

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



**FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS
AMBIENTALES**

ESCUELA DE DESARROLLO INTEGRAL AGROPECUARIO

“Obtención de extracto de barbasco (*Thephrosia sinapou*), para su evaluación
potencial como agente nematocida en tomate (*Cyphomandra betacea*)”

Tesis de grado previa la obtención del título
de Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario

AUTOR: Rommel Rolando Fuel Ibujes

ASESOR: Ing. Héctor Chuquín

TULCÁN - ECUADOR

AÑO: 2015

CERTIFICADO.

Certifico que el estudiante Rommel Rolando Fiel Ijujes con el número de cédula 0401388145 ha elaborado bajo mi sustentación de grado titulada: "Obtención de extracto de barbasco (*Thephrosia sinapou*), para su evaluación potencial como agente nematocida en tomate (*Cyphomandra betacea*)".

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el reglamento de Grado del Título a Obtener, por lo tanto, autorizo la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.



Ing. Héctor Chuquín

Tulcán, 13 de Abril de 2015

AUTORÍA DE TRABAJO.

La presente tesis constituye requisito previo para la obtención del título de Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario de la Facultad de Industrias Agropecuarias Y Ciencias Ambientales

Yo, Rommel Rolando Fuel Ibujes con cédula de identidad número 040138814-5 declaro: que la investigación es absolutamente original, autentica, personal y los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.



.....
Rommel Rolando Fuel Ibujes
Tulcán, 13 de Abril de 2015

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS DE GRADO.

Yo Rommel Rolando Fuel Ibujes, declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la resolución del Consejo de Investigación de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi de fecha 21 de junio del 2012 que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional de la Universidad".

Tulcán, 13 de Abril de 2015



Fuel Ibujes Rommel Rolando

CI 0401388145

AGRADECIMIENTO.

Agradezco en primer lugar a Dios, a mi Director de Tesis Ing. Héctor Chuquín quien a lo largo de este tiempo me ha ayudado en el desarrollo y culminación del proyecto de tesis.

Agradezco a todas aquellas personas que han vivido junto a mí, estos años de estudio principalmente a mi madre quien a lo largo de toda mi vida me ha apoyado.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia, enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa y noble Universidad (UPEC) la cual me abrió sus puertas, para prepararme como un profesional competitivo ante de trabajo.

DEDICATORIA.

Dedico este proyecto de tesis a Dios, a mi madre, abuela y a mi hija. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mi madre, quien a lo largo de mi vida ha velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad.

A mi hija, por ser aquella personita que me motiva día a día con sus sonrisas y cariño.

A mi hermana, por darme ánimo a seguir adelante a ser cada día mejor y luchar por lo que un día me propuse ser. Los amo con mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICADO.....	ii
AUTORIA DE TRABAJO.....	iii
ACTA DE CESION DE DERECHOS DE TESIS DE GRADO.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS, GRAFICOS, FOTOGRAFIASx.....	viii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xix
EXECUTIVE SUMMARY.....	x
INTRODUCCION.....	xi
I. PROBLEMA.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3. DELIMITACIÓN.....	2
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.5. OBJETIVOS.....	5
1.5.1.Objetivo General.	5
1.5.2. Objetivos Específicos.	5
II FUNDAMENTACION TEORICA.....	6
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	6
2.2. FUNDAMENTACIÓN LEGAL.....	9
2.3. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA.....	10
2.4. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA.....	10
2.5. VOCABULARIO TECNICO.....	25
2.6. HIPÓTESIS.....	26
2.6. VARIABLES.....	27
2.6.1 Variable Dependiente.....	27
2.6.2. Variable Independiente.....	27
III. METODOLOGIA.....	30
3.1. MODALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN.....	28
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	28

3.3 POBLACION Y MUESTRA	29
3.3.1. Ensayo "A"	29
3.3.2. Ensayo "B"	29
3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	30
3.5. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.....	31
3.5.1. Información bibliográfica.....	31
3.5.2. Información procedimental.....	31
3.5.3. Factores y tratamientos de estudio del Ensayo (A y B) estudio.....	32
3.5.5. Descripcion del Diseño- Experimental.....	36
3.5.6. Variables a evaluar.....	38
3.5.7. Métodos Específicos del Manejo del Ensayo.....	38
3.5.7.4. Fase experimental en la U.P.E.C. especialmente en el laboratorio de Fitopatología.....	40
3.5.7.5. Fase experimental en las instalaciones de la agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del Agro- Agrocalidad, especialmente en los laboratorios de Nematología.....	48
3.5.7.6. Evaluación de los Extractos (etéreo, etanólico y acuosa), con sus respectivos testigos (químico, absoluto y blanco) in vitro a 23°C.....	53
3.6 PROCESAMIENTO, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS.....	56
3.6.1. Selección del tejido vegetal (raíz), presente en el barbasco (<i>Thephrosia sinapou</i>).....	56
3.6.2. Rendimiento de extracción (etérea, etanólica y acuosa), mediante la metodología de (secado, triturado, macerado, filtrado y rotavaporado).....	56
3.6.4. Obtención de las dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima), de los extractos (etéreo etanólico y acuoso), con sus respectivas testigos (químico, blanco y absoluto).....	60
3.6.5. Identificación y aislamiento del nemátodo agallador (<i>Meloidogyne spp</i>), presente en la raíz del tomate de árbol (<i>Cyphomandra betacea</i>).....	68
3.6.6. Evaluación de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), con sus respectivos testigos (químico, absoluto y blanco), sobre <i>Meloidogyne spp</i> , en tomate de árbol <i>Cyphomandra Betacea</i>	70
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	85
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	87
VI. ANEXOS.....	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Delimitación del primer ensayo.....	2
Cuadro 2: Delimitación del segundo ensayo.....	3
Cuadro 3: Jerarquía taxonómica de Barbasco de raíz.....	11
Cuadro 4 Operacionalización de variables.....	30
Cuadro 5: Extractos; etéreo, etanólico y acuoso y su dosis de aplicación <i>in vitro</i>	33
Cuadro 6: Factores en estudio para el Ensayo “B”.....	33
Cuadro 7: Respectivos solventes orgánicos de extracción (Factor A).....	34
Cuadro 8: Dosis letales aplicadas en condiciones <i>in vitro</i> sobre nemátodos del género <i>Meloidogyne spp</i> (Factor B).....	34
Cuadro 9: Tiempos de exposición de los extractos sobre los nemátodos en condiciones <i>in vitro</i> (Factor C).....	34
Cuadro 10: Tratamientos para evaluar la eficacia de los extractos sobre los nemátodos del género <i>Meloidogyne spp</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i> a 23 °C.....	35
Cuadro 11: Características del ensayo.....	37
Cuadro 12: Esquema del análisis Estadístico.....	37
Cuadro 13: Prueba de significación Tukey al 5% para el rendimiento de los diferentes extractos utilizados en los diferentes tratamientos.....	56
Cuadro 14: Características físicas y químicas de los solventes utilizados para el proceso de extracción vegetal.....	58
Cuadro 15: Características físicas y químicas de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso) <i>in vitro</i>	59
Cuadro 16: Componentes de la solución madre etérea.....	60
Cuadro 17: Dosis Letales del extracto etéreo <i>in vitro</i>	61
Cuadro 18: Componentes de la solución madre etanólica.....	62
Cuadro 19: Dosis Letales etanólicas <i>in vitro</i>	63
Cuadro 20: Dosis Letales del extracto acuoso <i>in vitro</i>	65
Cuadro 21: Dosis Letales del testigo blanco (etanol 96%) <i>in vitro</i>	66
Cuadro 22: Dosis letales del testigo químico y absoluto <i>in vitro</i>	67
Cuadro 23: ADEVA para el análisis del efecto Nematicida.....	71
Cuadro 24: Prueba de significación Tukey al 5% para cada uno de los tratamientos y la acción del efecto Nematicida.....	72
Cuadro 25: Prueba de significación Tukey al 5% para el tipo de Extracto.....	73

Cuadro 26: Efecto nematicida del extracto etéreo, sobre el nemátodo agallador <i>Meloidogyne spp</i> , en condiciones <i>in vitro</i> a 23 °C.....	74
Cuadro 27: Efecto nematicida del extracto etanólico, sobre el nemátodo agallador <i>Meloidogyne spp</i> , en condiciones <i>in vitro</i> a 23°C.....	76
Cuadro 28: Efecto nematicida del extracto acuoso, sobre el nemátodo agallador <i>Meloidogyne spp</i> , en condiciones <i>in vitro</i> a 23 °C.....	78
Cuadro 29: Prueba de significación Tukey al 5% para el tipo de extracto, tipo de concentración y su relación con los diferentes tiempos empleados en el efecto Nematicida.....	80

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafica 1: Métodos de Extracción de nemátodos.....	18
Grafico 2: Métodos de extracción vegetal.....	23
Gráfica 3: Diagrama de bloques para la preparación de la muestra a partir de la raíz de barbasco.....	41
Grafico 4: Diagrama de bloques para la obtención del extracto etéreo y etanólico con el uso del solvente (éter al 100% y etanol al 96%).....	43
Grafico 5: Diagrama de bloques para la obtención del extracto acuoso.....	46
Grafico 6: Diagrama de bloques para la obtención del inóculo de <i>Meloidogyne spp</i>	49
Gráfico 7: Diagrama de bloques para la identificación y captura de nematodos móviles.....	51
Grafico 8: Diagrama de bloques para la evaluación de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), con sus respectivos testigos (químico, absoluto y blanco) <i>in vitro</i>	53
Gráfico 9: Rendimiento en la obtención de los extractOs (etéreo, etanólico y acuoso).....	57
Grafico 10: Índice de agallamiento en base a una escala de severidad de 0 a 6.....	68
Gráfico 11: Tipos de extractos, con sus respectivos testigos, utilizados para evaluar el efecto Nematicida.....	73
Gráfico 12: Efecto nematicida en el extracto etéreo <i>in vitro</i> a 23 ° C.....	75
Gráfico 13: Efecto nematicida en el extracto etanólico <i>in vitro</i> a 23 ° C.....	77
Gráfico 14: Efecto nematicida en el extracto acuoso <i>in vitro</i> a 23 ° C.....	79
Gráfico 15: Efecto Nematicida en cada extracto.....	81

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1: Barbasco de raíz <i>Thephrosia sinapou</i> (Buc'hoz) A. Chev.....	11
Fotografía 2: Raíz de barbasco pulverizada en un molino eléctrico.....	42
Fotografía 3: Extracto etéreo seco y extracto etanólico blando.....	45
Fotografía 4: .Extracto acuoso de raíz de barbasco.....	48
Fotografía 5: Extracto re raíz de tomate de árbol con <i>Meloidogyne spp</i>	50
Fotografía 6: .Nemátodos del género <i>Meloidogyne spp</i> , presentes en la raíz de tomate de árbol <i>Cyphomandra Betacea</i>	52
Fotografía 7: .Evaluación de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso) en condiciones <i>in vitro</i> , a 23 °C.....	55
Fotografía 8: Solución madre etérea diluido en etanol al 96%.....	61
Fotografía 9: Dosis Letales del extracto etéreo <i>in vitro</i>	62
Fotografía 10: Solución madre etanólica.....	63
Fotografía 11: .Dosis Letales del extracto etanólico <i>in vitro</i>	64
Fotografía 12 Dosis Letales del extracto acuoso <i>in vitro</i>	65
Fotografía 13: Dosis Letales del testigo blanco (etanol 96) <i>in vitro</i>	66
Fotografía 14: .Dosis Letal del testigo químico (Rotenona) <i>in vitro</i>	67
Fotografía 15: Sistema radicular de plantas de tomate de árbol con nemátodos del género <i>Meloidogyne spp</i>	69
Fotografía 16: Nemátodo del género <i>Meloidogyne spp</i> , estadio J2 presente en la raíz de tomate de árbol <i>Cyphomandra betacea</i>	70

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Presupuesto.....	91
ANEXO2: Cronograma.....	93
ANEXO 3: Recolección y preparación material de la raíz de barbasco, <i>Thephrosia Sinapou</i>	94
ANEXO 4: Obtención del extracto (etéreo, etanólico), utilizando como solvente orgánico éter al 100% y etanol al 96%.....	95
ANEXO 5: obtención del extracto acuoso utilizando como solvente orgánico agua destilada.....	96
ANEXO 6: Obtención de extracto de raíz de tomate de árbol <i>Cyphomandra betaceae</i>	97
ANEXO 7: Evaluación de los extractos; etéreo, etanólico y acuoso, con sus respectivos testigos; químico, absoluto y blanco <i>in vitro</i>	98

RESUMEN EJECUTIVO

Se evaluaron tres extractos vegetales, para el control de larvas de *Meloidogyne spp*, en condiciones *in vitro*. Estos extractos fueron obtenidos de la raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*). Los extractos etéreo y etanólico se prepararon macerando 50 g de raíz triturada en 350 mL de solvente orgánico (éter etílico y etanol) durante 24 h, a temperatura ambiente $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, seguidamente se filtró y se recuperó el solvente utilizando un rotavapor, se etiquetó y se refrigeró a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior aplicación *in vitro*. El extracto acuoso se preparó utilizando 50 g de raíz fresca en 350 mL de agua destilada, posteriormente se trituró, licuó y maceró durante 48 h, a temperatura ambiente $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, seguidamente se filtró y rotaevaporó, finalizando con su etiquetado y refrigerado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para su posterior uso *in vitro*. Los extractos etéreos y etanólicos diluidos en etanol al 96% fueron designados como dosis letal alta. Estas dosis madre, fueron diluidas en agua destilada para obtener dosis letales (Media, Baja y Mínima). Por cada dosis, repetida 4 veces, se utilizaron 20 larvas para un total de 80 nemátodos. Las observaciones de mortalidad se realizaron a las 6, 12, 24 y 48 h. los extractos etéreos y etanólico presentaron una similar diferencia estadística con su testigo blanco (etanol) cuyas concentraciones (Alta y Media), presentaron una mortalidad de (85 a 100%) entre 24 a 48 h de exposición *in vitro*. Estos valores son significativamente menores al porcentaje de mortalidad que presentó el testigo químico (Rotenona), que fue de 100% a la primeras 6h, diferencia superior a la que tuvo el extracto acuoso, con una mortalidad de 65 % a las 48 h. que presentaron un efecto nematicida superior frente al testigo absoluto (agua destilada) que obtuvo una eficiencia muy reducida como nematicida de 10%, con respecto a los anteriores tratamientos. La actividad demostrada por *Thephrosia sinapou* permite proponer continuar con otros estudios en invernadero y campo para conocer su efectividad en el suelo.

