CATIE. 1997, pp. 24-33.

<http://www2.gtz.de/dokumente/bib/97-1456.pdf>

2014- 10- 28

**ORTEGA, Rosalba., et al.** Evaluacion de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos etanólicos de “sangregado” (*Croton draco* Schltdl. & Cham.). Veracruz- México. FCBA-UV. 2011, pp. 1-5.

[file:///C:/Users/Personal/Downloads/REsPYN%20Conferencia%20C.%20draco%20%20Monterrey%202011%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Personal/Downloads/REsPYN%20Conferencia%20C.%20draco%20%20Monterrey%202011%20(2).pdf)

2015-01-22

**PHILLIPS-MORA, Wilbert., et al.** Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. CropLife Latin America. Croplifela. 2012, pp. 1.

<http://www.croplifela.org/es/plaga-del-mes.html?id=472>

2015-01-05

**PINOCHET, Jorge.** Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivo frutales de la región centroamericana. Turrialba-Costa Rica. Orton IICA / CATIE. 1987, .: Bib. Orton IICA / CATIE.

**PUENTE, Mayra., et al.** Determinación de la actividad alelopática de los extractos vegetales en fitopatógenos del suelo (Agrícola). Vol. 1, N° 1. 2003, pp. 1-4.

[http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V30-Numero\\_1/cag151031275.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V30-Numero_1/cag151031275.pdf)

2014-12-13

**PURVES, David.** Vida: Ciencia de la Biología. 8<sup>va</sup>ed. Buenos Aires- Argentina. Médica Panamericana. 2009. p. 27.

<https://books.google.com.ec/books?id=Rlw3cKDaMfEC&printsec=frontcover&dq=Vida:+Ciencia+de+la+Biolog%C3%ADa&hl=es&sa=X&ei=zjfSVMzMGo7isASly4DYAQ&ved=0CB8QuwUwAA#v=onepage&q=Vida%3A%20Ciencia%20de%20la%20Biolog%C3%ADa&f=false>

2014-10- 17

**ROCHA, Pedro.** Biotecnología en Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia. Downloads. 2010. pp. 1,2.

<file:///C:/Users/Personal/Downloads/2010-10%20Plantas%20medicinales%20PRocha.pdf>

2014- 10- 14

**RODRÍGUEZ, Aída., et al.** Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium xysporum f. sp. lycopersici* (UDO Agrícola). Vol. 8, N° 1. 2012, Jalisco- México, pp. 1-3.

<http://www.bioline.org.br/request?cg12011>

2015-01-16

**RODRIGUEZ, Antonio.** Estudios de valoración energética de combustibles forestales para la prevención de incendios forestales en la Sierra de la Primavera (Jalisco, México) mediante calorimetría de combustión y ensayos de inflamabilidad. México. Universidad Santiago de Compostela. 2003, pp. 41-44.

[https://dspace.usc.es/bitstream/10347/2619/1/9788498873191\\_content.pdf](https://dspace.usc.es/bitstream/10347/2619/1/9788498873191_content.pdf)

2014-10-12

**ROMERO, Monica.** Plantas Aromáticas: Tratado aromaterapia científica. Buenos Aires. Kier. 2004, pp. 115.

<https://books.google.com.ec/books?id=OhbQymtQUP4C&pg=PA115&dq=Plantas+Arom%C3%A1ticas+%2B+aldehido+cinamico&hl=es&sa=X&ei=LcjSVPriEpGRsQSbxIKYAw&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=Plantas%20Arom%C3%A1ticas%20%2B%20aldehido%20cinamico&f=false>

2015-01-12

**SÁNCHEZ, L., et al.** Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas. CropLife Latin America. Croplifela. 2003, pp. 20.

<http://www.croplifela.org/es/plaga-del-mes.html?id=472>

2014- 11- 05

**SANDOVAL, Martha, & CUCA, Luis.** Identificación de metabolitos secundarios de *Brosimum rubescens* (Moraceae), determinación de actividad antimalárica. (Ciencia Amazónica). Vol. 1, N° 33. 2007, Colombia, pp. 1-3.