EXECUTIVE SUMMARY

Three plant extracts were evaluated for control of *Meloidogyne* spp, under in vitro conditions. These extracts were obtained from the root of mullein (*Thephrosia sinapou*). The ether and ethanolic extracts were prepared by macerating 50 g of crushed root in 350 mL of organic solvent (ethyl ether and ethanol) for 24 h, at room temperature 15 ± 2 ° C, then filtered and the solvent was recovered using a rotary evaporator, He was labeled and refrigerated at 4 ° C for further application in vitro. The aqueous extract was prepared using 50 g of fresh root in 350 mL of distilled water, then triturated, liquefied and macerated for 48 h, at room temperature 15 ° C \pm 2, then filtered and rotaevaporó, ending with labeling and cooled at 4 ° C, for subsequent use in vitro. The ether and ethanol extracts diluted in 96% ethanol were designated as high lethal dose. These stem doses were diluted in distilled water to obtain lethal doses (Medium, Low and Low). Per dose and repeated 4 times, 20 larvae were used for a total of 80 nematodes. The mortality observations were performed at 6, 12, 24 and 48 h. the ether and ethanol extracts showed a similar statistical difference in her white control (ethanol) whose concentrations (high and medium), presented a mortality (85-100%) between 24-48 h of exposure in vitro. These values are significantly lower than the mortality rate presented by the chemical control (Rotenone), which was 100% in the first 6h, difference superior to the one I had the aqueous extract, with a mortality of 65% after 48 h. that displayed nematicide effect against absolute control (distilled water) obtained a very low efficiency as nematicide 10% compared to previous treatments. The activity demonstrated by *Thephrosia sinapou* can propose to continue with other greenhouse and field studies to determine its effectiveness on the ground.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae.*), es uno de los frutales con una excelente perspectiva comercial para el mercado nacional e internacional (Ramirez, 2009). Una de sus principales limitantes en su producción es el nemátodo agallador *Meloidogyne spp.* (Cantuña N. , 2013). Este tipo de nemátodos genera pérdidas de alrededor de un 20 % en la producción (Lopez, 2009), y con un estimado de \$500.00 millones invertidos para el control de este nemátodo (Farban & Zambrano, 2010).

El nemátodo agallador *Meloidogyne spp.*, invade las raíz de su hospedero y penetra en el interior del tejido vascular vegetal (raíz de tomate), produce cambios fisiológicos y morfológicos que impiden a la planta la absorción de agua y nutrientes esenciales para su normal desarrollo (Sandoval & Lomas, 2007). En Ecuador el método de control más utilizado es el uso de nematicidas químicos, que además de costosos son altamente tóxicos (Lopez, 2009). Esto indica la importancia de la investigación de extractos vegetales, con criterios ecológicos y económicos, que desarrollen un control con efecto nematicida o nemostático.

En el reino vegetal se producen metabolitos como fenoles, terpenoides alcaloides, acetilenos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, entre otros, con propiedades insecticidas, acaricidas y nematicidas (Naveda, 2010). El uso de solventes orgánicos como agua, alcohol, éter etílico, aceites, cetonas y benceno, permite aprovechar estos metabolitos mediante técnicas tradicionales y no tradicionales de extracción (Sharapin, 2000).

Los extractos botánicos que han sido reportados con propiedad nematicida son; *M. acuminata* y *M. balbisiana* (Arboleda. F, 2012), *Phaseolus* (Parada & Guzman, 1997), *vulgaris Quassia amara* y *Brugmancia suaveolens* (Salazar & Guzman, 2014) *Choenocaulon officinale* (Vinueza. S, 2006) y *Ricinus communis L.* (Arboleda. F, 2012). Esto confirma la diversidad de investigaciones para encontrar principios

activos con acción selectiva dentro de cada clase de plaga, cuyos tejidos vegetales a utilizar provengan de recursos renovables naturales.

En este sentido, el objetivo de este estudio fue el de evaluar *in vitro* la posible acción nematicida de los extractos; etéreo, etanólico y acuoso de raíz de barbasco *Thephrosia sinapou*, sobre el nemátodo agallador *Meloidogyne spp*, considerado como el género más importante en Ecuador, debido a que afecta a un sin número de cultivos de cultivos tanto de ciclo corto como perennes.

I. EL PROBLEMA.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Según el centro de Información e Inteligencia Comercial “CICO”, en el Ecuador las provincias donde se cultivan el tomate de árbol son: Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Cañar, Azuay y Loja, en una capacidad productiva de 14748 ha, siendo Tungurahua la provincia que más produce con 8300 ha. (Ramirez, 2009).

Los nemátodos agalladores del género *Meloidogyne spp*, producen problemas patológicos como lo es la dormidera o marchitez, en tomate de árbol *Cyphomandra betacea* (Lopez, 2009). Esto involucra una pérdida productiva significativa para los agricultores que se dedican a esta actividad.

Los métodos más utilizados para el control de nemátodos fitoparásitos, ha sido la aplicación de productos químicos sintéticos, pertenecientes a la familia de los organofosforados o carbamatos. (Arboleda. F, 2012). Estos productos han generado un desequilibrio en los ecosistemas, provocando resistencia de los patógenos, además de eliminar a los enemigos naturales presentes en el suelo. (Cantuña N. , 2013). Además de causar la muerte en humanos y animales por intoxicación, su uso excesivo incrementa los costos de producción.

Actualmente muchos extractos naturales pueden remplazar muchos plaguicidas sintéticos como una alternativa ecológica y que cada vez es más exigida por la legislación nacional y mundial (Hinojosa W. , 2011). Aún son limitados la cantidad de estudios que permitan controlar las diversas plagas y enfermedades que van adquiriendo un grado de resistencia mayor conforme al uso no adecuado de agroquímicos en los cultivos.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

La falta de un estudio para la “Obtención de extracto de barbasco (*Thephrosia sinapou*), utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente (éter, etanol y agua)”, no ha permitido su evaluación potencial como agente nematocida en tomate (*Cyphomandra Betacea*).

1.3. DELIMITACIÓN.

Geográficamente, la investigación se llevó a cabo, en dos sitios diferentes. El primer ensayo se desarrolló en la parroquia Tulcán, del cantón Tulcán, perteneciente a la provincia del Carchi, en los laboratorios de Fitopatología de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, donde se obtuvo los extractos de raíz de barbasco (etéreo, etanólico y acuoso), cuyas raíces fueron extraídas de la zona montañosa de la comunidad de Quinshull, ubicada al nor-occidente de la Provincia del Carchi, cantón Tulcán, Parroquia de Maldonado. Esta fase corresponde al área Agroindustrial. Las características climatológicas de la zona donde se ubica el laboratorio de fitopatología, según la Dirección de Aviación Civil de Tulcán, aeropuerto Luis A. Mantilla son las siguientes; (Cuadro 1).

Cuadro 1: Delimitación del primer ensayo.

Latitud:	00° 48.8' N
longitud:	77° 42.4' W
Altitud:	2950 m.s.n.m.
Temperatura:	12.1°C
Presión atmosférica:	0.7174 atm.
Humedad relativa media:	79 %
Precipitación media anual:	75.2 mm.
Viento del norte intensidad:	8 Km/h
Temperatura máxima media:	24.2 °C
Temperatura mínima media:	0.2 °C

Fuente: Aeropuerto de Tulcán 2013

El segundo ensayo, se desarrolló en la parroquia de Tumbaco, del cantón Quito, perteneciente a la provincia de Pichincha, específicamente en los laboratorios de Nematología de Agrocalidad, ubicado en la Av. Interoceánica Km. 141/2, La Granja MAGAP, donde se evaluó el efecto nematicida y/o nemostático de los extractos de raíz de barbasco (etéreo, etanólico y acuoso), esta fase comprende al área Agrícola. Las características climatológicas de la zona, donde se ubica el laboratorio de nematología, según el INAMHI, son las siguientes (Cuadro 2):

Cuadro 2: Delimitación del segundo ensayo.

Latitud:	00° 13.0' N
Longitud:	78° 24.40 W
Altitud:	2536 m.s.n.m.
Temperatura:	17.0°C
Presión atmosférica:	0.7174 atm.
Humedad relativa media:	86.1%
Precipitación media anual:	900 mm.
Viento del norte intensidad:	11Km/h
Temperatura máxima media:	18.3°C
Temperatura mínima media:	16.8 °C

Fuente: Anuarios Meteorológicos INAMHI

1.4. JUSTIFICACIÓN.

La presente investigación se desarrolló en el marco de proyectos establecidos por la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, considerando que: la Constitución del Ecuador (2008), manifiesta que el Sistema de Educación Superior tiene como finalidad la formación académica y profesional con visión científica y humanista; la investigación científica y tecnológica, la innovación, promoción, desarrolló y difusión

de los saberes y las culturas; la construcción de soluciones para los problemas del país, en relación con los objetivos de desarrollo (Art.350).

El cultivo de *Cyphomandra betacea* es más productivo durante los 3 primeros años, alcanza rendimientos entre 40.000 – 50.000 kg/ha/año, con enfoque ecológico para potencializar la posibilidad de exportación de este interesante fruto andino, que cumpla los parámetros fitosanitarios exigidos por los mercados internacionales,(Ramirez, 2009). Este estudio brinda la oportunidad a los agricultores de realizar un control de plagas de una manera eficaz y eficiente con el uso de un tratamiento orgánico natural.

Las maneras de aprovechar los metabolitos secundarios es mediante la preparación de sus tejidos en extractos vegetales o infusiones utilizando diferentes solventes como agua, alcohol, éter etílico, aceites, cetonas y benceno. (CORPOICA, 2007). Estos componentes son una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Lizcano, 2008). Además, poseen la capacidad para adherirse fuertemente a los anfidios de los nemátodos fitoparásitos como *Meloidogyne spp*, modificando su comportamiento quimiotáctico. (Vegas, Crozzoli, & Perichi, 2010). Estos compuestos de origen vegetal tienen la ventaja de ser más seguros para el ambiente y la salud humana que sus contrapartes sintéticas y adicionalmente son considerados no persistentes en el campo.

El tema de investigación “Obtención de extracto de barbasco *Thephrosia sinapou*, para su evaluación potencial como agente nematocida en tomate *Cyphomandra betacea*”, tiene gran importancia puesto que permite implementar nuevas alternativas, tradicionales y no tradicionales de extracción de componentes y principios activos de plantas nativas presentes en nuestra región, creando un incentivo para erradicar el uso inadecuado que se le da a los productos químicos para el control fitosanitario, mediante un manejo y control eficiente a un menor costo, sin contaminar el ambiente y obtener cultivos sanos y cosechas productivas.

1.5. OBJETIVOS.

1.5.1. Objetivo General.

- Obtener extracto de barbasco (*Thephrosia sinapou*), utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente (éter, etanol y agua), que permita su evaluación potencial como agente nematocida en tomate (*Cyphomandra betacea*).

1.5.2. Objetivos Específicos.

- Fundamentar bibliográficamente los conceptos de metodologías de extracción y potencial nematocida de productos naturales.
- Determinar las metodologías y los procesos para el desarrollo de la investigación *in vitro*.
- Establecer un diseño experimental que permita medir las variables en estudio.
- Determinar el poder nematocida del extracto de barbasco

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.

Esta investigación se realizó en la Universidad Estatal Amazónica en la Facultad Agroforestal por parte de los autores; Ing. Deisy Torres, Dr. Uvaldo, Dr. Maria Brito y Dr. Elena Cordero. La presente investigación demostró un “Estudio de la extracción de follaje de Barbasco (*Lonchocarpus nicou*) como fuente biocida (en condiciones de la Amazonia en Ecuador)”. Mediante un análisis fitoquímico practicado a las raíces y el follaje de barbasco (*Lonchocarpus nicou*), reveló la presencia de flavonoides en las raíces y hojas, este compuesto fue detectado en el extracto etanólico de las hojas. Se determinó que el secado en estufa con temperatura controlada en raíces y hojas influye significativamente en la obtención del extracto, cuyo resultado se presentan propiedades biocidas con una descripción físico –química a partir del follaje de barbasco (*Lonchocarpus nicou*). Esta investigación propone un procedimiento para la obtención de un extracto con propiedades biocidas a partir del follaje de barbasco.

Esta investigación se realizó en la Universidad Central de Venezuela en la Facultad de Agronomía por parte de los autores; Sally Vinueza, Renato Crozzoli y Guillermo Perichi, para obtener el título de Ing. Agrónomo en el año 2006. La presente investigación demostró una “Evaluación *in vitro* de los extractos acuosos de plantas para el control del nemátodo agallador *Meloidogyne incognita*”. Los extractos de fruto verde de *Ricinus communis* en concentraciones de 32,64 y 100%, presentaron un índice de mortalidad de 98.9 % en sus tres concentraciones en un periodo de tiempo de 72 horas, respectivamente. Los extractos de inflorescencia de *Schoenocaulon officinale* a concentraciones de 32, 64 y 100%, obtuvieron un índice de mortalidad de 80,5, 84,1, y 100% después de 72 horas de exposición. Espigas y hojas de *Schoenocaulon officinale* en la concentración del 100% indujeron una mortalidad del 65.9 y 98.8 %, respectivamente después de 72 horas. El extracto acuoso de inflorescencia en una concentración del 100%, presentó un índice de mortalidad de 100%, después de 48 horas de exposición.

Esta investigación se realizó en la Universidad Técnica de Babahoyo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Escuela de Ingeniería Agropecuaria por parte de la autora; Vanessa Elizabeth Pino Meléndez para obtener el título de Ing. Agropecuario en el año 2010. Al evaluar el “Efecto de extractos vegetales en la reducción poblacional de *Meloidogyne spp.*, *Rotylechulus reniformis* y *Pratylenchus spp.*, en tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*)”. En cuanto a la efectividad entre un nematicida orgánico vs nematicida químico, este último es el más alto en efectividad y en costo beneficio, pero ambos tienen efectividad en el control de nemátodos. Se ha comprobado que muchos nematicidas de origen orgánico tienen una óptima capacidad para controlar nemátodos, esta alternativa es semejante en efectividad como en costo beneficio de un nematicida químico. Por lo tanto, es recomendable realizar estudios e investigaciones sobre nematicidas que contengan propiedades naturales de control biológico, esto únicamente se logrará mediante estrategias con organizaciones de productores, que apliquen una nueva transferencia de tecnología que contenga un modelo ecológico cuya finalidad sea la de emprender y conservar un manejo sustentable.

Esta investigación se realizó en la Universidad de Caldas, en la Facultad de Ciencias Agrarias por parte de los autor; José Fernando Restrepo Henao, para obtener el título de Ing. Agrónomo en el año 2010. La presente investigación evaluó el “Efecto *in vitro* de extractos acuosos de higuera (*Ricinus communis Linneo*), sobre el nemátodo barrenador (*Raddopholus similis*), en condiciones *in vitro*”. El mayor efecto nematicida se encontró en los tratamientos con extractos acuosos de frutos, raíces, y hojas en la concentración del 100%, con valores entre 67 y 73%. Estos valores presentaron una diferencia significativa frente a los testigos químico con 98% de mortalidad y con respecto al testigo absoluto en un 3 % de mortalidad respectivamente. Al aumentar la concentración del extracto acuoso de cada tejido de higuera, la mortalidad aumenta como ocurrió con los extractos de frutos donde la mortalidad aumentó de 33 a 73% en las concentraciones del 25 y 100%, respectivamente. Las lecturas se las realizó cada 48 horas demostrando que los

extractos acuosos de los tejidos de higuera en las concentraciones evaluadas presentaron un efecto nematocida.

Esta investigación se realizó en la Universidad de Caldas, en la Facultad de Ciencias Agrarias por parte de los autores; Francisco Arboleda, Oscar Guzmán y Luis Fernando Mejía, para obtener el título de Ing. Agrónomo en el año 2012. Se realizó el estudio sobre el “Efecto de extractos cetónicos de Higuera (*Ricinus communis* Linneo), sobre el nemátodo barrenador (*Raddopholus similis*), en condiciones *in vitro*”. En los tres tiempos de lectura (48 horas), los extractos cetónicos de frutos, raíces, y hojas de higuera en la concentración del 100% tuvieron un efecto nematocida entre 73 y 89%, sin diferencias significativas al testigo químico que tuvo valores entre el 82 y 99%, sin embargo existió una diferencia significativa con el testigo absoluto que presentó valores menores entre 0.7 y 12%. Por lo tanto se concluye que los extractos cetónicos de frutos, raíces, y hojas de higuera en la concentración del 100% y entre tiempos diferentes de evaluación, tuvieron un efecto nematocida sobre el nemátodo barrenador *Raddopholus similis*, en condiciones *in vitro*, comportándose igual al testigo carbofuran después de 48 horas de haber sido aplicados.

Esta investigación se realizó en la Universidad Autónoma de Nicaragua en la Facultad de Ciencias Agrarias por parte de los autores; Wilber Salazar y Tomas Guzmán para obtener el título de Ing. Agropecuario en el año 2012. Se realizó el estudio sobre el “Efecto nematocida de extractos de *Quassia amara* y *Brugmancia suaveolens*, sobre *Meloidogyne spp*, asociado al tomate en Nicaragua”. Los resultados en el experimento *in vitro* demostraron que *Quassia amara*, y *Brugmancia suaveolens* diluidos al 10 %, presentaron los más altos porcentajes de mortalidad de 89 y 78 % de juveniles muertos, después de transcurridas las 48 horas de exposición respectivamente. Los resultados en el experimento en macetas demostraron que con el extracto de *Quassia amara*, existió una mortalidad del 80% con respecto al índice de agallamiento, y con el extracto de *Brugmancia suaveolens* demostró una mortalidad del 71%, con respecto al índice de agallamiento. Estos

resultados demostraron que ambos extractos poseen propiedades nematocidas, ya que redujeron significativamente las poblaciones de nemátodos, su reproducción y el nivel de agallamiento de las raíces de tomate.

2.2. FUNDAMENTACIÓN LEGAL.

Con el fin de dar cumplimiento al reglamento de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, la investigación está orientada con los objetivos que plantea la Constitución Nacional del Ecuador en el Plan Nacional del Buen Vivir, incluyendo los códigos orgánicos de la producción y al reglamento establecido por la UPEC, manifiesta:

Según la constitución de 2008, manifiesta: “Todas las instituciones de educación superior estarán obligadas a entregar las tesis que se elaboren para la obtención de títulos académicos de grado y pos grado en formato digital para ser integradas al Sistema Nacional de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor”.

Acorde al Plan Nacional de Desarrollo, denominado Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017, siendo el Instrumento del Gobierno Ecuatoriano para articular las políticas públicas con la gestión y la inversión pública, que en esta investigación se hace referencia a los siguientes objetivos: Mejorar la calidad de vida de la población, Garantizar los derechos de la naturaleza, promover un medio ambiente sano y sustentable, Afirmar y fortalecer la identidad nacional, las identidades diversas, la plurinacionalidad y la interculturalidad.

Acorde al Código Orgánico vigente en la ley de comercialización y empleo de plaguicidas, codificación 11; el MAGAP, ha señalado a AGROCALIDAD como la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. Por lo cual en el título VI, DEL EXPENDIO, USO, APLICACIÓN, MANEJO DE PLAGUICIDAS Y PRODUCTOS AFINES Y PROTECCION DE OPERARIOS.

Art. 22. Manifiesta que “El Ministerio de Agricultura y Ganadería recomendará el uso de plaguicidas y productos afines cuando no existan enemigos naturales de las

plagas a controlar o cuando su población sea muy baja y de acción poco significativa propendiéndose a la utilización de productos biodegradables”

La presente investigación pretende dar cumplimiento a lo estipulado en el reglamento 2012 de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi en cuanto a trabajo de investigación de tesis, graduación, titulación e incorporación, capítulo II del marco legal, artículo 2 que menciona la obligatoriedad de la tesis para la obtención del título profesional de tercer nivel, en referencia a los artículos 80 literal e y 144 de la ley orgánica de educación superior –LOES (UPEC, 2011).

2.3. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA.

La presente investigación se fundamenta filosóficamente en las teorías de Rudolf Steiner quien mantiene principios de una agricultura biodinámica en donde se busque la producción eficiente y efectiva a través de una simbiosis de controles naturales, conocida también como “Revolución Biológica” y la teoría de Fukuoka con sus ideas revolucionarias de una agricultura natural basada en la salud espiritual del individuo, a través de la sanación de la tierra y la purificación del espíritu humano, principios que adecuan y fundamentan la investigación ya que se pretende realizar un control de nemátodos a través de un agente orgánico 100 % natural que mitigue el problema de nemátodos en la producción del cultivo de Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) y no cause daño al ser humano y al ambiente.

2.4. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA.

2.4.1. Barbasco (*Thephrosia sinapou*).

Para el desarrollo de la investigación, se realizó una identificación taxonómica y morfológica de la planta conocida como Barbasco (*Thephrosia sinapou*), en el Herbario Nacional, ubicado en el cantón Quito, provincia de Pichincha (Fotografía 1).

Fotografía 1: Barbasco de raíz *Thephrosia sinapou* (Buc'hoz) A. Chev



Fuente: Fuel, R. (2015)

2.4.1.1. Jerarquía taxonómica.

Cuadro 3: Jerarquía taxonómica de barbasco de raíz.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabacea
Género	<i>Thephrosia</i>
N. científico	<i>Thephrosia sinapou</i>
N. común	barbasco de raíz

Fuente: (Rondon, 2002)

2.4.2. Descripción botánica.

Dentro de las características principales, las raíces semejan a nabos, cuyas raíces han sido utilizadas para la pesca. Las plantas presentan un sufrutice de tallo erecto, con una altura promedio de 1-3 m. Además presenta tallos tomentosos hacia las puntas, sus hojas son compuestas imparipinadas, hojuela lineal-oblonga. Las flores presentan un color blanco – amarillentas con manchas violáceas con una legumbre linear. (Rondon, 2002).

2.4.3. Partes usadas y principios activos de *Thephrosia sinapou*

Dentro de la fitoquímica las partes más usadas son raíz, tallo, hojas, por lo que toma gran importancia debido a las ventajas de los compuestos medicinales sobre la tradicional forma de utilización de las plantas a base de hierbas. (Dagne et al., 2012). En el descubrimiento de compuestos biológicamente activos, con la ayuda de la Etnofarmacología ha desarrollado investigaciones farmacológicas y fitoquímicas de la especie *Thephrosia* encontrando diferentes compuestos orgánicos que han sido aislados de los cuales algunos han sido probados para actividades biológicas y algunos desconocidos por su efecto. (Gahlot et al., 2012). Los principales compuestos presentes en la planta son; flavonoides, rotenoides, terpenoides y esteroides. Las funciones reportadas por este tipo de compuestos incluyen; antioxidante, larvicidas, insecticida, acaricida y actividad antialimentaria. (Touqeer & Ajaib, 2013) .Estos compuestos fenólicos presentes en la planta de barbasco presentan un sinnúmero de utilidades para el control de plagas y enfermedades en diferentes cultivos.

2.4.4. Tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*)

2.4.4.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del tomate de árbol según Calvo (2009), es la siguiente;

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie; *betaceum*

Nombre científico; *Solanum betaceum* Cav.

2.4.4.2. Descripción botánica

Es una planta arbustiva con tallos semileñosos, de follaje grande, alcanzando una altura promedio de 2 a 3 m. Las hojas son cordiformes (forma de corazón), carnosas, levemente pubescentes y muy grandes. Las flores son de color rosa y lavanda, agrupadas en racimos terminales, las cuales florecen de manera escalonada. Sus frutos se presentan solos o agrupados con colores variados, del amarillo al rojo, de forma ovoidal con ápices puntiagudos, contienen muchas semillas pequeñas en cantidades de 120 a 150. La pulpa es de color variable, del amarillo al anaranjado o al anaranjado rosáceo. (Calvo, 2009).

2.4.4.3. Especies de *Meloidogyne spp.*, en tomate de árbol en el Ecuador

Un análisis nematológico de suelo y de raíces fue realizado en cuatro plantaciones de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae Cav. Stand*). Se encontraron nemátodos pertenecientes a 12 géneros diferentes, formando arreglos nematológico poblacionales tanto en suelo como en raíces. El género más frecuente fue *Meloidogyne spp.*, con un promedio general de 363,53 nemátodos por muestra de suelo y 290,36 por muestra de raíz. (Ubidia, 2008.)

2.4.5. Nemátodos

Los nemátodos (Nematoda Rudolphi, 1808), forman el mayor número de asquelmintos (Aschelminthes GROBBEN, 1910) o nematelmintos (Nemathelminthes GEGENBAUER, 1859), con unas 80,000 especies descritas en la bibliografía científica. La palabra "Nemátodo" procede del termino nematoide, que significa similar a un hilo. (Agrios G. , 2007). Además presentan una estructura vermiformes (forma de gusano), semejante a hilos con un tamaño que oscila entre 0.25 mm a >1,0 mm de Longitud, si bien algunos alcanzan hasta 4,0 mm. Las hembras adultas de algunas especies cambian su forma cilíndrica por la de saco, riñón u otras. Este mecanismo de cambio se lo conoce como dimorfismo sexual entre la hembra y el macho. Algunos machos presentan diferencias menos marcadas. (Coyne. D, 2009).

2.4.5.1. Clasificación taxonómica

Los nemátodos pertenecen al:

Reino: Metazoa

Sub reino: Eumetazoa

División: Bilateria

Sub-división: Protostomia

Super Phylum: Pseudocelolates

Phylum: NEMATA.

La clasificación taxonómica más aceptada de los nemátodos es la propuesta por B. G. Chitwood y M. B. Chitwood (1950), según la cual forman un filo dividido en dos clases, Phasmidia y Aphasmidia”. (Agrios G. , 2007).

2.4.5.2. Clasificación de los nemátodos

Los nemátodos fitoparásitos se pueden separar en dos grupos: Los parásitos que se alimentan de la parte aérea de las plantas y los parásitos de raíces y tubérculos que se alimentan de las partes subterráneas. (Hinojosa W. , 2011)

También se pueden agrupar por su hábito y movilidad en tres grupos principales: (Talavera, 2003)

- Endoparásitos migratorios – nemátodos que se alimentan dentro del tejido radical.
- Endoparásitos sedentarios – nemátodos que, una vez alcanzado el sitio de alimentación dentro de la planta, cesan de ser móviles y se alimentan desde un sitio fijo. Su ciclo de vida lo cumplen en el interior de los tejidos donde se alimentan produciendo lesiones como: nódulos, agallas, deformaciones entre otras.
- Ectoparásitos – nemátodos que se alimentan de la planta desde el exterior sin invadir la misma.

2.4.5.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de los nemátodos es simple y directo y se divide en seis estadios: huevo, cuatro estadios larvarios y el adulto. La duración de cada uno de estos estadios del ciclo de vida difiere para cada especie y también depende de otros factores como la temperatura, humedad y la planta huésped. El huevo algunas veces está formado por una capa gelatinosa, generalmente es depositado, en distintas etapas de desarrollo, en el suelo o dentro de la planta. El huevo fecundado sufre una serie de divisiones mientras pasa por las etapas de blástula y gástrula hasta llegar al estadio juvenil (nemátodo filiforme). (Coyne. D, 2009). Las larvas de los nemátodos, morfológicamente parecidas a los adultos, sufren durante su desarrollo cuatro mudas, una al final de cada etapa larvaria. La primera muda se produce cuando aún se encuentra en el interior del huevo y la última es la que define el sexo del nemátodo adulto (machos, hembras, e individuos hermafroditas). La reproducción de estos seres generalmente es sexual pero en casos especiales puede llevarse a cabo de forma partenogenética (la hembra genera descendencia sin la intervención del macho) o hermafrodita (con auto fecundación). (Roman, J. , 2013)

2.4.5.4. *Meloidogyne spp* (nemátodos agalladores).

El nombre de nemátodos noduladores de la raíz se refiere a los nódulos característicos asociados con este tipo de nemátodos. Este género es especialmente importante en la agricultura tropical. (Morales J. , 2001). El primer estadio ocurre dentro del huevo (J1), posteriormente los juveniles del segundo estadio (J2), eclosionan. Estos juveniles pueden vivir durante un mes libre en el suelo y tienen energía suficiente para moverse hasta localizar y penetrar la raíz, donde establecen su sitio de alimentación, usualmente dentro del periciclo y el tejido vascular. (Cruz L. , 2013). Se reproducen y se alimentan de células vivas dentro de las raíces de las plantas en los que inducen agallas pequeñas y grandes, o nudos en la raíz. (Cantuña N. , 2013).