[file:///C:/Users/Personal/Downloads/6153-3897-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Personal/Downloads/6153-3897-1-PB%20(1).pdf)

2007-03-15

**STEEL, Christopher., et al.** Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*): differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase

genes in response to wounding (PubMed Central PMC). Vol. 116, N° 16. Pullman, Washington. 1998, pp. 1498-1503.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9536068>

2014-12-14

**SUÁREZ, Liliana., & RANGEL, Alba.** Aislamiento de microorganismo para el control biológico de *Moniliophthora roreri* (Open Journal Systems). Vol. 45, N° 26-85. Palmira-Colombia. 2013, pp. 1.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169930016012>

2014-10-16

**SUÁREZ, Carmen., et al.** Manual del cultivo de Cacao. 2<sup>da</sup> ed. Quevedo – Ecuador. INIAP. 1993, pp. 59-70.

[https://books.google.com.ec/books?id=UoYZAQAAMAAJ&printsec=frontcover&dq=%29.+Manual+del+cultivo+de+Cacao,+INIAP.&hl=es&sa=X&ei=m9zSVJumNMy6ggSr1IKIDQ&ved=0OCBsQ6AEwAA#v=onepage&q=\).%20Manual%20del%20cultivo%20de%20Cacao%2C%20INIAP.&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=UoYZAQAAMAAJ&printsec=frontcover&dq=%29.+Manual+del+cultivo+de+Cacao,+INIAP.&hl=es&sa=X&ei=m9zSVJumNMy6ggSr1IKIDQ&ved=0OCBsQ6AEwAA#v=onepage&q=).%20Manual%20del%20cultivo%20de%20Cacao%2C%20INIAP.&f=false)

2014-10-16

**TEJADA, Marcelo., et al.** SANDE: Manual de descripción general de especies de bosque secundario. Esmeraldas- Ecuador. Cromafors. 2010, pp. 4,5.

<http://comafors.org/wp-content/uploads/2010/05/sande.pdf>

2015-01-12.

**THURSTON, David.** Enfermedades de cultivos en el trópico. Turrialba- Costa Rica, American Phytopathological Society CATIE. 1889, pp. 148-150.

<https://books.google.com.ec/books?id=bzAMDrMBuFwC&pg=PA148&dq=Enfermedades+de+cultivos+en+el+tr%C3%B3pico+MONILIOPHTHORA&hl=es&sa=X&ei=h0nSVPHcJcKHsQTMvoGADw&ved=0CCYQ6AEwAA#v=onepage&q=Enfermedades%20de%20cultivos%20en%20el%20tr%C3%B3pico%20MONILIOPHTHORA&f=false>

2014-10-15

**TORRES, Magdiel.** Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México. (Tesis). (Doctor en Ciencias). Colegio de Postgraduados. Montecillo- México. 2010, pp. 3-19.  
[http://www.academia.edu/2285634/Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis \*Moniliophthora roreri\* Cif y Par. Evans et al. del cacao \*Theobroma cacao\* en Tabasco M%C3%A9xico](http://www.academia.edu/2285634/Progreso_temporal_y_manejo_integrado_de_la_moniliasis_Moniliophthora_roreri_Cif_y_Par._Evans_et_al._del_cacao_Theobroma_cacao_en_Tabasco_M%C3%A9xico)

2015- 01- 05

**URQUHART, D.H.** Cacao. Santa Cruz- Costa Rica. SIC. 1993, pp. 188,189.

**VILLAFUERTE, Paola.** Factores predisponentes para la intoxicación de fosforados en el Hospital General de Latacunga. (Tesis). (Médico general). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Facultad de Salud Publica. Escuela de Medicina. Latacunga- Ecuador. 2010. pp. 11-13.