2.4.5.4.1. Características

Los adultos macho y hembra del género *Meloidogyne spp*, son fácilmente identificables morfológicamente, que los machos tienen una forma vermiforme y miden aproximadamente de 1 .2 a 1.5 mm de largo por 0.30 a 0.36 mm de ancho. Las hembras tienen forma de pera y un tamaño aproximado de 0.40 a 1.30 mm de largo por un ancho de 0.27 a 0.75 mm. (Lopez, 2009).

2.4.5.4.2. Identificación.

En la actualidad, el género *Meloidogyne spp*, incluye más de 90 especies (Siddiqi 2000, de Waele y El-sen 2007). Comúnmente, la identificación a nivel de especie se realiza mediante la observación de caracteres morfológicos y morfométricas. (Peraza, Walter; Rosales, Johaner; Esquivel, Alejandro; Hilje, Irena; Molina, Ramon; Castillo, Pablo, 2013).

2.4.5.4.3. Control con productos fitosanitarios (control químico)

El método más utilizado para el control de nemátodos fitoparásitos e insectos plaga ha sido el control químico a base de productos sintéticos no fumigantes como organofosforados o carbamatos. (Arboleda. F, 2012). Entre los productos químicos más utilizados se encuentran: bromuro de metilo, Cloropicrina, Dicloropropeno y sus mezclas. Metam –sodio y metam – potasio, Dazomet Muchos de estos productos que se utilizan para la desinfección del suelo y control de nemátodos son altamente tóxicos para el ser humano. (Hinojosa W. , 2011).

2.4.5.4.4. Extractos en el control de nemátodos

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Este tipo de moléculas producen una variedad de metabolitos secundarios muchos de los cuales presentan una actividad nematicida. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicosidos de fenoles y saponinas (Leon, 2009). Los compuestos tóxicos, alcaloides, fenoles, terpenoides, entre otros, y las lectinas tales como la ricina y la ricinusaglutinina, tienen la capacidad para

adherirse fuertemente a los anfidios de los nemátodos fitoparásitos como *Meloidogyne spp.*, que forma nudos o agallas en el sistema radical, y modificar así su comportamiento quimiotáctico (Arboleda. F, 2012) .

2.4.5.5. Métodos de extracción de nemátodos fitopatógenos de tejido vegetal.

Las extracciones deben realizarse tan pronto como sea posible después de haber recolectado las muestras dado que estas se deterioran con el paso del tiempo. Para extraer la población de huevos y estados larvales J2 de *N. aberrans* y *M. incognita*, el método más eficiente es la técnica de hipoclorito de sodio. (Sandoval & Lomas, 2007).

Para una mayor extracción de muestras existen cuatro técnicas;

1. Bandejas de extracción
2. Maceración de las raíces y hojas
3. Tamizado
4. Incubación.

2.4.5.5.1. Selección del método de extracción

La selección del método a utilizar depende de las condiciones y materiales disponibles el tipo de muestra y también del tipo de nemátodos presentes en la misma. Algunos métodos de extracción son más útiles para un tipo de especial de nemátodos mientras que otros son más generales (Gráfica 1).

Gráfica 1: Métodos de Extracción de nemátodos

<u>METODOS DE EXTRACCION</u>	Muestra de Suelo	Muestra de Suelo	Muestra de raíces o foliar	Muestra de raíces o foliar
	Nemátodos Sedentarios	Nemátodos Migratorios	Nemátodos Sedentarios	Nemátodos Migratorios
Bandeja de extracción		X		X
Tamizado	X	X		
Maceración de raíces y hojas			X	X
Incubación			X	X

Fuente: (Talavera, 2003)

➤ Método del licuado

Materiales

- ✓ 5 g de tejido vegetal
- ✓ Licuadora
- ✓ Pizeta
- ✓ Tamices de 500 y 38 μ m
- ✓ Balanza
- ✓ Fuente o bandeja plástica
- ✓ Tijeras
- ✓ Placa petri rayada en el fondo

➤ Procedimiento

- a. Se toma la muestra del tejido vegetal (raíces, bulbo, hojas) y con la ayuda de la tijera se pican en trozos de 1 cm aproximadamente
- b. En la bandeja se homogeniza la muestra picada y al azar se cogen y pesan 5 g de tejido vegetal.

- c. La muestra de 5 g se introduce a una licuadora con aproximadamente 100 ml de agua y se agita a velocidad considerada por 10 segundos
- d. La muestra licuada se echa sobre la batería de tamices de 500 y 38 μm puestos el primero sobre el segundo y se enjuaga con abundante agua corriente
- e. Con ayuda de la pizeta se colecta lo que queda en el tamiz de 38 μm en la placa petri para el contaje (Agrios G. , 2007)

➤ Macerado-tamizado de Cobb

Este método es utilizado para la obtención de huevos, juveniles J2 y otros estadios de nemátodos endoparásitos sedentarios y migratorios que pueden encontrarse en bulbos, raíces, rizomas, hojas, tallos y plántulas. El material vegetal es cortado en pequeños segmentos (1-2 cm), y colocados en una licuadora con alrededor de 100 ml de agua de la llave. Entonces el material es macerado accionando el dispositivo 4 veces por periodos de 20 segundos cada uno. (Agrios G. , 2007). El producto del macerado es clarificado a través del tamizado de Cobb, que consiste en hacer pasar el macerado a través de los tamices 20, 60, 100,200 y 325. El material retenido en 20 es descartado. En el tamiz 60 quedan capturados las larvas de *Meloidogyne spp.* (Rosa & Sosa, 2014).

2.4.6. Fitoquímica

El estudio de la fitoquímica está estrechamente relacionado a la selección vegetal, clasificación, extracción, separación y purificación de los metabolitos secundarios, determinación del porcentaje existente, ensayos químicos de valoración del compuesto aislado. (CORPOICA, 2007)

2.4.6.1. Plantas y productos alelopáticos

Existen plantas que liberan productos nematicidas al suelo, bien mientras van creciendo o al descomponerse sus residuos en el suelo. Estos productos se conocen como alelo químicos. Las raíces de algunas plantas como el *Asparagus spp.*, producen sustancias tóxicas para los nemátodos; raíces de otras, como el *Tagetes*

spp, producen toxinas que afectan el sistema nervioso de los nemátodos”. (CORPOICA, 2007).

2.4.6.2. Extractos vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados , tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles , constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca”. (Lizcano, 2008).

2.4.6.2.1. Características de los extractos vegetales

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1998 y 1991, citados por Andrea Lizcano permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos: (Lizcano, 2008)

Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros: cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros

Algunos son de color café amarillento otros rojizos: los extractos |provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila

- Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados adquieren olor a caramelo o confitura poco conocido
- La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometido
- Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad
- Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución en el mismo título alcoholímetro del alcohol con el cual han sido preparados”.

2.4.6.2.2. Consistencia de los extractos vegetales

Alzate en 1990, descubrió la consistencia ideal que debían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos; blandos, firmes, secos y fluidos (Lizcano, 2008).

➤ Extractos blandos

Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa (Lizcano, 2008).

➤ Extractos firmes o de consistencia pilular

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener las características especial de no adherirse a los dedos (Lizcano, 2008).

➤ Extractos secos

Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como liquido extractores utiliza alcohol de diferente concentración y agua (Garcia & Carrion, 2010).

➤ Extractos fluidos

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada, desecada al aire y pulverizada (Lizcano, 2008)". Teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de la planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación (Garcia & Carrion, 2010)".

2.4.6.3. Extracción

Separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen, por lo menos dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo. (García & Carrion, 2010). El contenido en sustancia activa de una droga viene determinado, generalmente, por factores previos a la cosecha y que puede tener origen en el tiempo de recolección el lugar el tipo de abono, suelo, factores climáticos. En los procesos de envejecimiento o degradación que pueda ocurrir durante el secado y almacenamiento de la droga de ahí que es necesaria la estabilización de la misma (Guerra, 2005).

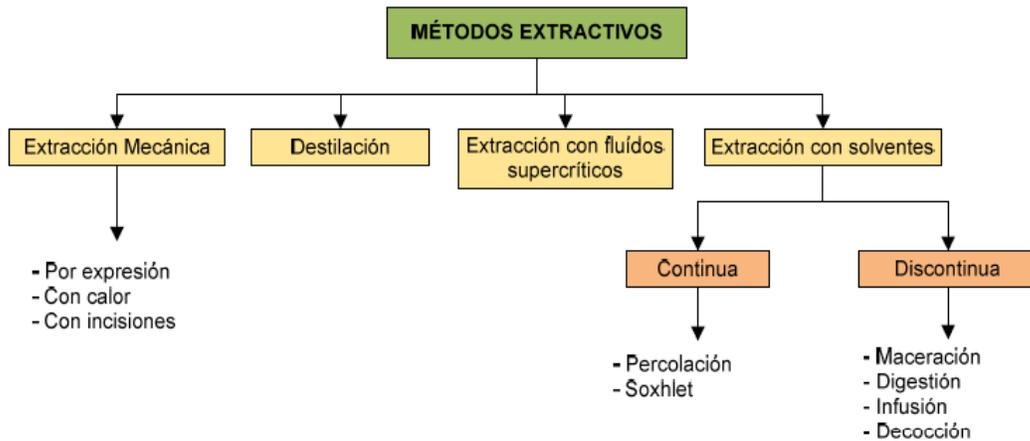
2.4.6.3.1. Metabolitos secundarios

Se los conoce como productos secundarios o productos naturales, que no son comunes en todas las plantas, pero producen metabolitos como fenoles, terpenoides, alcaloides, acetilenos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, entre otros, con propiedades insecticidas, acaricidas y nematocidas, convirtiéndolas en herramientas útiles para el manejo de plagas agrícolas. (Zeiger & Taiz, 2006). La mejor forma de aprovechar estos metabolitos es mediante la preparación de sus tejidos en extractos vegetales o infusiones utilizando diferentes solventes como agua, alcohol, éter etílico, aceites, cetonas y benceno. (Arboleda. F, 2012).

2.4.6.3.2. Métodos de obtención de extractos vegetales

Un extracto vegetal es una mezcla de principios activos, pueden ser líquidos, semisólido o en polvo y se pueden obtener por procesos físicos químicos y/o microbiológicos (Gráfico 2). A partir de una fuente vegetal y utilizable en cualquier campo de la tecnología (Naveda, 2010).

Gráfico 2: Métodos de extracción vegetal



Fuente: (Naveda, 2010)

➤ **Maceración**

La maceración simple o estática consiste en poner el material crudo, con el grado de finura prescrito, en contacto con el solvente, en recipientes o equipos cerrados, protegiéndolos de la luz solar, a temperatura ambiente y por un tiempo que puede variar entre horas o varios días en maceración. Se realizan agitaciones ocasionales. La principal desventaja es la lentitud del proceso (CORPOICA, 2007).

Maceración en frío.- Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se lleva a cabo por un lapso de tiempo largo, dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar (Fernarolis, 1975). Las ventajas de la maceración en frío consiste en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del solvente) prácticamente en su totalidad sin alterar por efectos de temperatura (Diaz, 2012).

2.4.6.3.3. Extracción con solventes

La extracción con solventes consiste en la separación de los principios activos de la planta al ponerla en contacto con un solvente o la mezcla de ellos, capaz de solubilizar dichos principios. (Naveda, 2010).

➤ Extracción por solución.

El llevar a cabo una extracción con solventes orgánicos, los cuales logran penetrar en el tejido vegetal y disuelven las sustancias presentes en su interior, para luego ser evaporadas y concentradas, a baja temperatura, ha permitido determinar su importancia en la extracción vegetal. No existe el disolvente ideal, los más utilizados son éter de petróleo, éter etílico con puntos de ebullición bajos, que permiten su rápida evaporación, y el alcohol que es soluble en agua (Naveda, 2010).

➤ Extracción continua o progresiva

En la extracción continua, el solvente se va renovando o circulando y actúa sobre la planta en una sola dirección. Son métodos que consisten en mantener en todo el momento el desequilibrio entre la concentración de principio activo en la planta y en el solvente para que se produzca la difusión celular. Mediante los procedimientos (percolación, reperlacion y Soxhlet) se puede llegar a la extracción prácticamente completa de los principios activos de las plantas (Sharapin, 2000)

➤ Extracción discontinua o simultánea

En la extracción discontinua, la totalidad del material vegetal se sumerge en el solvente y contacta con este, por lo que la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio entre la concentración del solvente y del residuo. La maceración la digestión, la infusión y la decossion son los métodos que pertenecen a este grupo. (Sharapin, 2000).

2.4.6.3.4. Proceso de obtención y análisis de los extractos naturales

Para la obtención y análisis de extractos a partir de tejidos vegetales se necesita de las siguientes etapas; (Naveda, 2010).

- Obtención de la muestra a partir del tejido vegetal. La muestra a analizar puede ser del tejido completo o partes de la planta, troceada, pulverizada, aceites esenciales o extractos.
- Determinación de residuo seco, cenizas, contenido de humedad,, etc., del tejido vegetal.
- Obtención y análisis de la fracción volátil (aceite esencial)
- Obtención y análisis de la fracción no volátil (nutrientes, elementos minerales, extractos).

2.5. VOCABULARIO TECNICO

Anfidios.- Se presentan en la porción anterior de especies de vida libre. Son excavaciones de la cutícula (presumiblemente quimiorreceptores) provistos de una glándula y de terminaciones nerviosas.

Cutícula.- Es muy compleja, con tres capas: cortical, mediana y basal. Está formada por fibras de colágeno entrecruzadas. Es flexible y funciona como antagonista de la musculatura longitudinal.

Fitoquímico.- Son sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida (por lo menos a corto plazo), pero tienen efectos positivos en la salud. Se encuentran naturalmente en las plantas (frutas, vegetales, legumbres, granos enteros, semillas, hongos, hierbas y especias).

Nematicida.- Es un tipo de plaguicida químico usado para matar nematodos parásitos de las plantas.

Nódulos.- Los nódulos radicales son asociaciones simbióticas entre bacterias y plantas superiores. La más conocida es la de *Rhizobium* con especies de Leguminosas.

Quimiotáctico.- Se dice de las sustancias que inducen a determinadas células a migrar hacia el órgano diana.

Simbiosis.- Se aplica a la interacción biológica, a la relación estrecha y persistente entre organismos de diferentes especies. Los organismos involucrados en la simbiosis son denominados simbiotes.

Sufrútice.- Dícese de la planta parecida a un arbusto, de pequeño tamaño y solo lignificada en la base. Las partes herbáceas se elevan por sobre las partes leñosas, dando aspecto de ser arbustivo.

2.6. HIPÓTESIS.

Ensayo "A" (E.A.).- Rendimiento de los extractos de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente (éter, etanol y agua) mediante técnicas de maceración continua y simultánea.

H0. Los tres métodos de obtención de extracto de barbasco no presentan diferencia significativa en cuanto a la cantidad obtenida de producto

H1. Al menos uno de los tres métodos de extracción si presenta diferencia significativa en cuanto a la cantidad obtenida de producto.

Ensayo “B” (E.B).- Efecto nematocida de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), sobre larvas J2 del género *Meloidogyne spp* en condiciones *in vitro*.

H0 El extracto de barbasco no controla los nemátodos en el cultivo de tomate *Cyphomandra betacea in vitro*.

H1 El extracto de barbasco si controla los nemátodos en el cultivo de tomate *Cyphomandra betacea in vitro*.

2.7. VARIABLES.

2.7.1. Variable independiente:

- Metodología para obtención de los extractos de barbasco (etéreo, etanólico y acuoso). (E.A.)
- Concentración y tiempo de exposición de los extractos sobre nemátodos del género *Meloidogyne spp*. (E.B)

2.7.2. Variable dependiente:

- Porcentaje de rendimiento y calidad del extracto de barbasco (E.A.)
- Mortalidad de nemátodos *in vitro*. (E.B)

III. METODOLOGÍA.

3.1 MODALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN.

La modalidad de investigación es cuantitativa; debido a que las variables a evaluarse serán medidas mediante la toma de datos numéricos, con objetivos definidos y mediante un diseño experimental donde se analizarán las variables en estudio, implementando estrategias y procedimientos técnicos.

3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN.

- Exploratoria.- Debido a que determina un conocimiento generalizado de cómo se podría utilizar, métodos científicos y técnicos de extracción, sustentadas en anteriores investigaciones de extracción vegetal.
- Descriptiva.- Fomenta obtener información general sobre métodos óptimos de extracción vegetal, y así permitir crear discusiones acerca de un determinado proceso de extracción vegetal, a partir de técnicas que serán descritas a partir de procesos operativos con características científicas teóricas y prácticas llevadas a un diseño experimental
- Explicativa.- Involucra un análisis detallado cuantitativamente de las causas inherentes a partir de las variables que determina la causa y efecto de esta investigación.
- Aplicada.- Genera un interés de la sociedad en cuanto a la aplicabilidad que tienen los polifenoles presentes en plantas alelopáticas, como posibles controladores de plagas y enfermedades.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN.

3.3.1 Ensayo "A".

➤ Población y Muestra.

La población que se utilizó para obtener los extractos a partir de la raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), fue de 6.5 kg de raíz deshidratada, para la obtención del extracto (etéreo y etanólico) y 1 kg de raíz fresca, para la obtención del extracto acuoso, cuya muestra estuvo representada por 50 g para cada tipo de extracción.

3.3.2 Ensayo "B".

➤ Población y Muestra.

La población para determinar el efecto nematicida, estuvo representada por 4080 nemátodos, cada muestra se representó y evaluó con 20 larvas juveniles J2 del género *Meloidogyne spp*, presentes en la raíz de *Cyphomandra betacea*.

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

Cuadro 4: Operacionalización de variables

Hipótesis	Variables	Descripción de la variable	Indicadores	Técnica	Informante
<p>Obtener extracto de barbasco <i>Thephrosia sinapou</i>, que permita su evaluación potencial como agente nematicida en tomate <i>Cyphomandra betacea</i>.</p>	<p>V.I:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Metodología para obtención de los extractos de barbasco (etéreo, etanólico y acuoso) (E.A.) • Concentración y tiempo de exposición de los extractos sobre nemátodos del género <i>Meloidogyne spp.</i> (E.B) 	<ul style="list-style-type: none"> • Son técnicas utilizadas en laboratorio, para optimizar el rendimiento y la calidad del producto final. • Representa las diferentes dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima) evaluadas a diferentes tiempos de exposición (6, 12, 24 y 48 horas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Control de Calidad Cuantitativo • Mililitros 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación de humedad. • Residuo Seco • Parámetro físico; densidad, pH, índice de refracción. • Organolépticas; color, apariencia y olor. 	Investigador
	<p>V.D:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rendimiento del extracto (etéreo, etanólico y acuoso). (E.A.) • Mortalidad de nemátodos <i>in vitro</i>. (E.B) 	<ul style="list-style-type: none"> • Determina la cantidad de extracto obtenido utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente (éter, etanol y agua destilada). • Es el efecto nematicida de los extractos, gracias a los polifenoles obtenidos en cada extracto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje de rendimiento final para cada extracto. • Porcentaje del efecto nematicida 	<ul style="list-style-type: none"> • Maceración simultánea y continua • Morfometría (Nemátodos) 	Investigador

3.5. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.

3.5.1. Información bibliográfica

La información bibliográfica utilizada en la investigación se la recolecto de libros, manuales técnicos, páginas electrónicas, revistas científicas e investigaciones realizadas, referentes al tema planteado.

3.5.2. Información procedimental

La presente investigación se obtuvo a partir de dos ensayos diferentes; El primer ensayo (E.A), se desarrolló en la provincia del Carchi, Cantón Tulcán, sector de la parroquia Tulcán, específicamente en los Laboratorios de Fitopatología de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, donde se obtuvo los extractos a partir de la raíz de barbasco *Thephrosia sinapou* mediante técnicas de maceración simultánea y continua, utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente (éter, etanol y agua destilada).

El segundo ensayo (E.B), se desarrolló en la provincia de Pichincha, Cantón Tumbaco sector conocido como la Granja, específicamente en los laboratorios de Nematología de la Agencia Ecuatoriana de Calidad del Agro- AGROCALIDAD, donde se realizó ensayos de pruebas de eficacia en condiciones *in vitro*, de los extractos de raíz de barbasco como posibles nematocidas sobre nemátodos del género *Meloidogyne spp*, presentes en la raíz de tomate de árbol *Cyphomandra betaceae*.

Para la comprobación de las hipótesis se realizó un análisis ADEVA en donde se empleó la prueba de Tukey al 5%.

3.5.3. Factores y tratamientos de estudio del Ensayo (A y B)

Ensayo "A":

El factor A, comprende técnicas de maceración simultánea y continua (deshidratado, macerado, filtrado y rotavaporado), empleadas para la obtención de los diferentes extractos. El Factor A consta de tres niveles, los cuales se constituyen en los siguientes tratamientos;;

➤ Extracto etéreo A1.

Composición: Extracto de origen vegetal, obtenido mediante el uso de un solvente orgánico (éter etílico al 100%).

Dosis: 5 mL.

➤ Extracto etanólico A2.

Composición: Extracto de origen vegetal obtenido mediante el uso de un solvente orgánico (etanol al 96%).

Dosis: 5 mL.

➤ Extracto acuoso A3

Composición: Extracto de origen vegetal obtenido mediante el uso de un solvente orgánico (agua).

Dosis: 5 mL.

3.5.3.1. Tratamientos del Ensayo "A" (E.A)

Conformado por tres tratamientos en los cuales se utilizó tres tipos de solventes orgánicos de polaridad creciente para determinar su eficacia como posible nematocida en dosis de 5 mL. (Cuadro 5)

Cuadro 5: Extractos; etéreo, etanólico y acuoso y su dosis de aplicación *in vitro*

Tratamientos	Dosis	Método de Aplicación
T1 A1	5 ml	<i>in vitro</i>
T2 A2	5 ml	<i>in vitro</i>
T3 A3	5 ml	<i>in vitro</i>

T1 A1: Extracto etéreo, T2 A2: Extracto etanólico, T3 A3: Extracto acuoso

Elaborado: Fuel R. (2015)

Ensayo “B”:

En el Ensayo “B” (E.B.) los factores en estudio empleados en la presente investigación que busca determinar la eficacia de los extractos como agente nematocidas, evaluados en condiciones *in vitro* a 23 °C se presentan en el siguiente cuadro (Cuadro 6)

Cuadro 6: Factores en estudio para el Ensayo “B”

FACTORES	DESCRIPCION DEL FACTOR
Factor A	Extractos obtenidos mediante el uso de solventes orgánicos de polaridad creciente
Factor B	Dosis aplicadas en condiciones <i>in vitro</i>
Factor C	Tiempo de exposición de las larvas J2 expuestas a los tres tipos de extractos y sus respectivos testigos

Elaborado: Fuel R. (2015)

- FACTOR A; Comprende los extractos; etéreo, etanólico y acuoso, obtenidos de la raíz de barbasco *Thephrosia sinapou*, utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente. (Cuadro 7)

Cuadro 7: Respectivos solventes orgánicos de extracción (Factor A)

FACTOR A			
NIVEL	EXTRACTOS	SOLVENTE	CONCENTRACION
A 1	Etéreo	Éter	100%
A 2	Etanólico	Etanol	96%
A 3	Acuoso	agua destilada	100%

Elaboración: Fuel R (2015)

- FACTOR B; Describe las diferentes concentraciones a las cuales fueron expuestos los nemátodos, para poder determinar su eficacia como posibles nematicidas. (Cuadro 8)

Cuadro 8: Dosis letales aplicadas en condiciones *in vitro* sobre nemátodos del género *Meloidogyne spp* (Factor B)

FACTOR B	
NIVEL	DOSIS
B 1	Alta
B 2	Media
B 3	Baja
B 4	Mínima

Elaboración Fuel R (2015)

- FACTOR C; Describe los diferentes tiempos de exposición en condiciones *in vitro*, de nemátodos del género *Meloidogyne spp* a los posibles efectos nematicidas por parte de los diferentes extractos. (Cuadro 9)

Cuadro 9: Tiempos de exposición de los extractos sobre los nemátodos en condiciones *in vitro* (Factor C)

FACTOR C	
NIVEL	TIEMPO
C 1	6 horas
C 2	12 horas
C 3	24 horas
C 4	48 horas

Elaboración: Fuel R. (2015)

3.5.3.2. Tratamientos del Ensayo “B” (E.B.)

Los tratamientos resultan de la interacción de los tres factores más los testigos (químico, absoluto y blanco). Además se trabajó con 4 repeticiones como se demuestra en el siguiente cuadro (Cuadro 10)

Cuadro 10: Tratamientos para evaluar la eficacia de los extractos sobre los nemátodos del género *Meloidogyne spp*, bajo condiciones *in vitro* a 23 °C

TRATAMIENTOS	DOSIS	TIEMPO DE EXPOSICION	REPETICION
Etéreo	Alta	6 horas	4
Etéreo	Alta	12 horas	4
Etéreo	Alta	24 horas	4
Etéreo	Alta	48 horas	4
Etéreo	Media	6 horas	4
Etéreo	Media	12 horas	4
Etéreo	Media	24 horas	4
Etéreo	Media	48 horas	4
Etéreo	Baja	6 horas	4
Etéreo	Baja	12 horas	4
Etéreo	Baja	24 horas	4
Etéreo	Baja	48 horas	4
Etéreo	Mínima	6 horas	4
Etéreo	Mínima	12 horas	4
Etéreo	Mínima	24 horas	4
Etéreo	Mínima	48 horas	4
Etanólico	Alta	6 horas	4
Etanólico	Alta	12 horas	4
Etanólico	Alta	24 horas	4
Etanólico	Alta	48 horas	4
Etanólico	Media	6 horas	4
Etanólico	Media	12 horas	4
Etanólico	Media	24 horas	4
Etanólico	Media	48 horas	4
Etanólico	Baja	6 horas	4
Etanólico	Baja	12 horas	4
Etanólico	Baja	24 horas	4
Etanólico	Baja	48 horas	4
Etanólico	Mínima	6 horas	4
Etanólico	Mínima	12 horas	4
Etanólico	Mínima	24 horas	4

Etanólico	Mínima	48 horas	4
Acuoso	Alta	6 horas	4
Acuoso	Alta	12 horas	4
Acuoso	Alta	24 horas	4
Acuoso	Alta	48 horas	4
Acuoso	Media	6 horas	4
Acuoso	Media	12 horas	4
Acuoso	Media	24 horas	4
Acuoso	Media	48 horas	4
Acuoso	Baja	6 horas	4
Acuoso	Baja	12 horas	4
Acuoso	Baja	24 horas	4
Acuoso	Baja	48 horas	4
Acuoso	Mínima	6 horas	4
Acuoso	Mínima	12 horas	4
Acuoso	Mínima	24 horas	4
Acuoso	Mínima	48 horas	4
Testigo químico	Alta	48 horas	4
Testigo absoluto	Alta	48 horas	4
Testigo blanco	Alta	48 horas	4

Elaboración: Fúel R. (2015)

3.5.4. Descripción del Diseño - Experimental

3.5.4.1. Tipo de diseño experimental

Para el ensayo (E.A), se aplicó un Diseño Completamente al Azar (D.C.A.), con tres tratamientos Para el ensayo (E.B), se aplicó un Diseño Completamente al Azar (D.C.A), con arreglo factorial A x B x C + 3 testigos y cuatro repeticiones en condiciones *in vitro* a 23°C.

3.5.4.2. Características del Ensayo

Cuadro 11: Características del ensayo “B” (E.B.)

Numero de tratamientos	51
Número de repeticiones	4
Número de unidades experimentales	204

Elaboración: Fuel R. (2015)

Cuadro 12: Esquema del análisis estadístico para la evaluación de los extractos sobre los nemátodos del género *Meloidogyne spp.*

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	203
Tratamientos (T)	50
F A (Extractos)	2
F B (Concentración)	3
F C (Tiempo)	3
A X B	6
A X C	6
B X C	9
A X B X C	18
TQ TB vs TA	1
TQ vs TB	1
Testigo vs Resto	1
Error	153

Elaboración: Fuel R. (2015)

3.5.4.3. Característica de la unidad experimental

Con el fin de realizar los respectivos análisis cada unidad experimental (caja petri), contará con su respectiva dosificación y la cantidad determinada de nemátodos, estimada en 20 larvas del género *Meloidogyne spp.*

3.5.5. Variables a evaluar.

- Porcentaje de rendimiento en la obtención de los extractos (etéreo, alcohólico y acuoso).
- Efecto nematocida *in vitro*.

3.5.6. Métodos Específicos del Manejo del Ensayo.

3.5.6.1. Materiales y Equipos utilizados en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi para la obtención de los extractos; etéreo, etanólico y acuoso.