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1900/1/94T00079.pdf>

2014-10-14

**VILLAVICENCIO, Miriam., & JIMÉNEZ, M.** Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias Ecuatorianas. Guayaquil- Ecuador. 2010, pp. 1-9.

<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10957/1/Caracterizaci%C3%B3n%20morfol%C3%B3gica%20y%20patog%C3%A9nica.pdf>

<http://core.ac.uk/download/pdf/12401248.pdf>

2014-12-01

**VINDAS, Leticia.** Uso de agroquímicos se incrementará un 33% en América Latina. Costa Rica. *El Financiero*. 2014. p.1.

<http://www.elfinancierocr.com/ambiente/noticias/uso-de-agroquimicos-se-incrementara-un-33-porciento-en-america-latina>

2014-10-05

**VOGT, V., et al.** Antifungal activity in vitro and in vivo of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus (Elsevier: Industrial Crops and Products). Vol. 42, N° 42. Latin America, 2012, pp. 1-6.

<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.org/science/article/pii/S0926669012003317>

2015-01-16

**WAGNER, H., & BLADT, S.** Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas. 2<sup>da</sup> ed. Berlin-New York. Springer. 2001, pp.

**ZAMORA, Francisco., et al.** . Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo (Agrociencia). Vol. 2, N° 2. 2008, Jalisco- México, pp. 1.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952008000200006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952008000200006&script=sci_arttext)

2014-10-16

**WOOD, G.** *Cacao* . Veracruz- México. Continental. 1982, pp. 178,179.

**ZHANG, Li., et al.** Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia rupestris* with cytotoxic, antibacterial and antifungal activities (Elsevier: Fitoterapia ). Vol. 97, N° 142. 2014, China, pp. 1-3.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X14001488>

2015-01-16

**ZHAO, Hu-Cheng., & WANG, JING-Bo.** The accumulation of phytoalexin in cucumber plant after stress (Elsevier: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces). Vol.43, N°43. China, 2005, pp. 1-4

<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.org/science/article/pii/S0927776505001220>

2015-01-12

## ANEXOS

### ANEXO A. RANGO DE COLORES ESPECIFICADO EN LOS TRABAJOS REALIZADOS POR PHILLIPS-MORA (2006) PARA AISLAMIENTOS DE *M.roreri*.

Número	Color
1	Café claro
2	Café claro- blanco
3	Café oscuro- café claro- blanco
4	Crema- café oscuro- café blanco- blanco
5	Café oscuro- blanco
6	Café oscuro- crema- blanco
7	Crema- café claro- blanco

## ANEXO B. ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y PORCENTAJE EN MASA DE SÓLIDOS SOLUBLES

TABLA 2. Índice de refracción y porcentaje en masa de sólidos solubles (sacarosa) correspondiente

Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (Sacarosa)	Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (Sacarosa)	Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (sacarosa)	Índice de Refracción	Contenido de sólidos solub. (Sacarosa)
$n_D^{20}$	o/o (m/m)						
1,333 0	0	1,367 2	22	1,407 6	44	1,455 8	66
1,334 4	1	1,368 9	23	1,409 6	45	1,458 2	67
1,335 9	2	1,370 6	24			1,460 6	68
1,337 3	3	1,372 3	25	1,411 7	46	1,463 0	69
1,338 8	4			1,413 7	47	1,465 4	70
1,340 3	5	1,374 0	26	1,415 8	48		
		1,375 8	27	1,417 9	49	1,467 9	71
1,341 8	6	1,377 5	28	1,420 1	50	1,470 3	72
1,343 3	7	1,379 3	29			1,472 8	73
1,344 8	8	1,381 1	30	1,422 2	51	1,475 3	74
1,346 3	9			1,424 3	52	1,477 8	75
1,347 8	10	1,382 9	31	1,426 5	53		
		1,384 7	32	1,428 6	54	1,480 3	76
1,349 4	11	1,386 5	33	1,430 8	55	1,482 9	77
1,350 9	12	1,388 3	34			1,485 4	78
1,352 5	13	1,390 2	35	1,433 0	56	1,488 0	79
1,354 1	14			1,435 2	57	1,490 6	80
1,355 7	15	1,392 0	36	1,437 4	58		
		1,393 9	37	1,439 7	59	1,493 3	81
1,357 3	16	1,395 8	38	1,441 9	60	1,495 9	82
1,358 9	17	1,397 8	39			1,498 5	83
1,360 5	18	1,399 7	40	1,444 2	61	1,501 2	84
1,362 2	19			1,446 5	62	1,503 9	85
1,363 8	20	1,401 6	41	1,448 8	63		
		1,403 6	42	1,451 1	64		
1,365 5	21	1,405 6	43	1,453 5	65		