- | | |
|----------------------------|---|
| ➤ Material Vegetal | ➤ Reactivos; éter etílico 100% y etanol 96% |
| ✓ Raíz de barbasco | |
| ➤ Materiales | ➤ Equipos |
| ✓ Bureta de 100ml, | ✓ Rotavapor, |
| ✓ Espátula, | ✓ Estufa, |
| ✓ Cierra Manual | ✓ Balanza Analítica, |
| ✓ Guantes de Caucho, | ✓ Analizador de Humedad. |
| ✓ Papel Aluminio. | ✓ Balanza Digital, |
| ✓ Marcador de Vidrio | ✓ Martillo |
| ✓ Papel Carbón | ✓ Molino Eléctrico, |
| ✓ Cintas de Medición de pH | ✓ Computador |
| ✓ Colador plástico | ✓ Flash Memory |
| | ✓ Cámara fotográfica |

3.5.6.2. Materiales y Equipos utilizados en el laboratorio de Nematología de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro- AGROCALIDAD, para la evaluación de los extractos; etéreo, etanólico y acuoso, como posibles agentes nematocidas sobre larvas J2 pertenecientes al género *Meloidogyne spp*, presentes en *Cyphomandra betacea*

➤ Material Vegetal.

- ✓ Raíz de tomate de árbol
Cyphomandra betacea.

➤ Materiales de Laboratorio.

- ✓ Vasos de vidrio graduado,
- ✓ Pipeta ,
- ✓ Piceta,
- ✓ Cajas Petri,
- ✓ Tijeras de podar
- ✓ Matraz,
- ✓ Pinceles

➤ Reactivos; hipoclorito de sodio al 5 %

➤ Equipos.

- ✓ Microscopio Invertido
- ✓ Estéreo-Microscopio
- ✓ Licuadora
- ✓ Tamices de Bronce de 63 µm, 38µm y 25 µm
- ✓ Licuadora
- ✓ Cámaras contadoras de Nemátodos
- ✓ Contadores (Chequeadores)
- ✓ Refrigeradora.
- ✓ Computador
- ✓ Flash Memory
- ✓ Cámara fotográfica

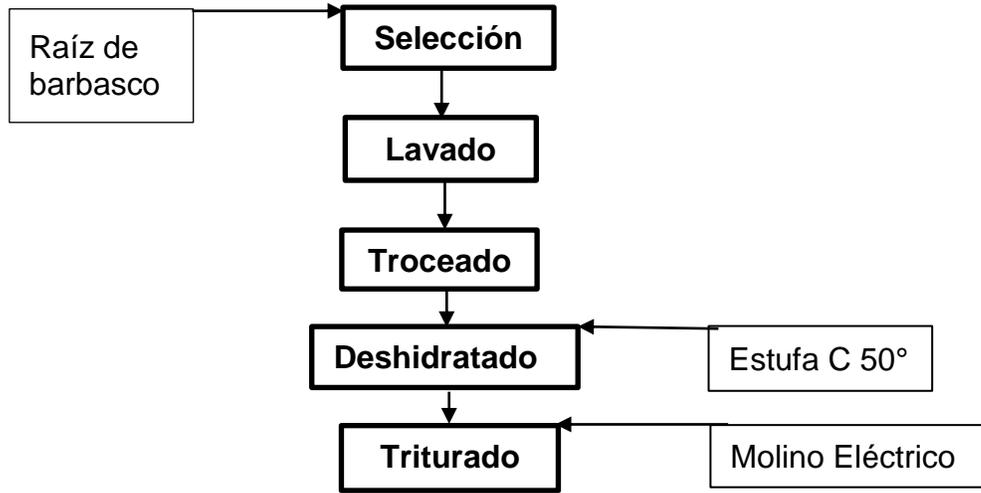
3.5.6.3. Fase de Campo en la parroquia de Quinshull – Maldonado, perteneciente a la provincia del Carchi.

Para la recolección de la materia prima (raíz de barbasco), se ubicó de manera específica, el sitio donde se realizó la extracción del tejido vegetal, utilizando una azadilla, con el fin de no provocar algún tipo de lesión al tejido vegetal que pueda provocar una posterior necrosis radical como lo recomienda Kuklinski (2003). Posteriormente se transportó el tejido vegetal envuelto en periódico, previo a un lavado con agua corriente para eliminar restos de tierra presentes en el tejido vegetal, luego se envió una muestra al Herbario Nacional, ubicado en el cantón Quito, provincia de Pichincha, para una identificación taxonómica y morfológica

3.5.6.4. Fase experimental en la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, específicamente en el Laboratorio de Fitopatología para la preparación de la muestra pulverizada (raíz de barbasco).

En la preparación de la muestra pulverizada (raíz de barbasco), según Sharapin (2000). Se realizó un proceso técnico con el fin de obtener una muestra, para asegurar un contenido de humedad no mayor del 10%, una vez deshidratado el material, este fue triturado para ser sometido a la extracción de polifenoles presentes en su estructura radical (Gráfico 3)

Gráfico 3: Diagrama de bloques para la preparación de la muestra a partir de la raíz de barbasco.



Elaboración: Fuel R. (2015)

El secado es fundamental debido a que interrumpe los procesos de degradación por enzimas o fermentos, impide además el crecimiento de microorganismos y las reacciones de oxidación e hidrólisis. (Sharapin, 2000).

➤ Procedimiento

- a) Selección.- Se procedió a seleccionar las raíces que estén libres de ataques producidos por agentes patógenos y que no presenten necrosis.
- b) Lavado.- Se lavó las raíces con abundante agua para eliminar restos de tierra
- c) Troceado.- Se cortó en pequeños trozos aproximados de 2 cm de diámetro, seguidamente se homogenizó la muestra.
- d) Deshidratado.- Con los trozos de raíz, se procedió a deshidratar utilizando una estufa a temperatura de 50°C, realizando controles periódicos con la ayuda de un analizador de humedad hasta obtener la humedad requerida de 5.27%
- e) Triturado.- Se molió los trozos deshidratados, utilizando un molino eléctrico (Fotografía 2).

Fotografía 2: Raíz de barbasco pulverizada en un molino eléctrico

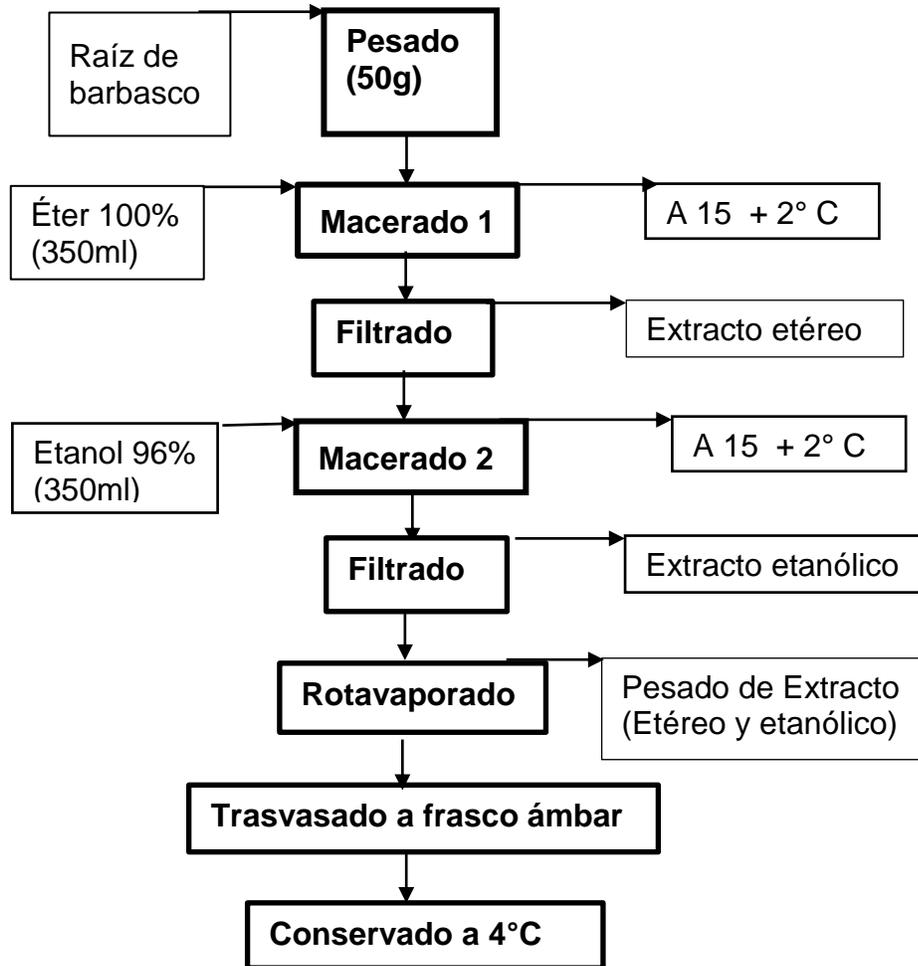


Fuente: Fuel, R. (2015)

3.5.6.4.1. Obtención del extracto (etéreo y etanólico), utilizando como solvente orgánicos éter al 100 % y etanol al 96%.

El Grafico 4, demuestra la extracción con solventes orgánicos que consiste en la separación de los principios activos presentes en la planta al ponerla en contacto con un solvente o con la mezcla de ellos capaz de solubilizar dichos principios. (Sanabria, Lopez, & Galdron, 1997). Los solventes solubilizan el aceite esencial, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una especie impura. (Garcia & Carrion, 2010). Para que se lleve a cabo correctamente bien se deben considerar los siguientes factores: las características del material vegetal (secado y tamaño de partícula), la naturaleza del solvente, temperatura, la agitación, la relación solido: liquido el tiempo de extracción y el control de la difusión celular (renovación del solvente). (SENA, 2012). Transcurrido el tiempo de extracción se elimina el solvente utilizando un rotavapor o estufa, para luego almacenar el extracto en un frasco hermético de vidrio de color oscuro en lugares frescos para evitar la oxidación y volatilización de principios activos

Gráfico 4: Diagrama de bloques para la obtención del extracto etéreo y etanólico con el uso del solvente (éter al 100% y etanol al 96%).



Elaboración: Fuel R. (2015)

Para la obtención del extracto (etéreo y etanólico), se realizaron extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente (éter etílico y etanol), con la finalidad de lograr un mayor agotamiento de la droga en el material vegetal. En el procedimiento para la obtención de los extractos (etéreo y etanólico), se utilizó técnicas de extracción simultánea y continua a temperatura ambiente. (basándose en técnicas de obtención de polifenoles según; Sharapin et al., 2000; UDELAR, 2001; Kuklinski, 2003; Serrano, 2005; Muñoz et al., 2007 Pérez, 2009).

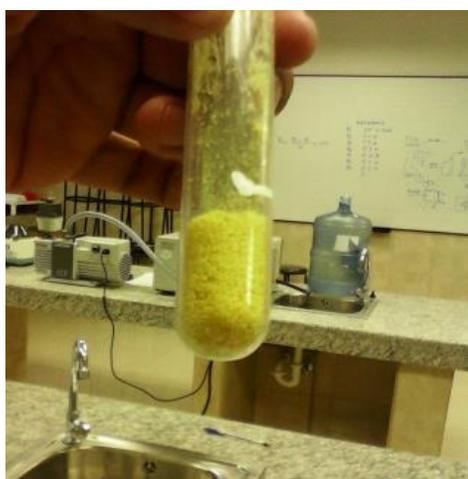
➤ Procedimiento

- a) Pesado.- Se procedió a pesar 50 g de raíz de barbasco triturado, utilizando una balanza digital.
- b) Macerado I.- Se maceró a temperatura ambiente ($15 \pm 2^\circ \text{C}$), 50 g de raíz y 350 mL del primer solvente (éter), en un matraz Erlenmeyer hermético de 500 mL, previa a una agitación de 60 minutos, se dejó macerar por periodos continuos de 24 horas. en un lugar fresco y oscuro hasta el agotamiento total del material vegetal seco.
- c) Filtrado I.- Se filtró la muestra obtenida durante 24 horas de maceración, utilizando una media nylon, luego se colocó la muestra sobre la base de un vaso de precipitación de 500 ml, donde se acumularon las partículas de mayor tamaño, seguidamente se volvió a filtrar el contenido esta vez, utilizando un embudo de vidrio el cual contenía un papel filtro cualitativo, sobrepuesto a un trípode cuyo contenido se etiquetó y se conservó en lugar fresco y oscuro para su posterior rotavaporado.
- d) Macerado II.- Se procedió a Macerar a temperatura ambiente ($15 \pm 2^\circ \text{C}$), los 50 g de raíz utilizados en la primera maceración adicionando 350 mL del segundo solvente (etanol), en un matraz Erlenmeyer hermético de 500 mL, previa a una agitación de 60 minutos, se dejó macerar por periodos continuos de 24 horas. en un lugar fresco y oscuro hasta el agotamiento total del material vegetal seco
- e) Filtrado II.- Se filtró la muestra obtenida durante las 24 horas de maceración, en dos filtraciones continuas. Utilizando una media nylon, se colocó la muestra sobre la base de un vaso de precipitación de 500 ml, donde se acumularon las partículas de mayor tamaño, seguidamente se volvió a filtrar el contenido esta vez, utilizando un embudo de vidrio el cual contenía papel filtro cualitativo, sobrepuesto a un trípode cuyo contenido se etiquetó y se conservó en lugar fresco y oscuro.
- f) Rotavaporado.- Se recuperó los solventes utilizando un rotavapor, con sus respectivos puntos de ebullición: éter (34°C) y etanol (78°C), luego se pesó

el extracto etéreo y etanólico obtenidos después del rotavaporado utilizando una balanza analítica.

- g) Trasvasado.- Se procedió a trasvasar los extractos en frascos de color ámbar.
- h) Conservado.- Se etiquetó y conservó los extracto etéreo y etanólico en un lugar fresco y oscuro a 4 °C, para su posterior evaluación como agente nematocida (Fotografía 3).

Fotografía 3: Extracto etéreo seco y extracto etanólico blando

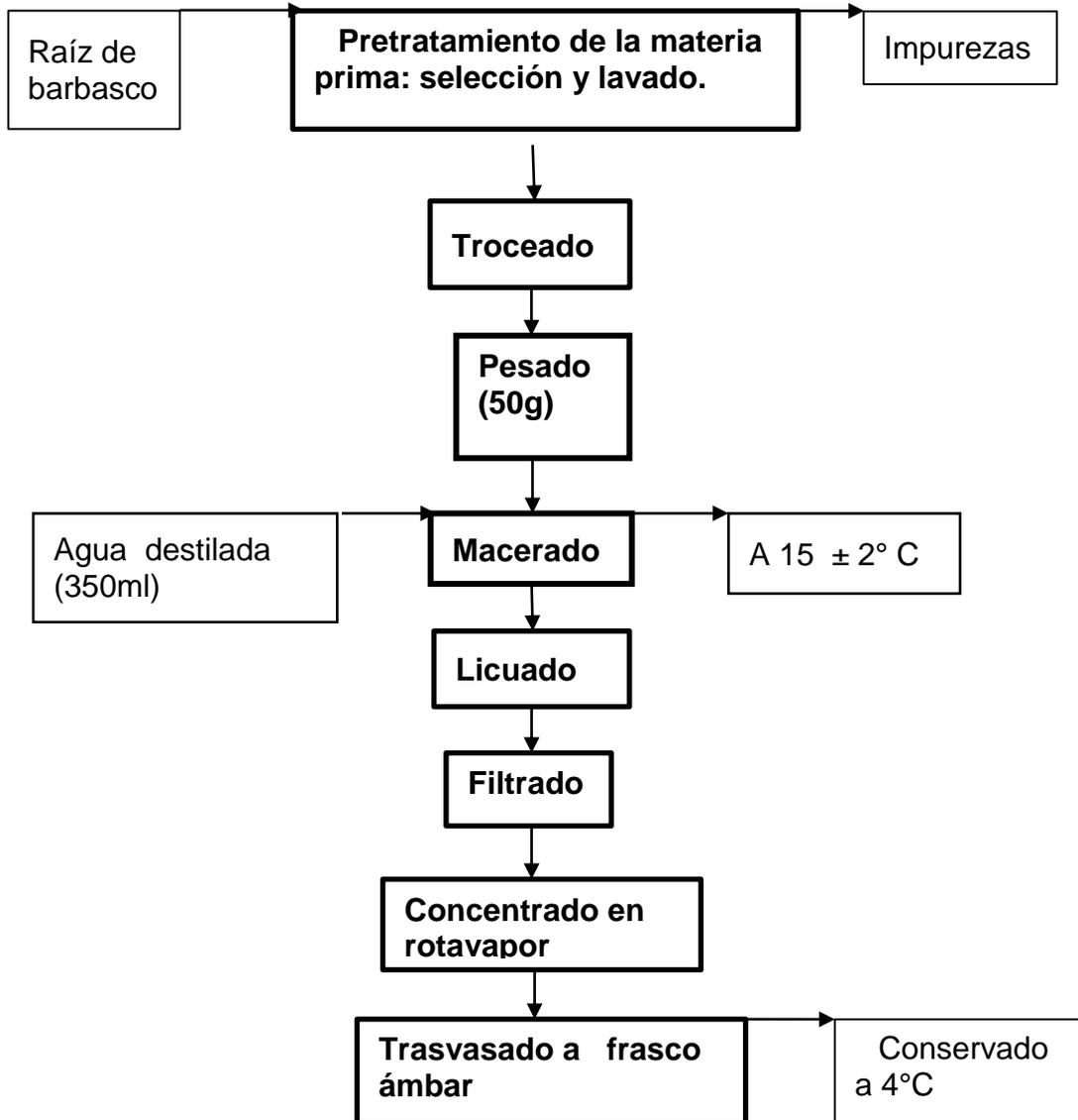


Fuente: Fuel, R. (2015)

3.5.6.4.2. Obtención del extracto acuoso, utilizando como solvente orgánico (Agua destilada).

En el Gráfico 5, se observa la extracción acuosa utilizando, la raíz de barbasco, que contienen la mayoría del principio activo (Rotenona), mediante una extracción continua que consiste en licuar y tamizar por unos minutos, las partes vegetales picadas, y luego se deja reposar, para su posterior filtrado. En caso de raíces es preferible dejar reposar por un periodo de tiempo de 2 a 10 días (Archila, 2008).

Gráfico 5: Diagrama de bloques para la obtención del extracto acuoso



Elaboración: Fuel R. (2015)

En el procedimiento para la obtención del extracto acuoso se utilizó, la metodología de maceración a temperatura ambiente según; (Gorb et al., 2000; Torre, 2004; Gonçalves et al. 2007; Ravindran et al. 2011)

➤ Procedimiento

- a) Pretratamiento de la materia prima.- Se seleccionó muestras de raíz de barbasco que no presenten lesiones por agentes patógenos o necrosis, seguidamente se lavó las raíces seleccionadas para eliminar impurezas presentes en el sistema radicular.
- b) Troceado.- Las raíces frescas se cortaron en trozos de 1 x 1 cm, utilizando un cuchillo o tijera para podar.
- c) Pesado.- Se pesaron 50 g de raíz fresca, utilizando una balanza digital.
- d) Macerado.- Se maceraron los trozos de raíz a temperatura ambiente ($15^{\circ}\text{C} \pm 2$), por periodos continuos de 48 horas en un lugar fresco y oscuro.
- e) Licuado.- Se licuó los trozos de raíz, para luego ser tamizados utilizando un colador, esto permitió eliminar las impurezas de mayor tamaño, posteriormente la muestra se colocó en un matraz Erlenmeyer hermético de 500 mL, previa a una agitación de 60 minutos con un agitador magnético.
- f) Filtrado.- La muestra obtenida durante las 48 horas de maceración, se filtró en dos filtraciones consecutivas; La primer filtración se realizó utilizando una media nylon donde la muestra se colocó en la parte exterior de un vaso de precipitación de 500 ml, para que se acumulen las partículas de mayor tamaño, seguidamente se volvió a filtrar el contenido esta vez, se utilizó un embudo de vidrio el cual contiene papel filtro cualitativo, sobrepuesto a un trípode cuyo contenido se etiquetó, y se conservó en un lugar fresco y oscuro para su posterior rotaevaporación
- g) Concentrado.- Se concentró la muestra anteriormente filtrada utilizando un rotavapor, a (80°C)
- h) Trasvasado.- Se trasvasó y se etiquetó en frascos color ámbar en un lugar fresco y oscuro a 4°C . (Fotografía 4)

Fotografía 4: .Extracto acuoso de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*)



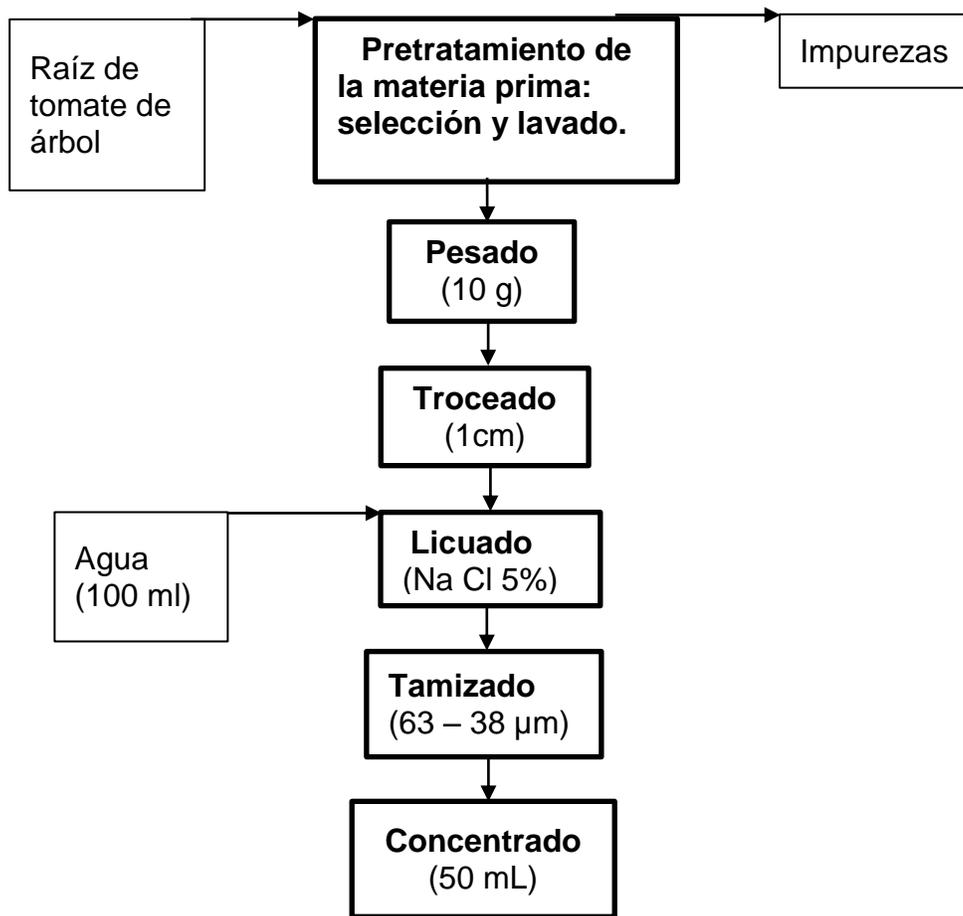
Fuente: Fuel, R. (2015)

3.5.6.5. Fase experimental en las instalaciones de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro- AGROCALIDAD, específicamente en los Laboratorios de Nematología, para evaluar la eficacia como posibles nematocidas de los respectivos extractos obtenidos a partir de la raíz de barbasco

3.5.6.5.1. Obtención de extracto de raíz de tomate de árbol *Cyphomandra betacea*.

El Gráfico 6, evidencia la extracción del inoculo de *Meloidogyne spp*, para lo cual se utilizó el sistema radical del cultivo tomate de árbol, cuyas muestras fueron analizadas en los laboratorios de Nematología, siguiendo las técnicas recomendadas según; (Meredith, 1973; Araya et al 1995).

Gráfico 6: Diagrama de bloques para la obtención del inóculo de *Meloidogyne spp*



Elaboración: Fúel R. (2015)

Las extracciones deben realizarse tan pronto como sea posible después de haber recolectado las muestras dado que estas se deterioran con el paso del tiempo. Para extraer la población de huevos y estados larvales J2 de *N. aberrans* y *M. incognita*. (Sandoval & Lomas, 2007).

➤ Procedimiento

- a) Pretratamiento de la materia prima.- Se procedió a seleccionar las raíces que presenten síntoma de agallamiento, seguidamente, se lavó las raíces para remover la tierra, utilizando una ducha a baja presión.
- b) Pesado.- Se pesó 10 g de raíz con presencia de nódulos, utilizando una balanza de dos platos

- c) Troceado.- Se cortó las raíces en trozos de aproximadamente 1-2 cm de largo, utilizando una tijera de podar o cuchillo
- d) Licuado.- Se licuó los trozos de raíz en una licuadora, adicionando 100 mL de agua y de 1 a 2 cc de hipoclorito de sodio al 5 % por 20 segundos a una velocidad continua.
- e) Tamizado.- Se tamizó utilizando los tamices de 63 μm y 38 μm uno sobre otro de manera que el de 38 μm quede en el extremo inferior y el de 63 μm en el extremo superior, luego se agregó el licuado en los tamices y se lavó con abundante agua para que los nemátodos en las raíces licuadas lleguen al tamiz de 38 μm .
- f) Concentrado.- Se concentró 50 mL de muestra de raíz de tomate, cuyos nemátodos fueron obtenidos en el tamiz de 38 μm y colocados en un matraz de 100 mL con la ayuda de una piceta. Posteriormente se etiquetó y se conservó en un lugar fresco para su identificación y pesca. (Fotografía 5)

Fotografía 5: Extracto de raíz de tomate de árbol con *Meloidogyne spp.*



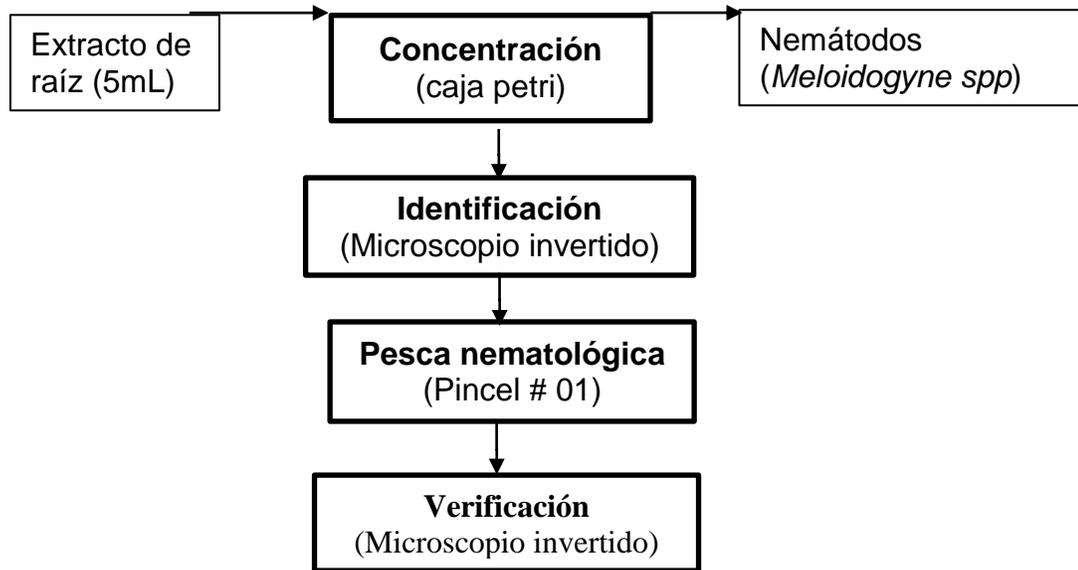
Fuente: Fúel R. (2015)

3.5.6.5.2. Identificación y aislamiento *in vitro*, de nemátodos móviles del género *Meloidogyne spp.*, presentes en la raíz de *Cyphomandra betacea*.