## ANEXO C. EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DE LA INVESTIGACIÓN.



**Fotografía 7-3.** Materia prima: Látex de sande (*Brosimum utile*)



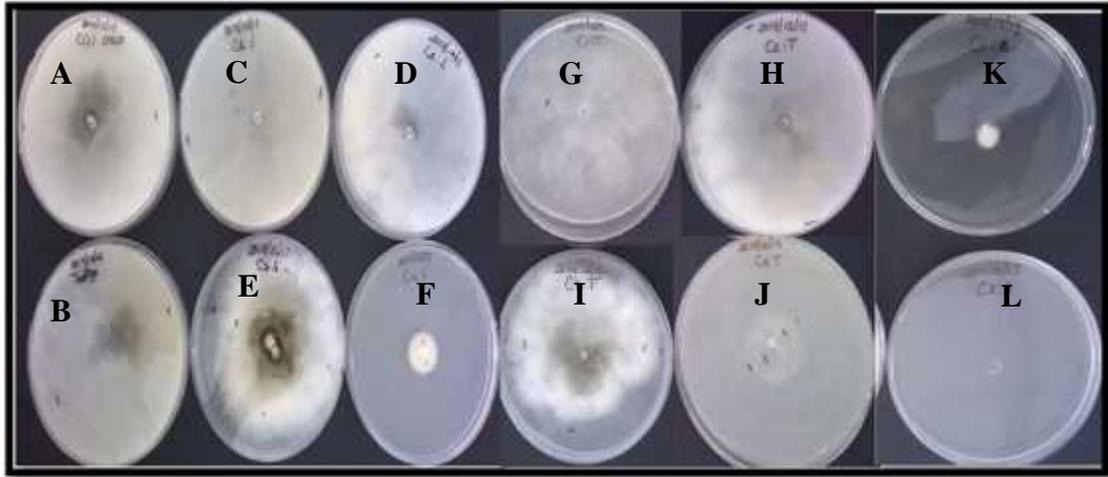
**Fotografía 8-3.** Tamizaje fitoquímico del látex de sande (*Brosimum utile*)



**Fotografía 9-3.** Extracción de terpenos del látex de (*Brosimum utile*): A) filtración de extracto metanólico, B) residuo del filtrado metanólico, C) filtración de extracto hexánico, D) extracto hexánico, E) ensayo de Liebermann- Burchard del extracto hexánico.



**Fotografía 10-3.** Extracción de alcaloides del látex de (*Brosimum utile*): A) filtración de la solución ácida de látex, B) Extracción con éter etílico, C) Alcalinización con  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta pH 9, D) Extracción con cloroformo, E) Concentración del extracto clorofórmico al vacío, G) Tamizaje fitoquímico para alcaloides en el extracto clorofórmico, H) Test de Markis .



**Fotografía 11-3.** Evaluación antifúngica *in vitro* en *Moniliophthora roreri* mediante el método de dilución con suspensión de esporas. (A) Control positivo (DMSO), (B) testigo (NaCl 85%), concentración 1, 2, 3 y 4 de extracto total de látex (C, D, E, F), concentración 1, 2, 3 y 4 extracto terpénico G, H, I, J), concentración 1 y 2 del extracto alcaloide de látex (K, L)