Para la identificación de los nemátodos presentes en el sistema radicular se utilizó procedimientos, basados en claves taxonómicas y morfometría mediante equipos de microscopía óptica, técnicas recomendadas en la Gráfica 7, según; (Hussey y

Barker, 1973; Bello y col., 1994; Agrios, 2001; Perry, 2009; Agrocalidad, 2013).
(Grafico 7)

Gráfico 7: Diagrama de bloques para la identificación y captura de nemátodos móviles



Elaboración: Fuel R. (2015)

➤ Procedimiento

- a) Concentración .- Se concentró en una caja petri de 5 cm de diámetro una alícuota de 5 ml del extracto de raíz , utilizando una pipeta de 10 μ l
- b) Identificación. Se identificó los nemátodos del género *Meloidogyne spp*, mediante un reconocimiento morfológico, utilizando un microscopio invertido.
- c) Pesca nematológica.- Se pescó nemátodos endoparásitos, utilizando un pincel número 01, luego se procedió a colocarlos en una caja contadora
- d) Verificación.- Se verificó la presencia de larvas J2 en la caja contadora, mediante el uso de un estéreo-microscopio (Fotografía 6).

Fotografía 6: .Nemátodos del género *Meloidogyne spp*, presentes en la raíz de tomate de árbol
Cyphomandra Betacea

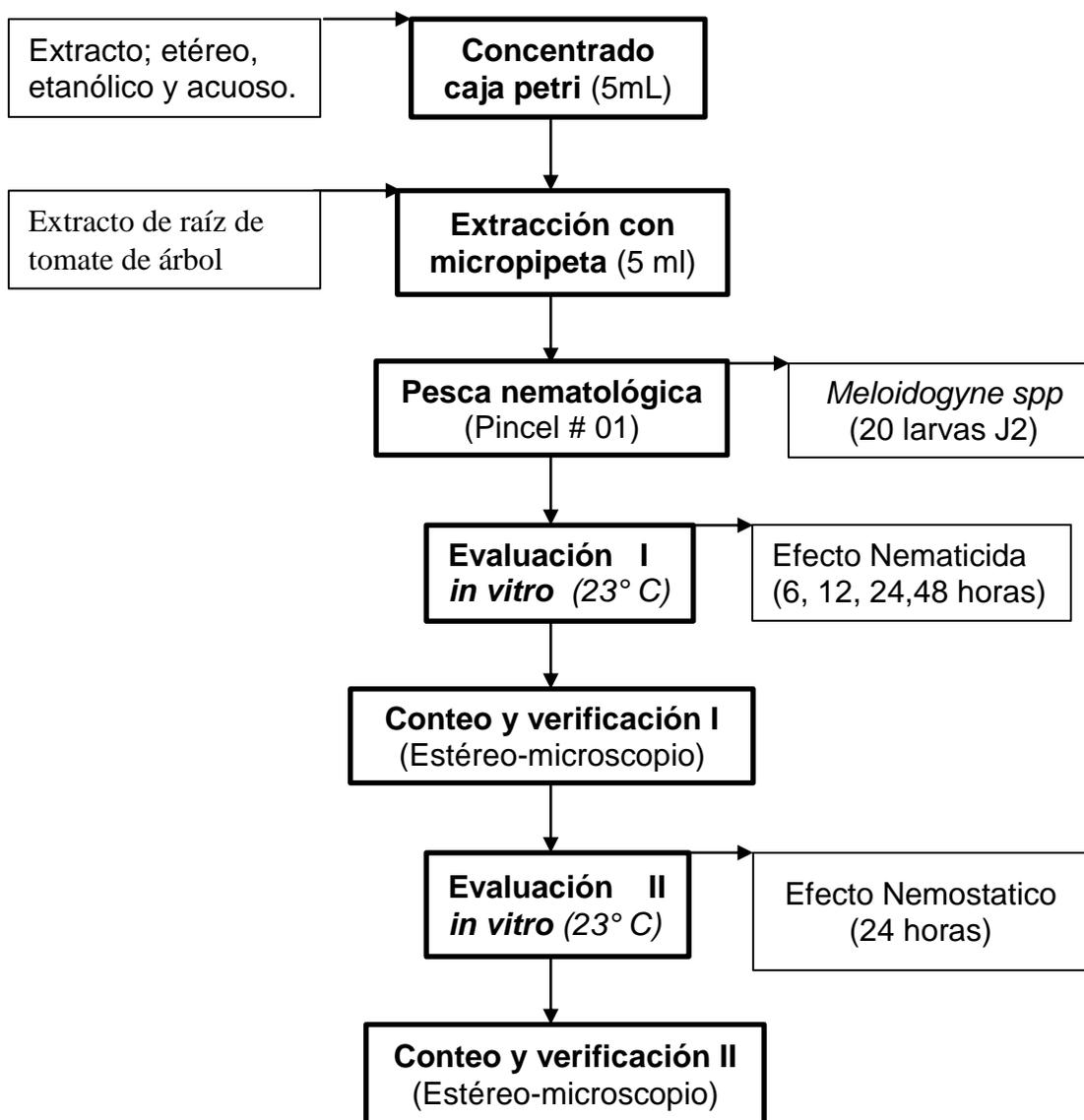


Fuente: Fuel, R. (2015)

3.5.6.6. Evaluación de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), con sus respectivos testigos (químico, absoluto y blanco) *in vitro* a 23°C.

El Gráfico 8 demuestra en un diagrama de bloques la evaluación de los extractos (etéreo y etanólico), que se la realizó en condiciones *in vitro* a una temperatura de 23 °C, siguiendo la metodología según; Pinkerton y Kitner, (2006)

Gráfico 8: Diagrama de bloques para la evaluación de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), con sus respectivos testigos (químico, absoluto y blanco) *in vitro*, a 23°C



Elaboración: Fuel R. (2015)

➤ Procedimiento

- a) Concentrado.- Se procedió a concentrar una dosis de 5ml, en cajas petri de 5 cm de diámetro de extracto (etéreo, etanólico, acuoso), en sus diferentes concentraciones, incluyendo el testigo químico (Rotenona 5%), testigo absoluto (Agua destilada), y testigo blanco (etanol), utilizando una micropipeta de 10 μ l
- b) Extracción.- Se extrajo una alícuota de 5 ml del extracto de raíz de tomate de árbol con una micropipeta, y se colocó la muestra en una caja petri debidamente rayado en bandas para facilitar la pesca e identificación de las larvas J2
- c) Pesca nematológica.- Se pescó 20 larvas móviles del género *Meloidogyne spp*, y se los agregó en cada unidad experimental (caja petri), que contenían a cada uno de los extractos con sus respectivas concentraciones en condiciones *in vitro*.
- d) Evaluación I.- Se evaluó el efecto nematocida de cada una de las unidades experimentales (caja petri), conteniendo los respectivos extractos a las (6, 12, 24, 48 horas, de exposición), Este proceso se lo realizó utilizando un pincel # 01, y con la unidad experimental bajo el lente de un estéreo-microscopio, se procedió a tocar la cabeza o cuerpo de los nemátodos para verificar su movilidad.
- e) Conteo y Verificación I.- Se contó e identificó con la ayuda de un estero-microscopio, la presencia de larvas móviles del género *Meloidogyne spp*. presentes en los diferentes extractos con sus respectivos testigos, después de ser expuesto a los extractos durante (6, 12, 24, 48 horas), utilizando una pestaña que permitió tocar la cabeza o el cuerpo del nemátodo y con la ayuda de un contador manual se realizó las respectivas confirmaciones de movilidad.
- f) Evaluación II.- Se evaluó el efecto nemostático después de presentar una inmovilidad del 100% con el (efecto nematocida), después de ser expuestos a los diferentes periodos de tiempo, Este proceso se lo realizó utilizando un

tamiz de 25 μm , al que se le agregó el contenido de cada unidad experimental que presentó un efecto nematicida, con la ayuda de una pizeta se procedió a lavar el contenido del tamiz de 25 μm , y su sobrenadante se depositó en agua destilada y se dejó en reposo por 24 horas

- g) Conteo y Verificación II.- Se contó e identificó con la ayuda de un estero-microscopio, la presencia de larvas móviles del género *Meloidogyne spp.* presentes en los diferentes extractos con sus respectivos testigos, después de ser expuesto al agua destilada por 24 horas, se utilizó una pestaña que permitió tocar la cabeza del nemátodo y con la ayuda de un contador manual se realizó las respectivas confirmaciones de movilidad para obtener un efecto nematicida total. (Fotografía 7).

Fotografía 7: .Evaluación de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso) en condiciones *in vitro*, a 23 °C



Fuente: Fuel, R. (2015)

3.6. PROCESAMIENTO, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

3.6.1. Selección del tejido vegetal (raíz), presente en el barbasco (*Thephrosia sinapou*).

La raíz de barbasco *Thephrosia sinapou*, pertenecientes a la familia Fabaceae, contiene gran cantidad de compuestos fenólicos que incluyen; flavonoides, rotenoides, terpenoides y esteroides y aceites esenciales (Meier, 1997). Estos compuestos han permitido tener un control de plagas y enfermedades debido a su función selectiva en cuanto a la actividad Fitoparasítica de insectos, ácaros y hongos.

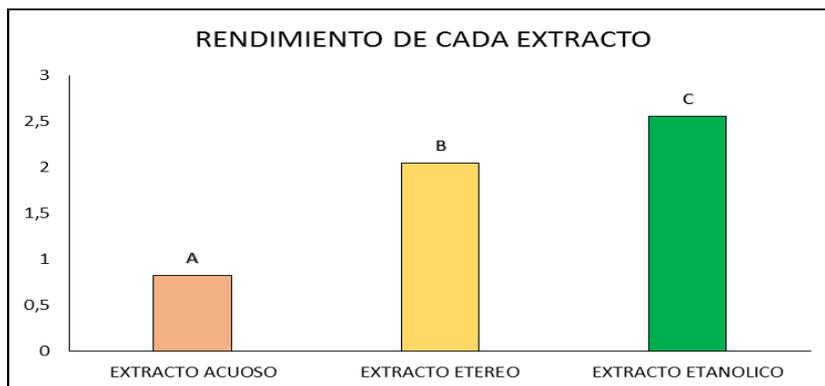
3.6.2. Rendimiento de la extracción; etérea, etanólica y acuosa, mediante la metodología de secado, triturado, macerado, filtrado y rotavaporado.

Cuadro 13: Prueba de significación Tukey al 5% para el rendimiento de los diferentes extractos utilizados en los diferentes tratamientos.

RENDIMIENTO EN CADA EXTRACTO	MEDIAS	RANGOS
EXTRACTO ACUOSO	0,83	A
EXTRACTO ETereo	2,05	B
EXTRACTO ETANOLICO	2,56	C
Medias = % de rendimiento Rangos = C; mayor B; medio y A; mínimo		

Elaboración: Fuel R. (2015)

Gráfica 9: Rendimiento en la obtención de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso).



Elaboración: Fuel R. (2015).

En el cuadro 13, se observa que si existe diferencia significativa en la obtención del rendimiento para cada extracto. El mayor rendimiento se presentó en el extracto etanólico con un porcentaje de 2,56% de extracto blando; con diferencia estadística significativa al que presentó el extracto etéreo con un porcentaje de 2,05% de extracto seco. Los anteriores rendimientos presentaron una diferencia estadística mayor al extracto acuoso que presentó un porcentaje de 0,83% de extracto fluido, considerado el valor más bajo en rendimiento con respecto a los demás tratamientos. (Gráfico 9).

3.6.3. Determinación de las características físicas – química de los extractos.

3.6.3.1. Características físico-químicas de los solventes orgánicos de polaridad creciente (éter, etanol y agua destilada)

Los parámetros físico- químicos, de los solventes orgánicos a utilizar, permiten identificar las características propias del extracto, mediante procesos de extracción simultánea y continua.

Cuadro 14: Características físicas y químicas de los solventes utilizados para el proceso de extracción vegetal.

Características Físicas				Características Químicas	Punto de ebullición
Solventes	Organolépticas: color, apariencia y olor	Densidad (g/cm ³)	Índice de Refracción	pH	°C
Agua Destilada	Líquido inodoro, incoloro e insípido	1,00	1,333	7	100
Alcohol 96%	Características ardientes, líquido incoloro y fácilmente inflamable	0,815	1,357	7	78
Éter 100%	Líquido, incoloro, con un bajo punto de ebullición de sabor acre y ardiente	0,703	1.426	7	34

Fuente: (Vasco, 2008)

En el cuadro 14, se puede observar las propiedades físico- químicas de los solventes orgánicos. El éter etílico al 100%, acorde a sus propiedades físico-químicas es un disolvente muy utilizado en la extracción de principios activos de tejidos de plantas y animales para la extracción de grasas y aceites, ceras resinas, gomas, perfumes, alcaloides, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, hidrocarburos esenciales, en más ligero que el agua, con punto de ebullición bajo, lo que facilita su fácil recuperación en un rotavapor. A diferencia del etanol, que se presenta en condiciones normales de presión y temperatura como un líquido incoloro (Vasco, 2008)

3.6.3.2. Características físicas y químicas de los extractos; etéreo, etanólico y acuoso en condiciones *in vitro*.

Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros: cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros. Algunos son de color café amarillento otros rojizos como lo manifiesta; CORPOICA (2007). Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen, cuando son mal preparados adquieren olor a caramelo o confitura poco conocido, la

solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometido de acuerdo con Archila (2008). Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad , a diferencia de los extractos alcohólicos que son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución en el mismo título alcoholímetro del alcohol con el cual han sido preparados. (García & Carrion, 2010).

Cuadro 15: Características físicas y químicas de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso) *in vitro*.

Características Físicas						Característica Químicas
Extracto	Organolépticas: color, apariencia y olor	Índice de	Concentración	Densidad	Índice de	pH
		Dosis Letal	%	(g/cm ³)	Refracción	
Etéreo	Líquido de color (amarillo canario) con sabor acre ardiente	Alto	41,67	1.238	29,00	4,03
		Medio	31,25	1.005	28,00	4,23
		Bajo	20,83	0.987	14,00	4,40
		Mínimo	10,42	0.657	7,00	4,60
Etanólico	Líquido de color (rojo oscuro) con sabor acre ardiente	Alto	44,01	1.376	7,00	5,70
		Medio	33,01	1.153	5,00	5,71
		Bajo	22,01	1.003	4,00	5,73
		Mínimo	11,00	0.986	2,00	5,75
Acuoso	Líquido de color (amarillo oscuro) con sabor y olor característicos	Alto	0.143	0.914	1,00	5,45
		Medio	0.107	0.786	0,80	5,47
		Bajo	0.072	0.678	0,60	5,50
		Mínimo	0.036	0.654	0,40	5,70

Elaboración: Fuel R. (2015)

En el cuadro 15, se observa las propiedades físico – química, de las diferentes dosis letales (etérea, etanólica y acuosa), en sus respectivas concentraciones (Alta, Media, Baja y Mínima). El extracto etéreo presentó una consistencia firme pilular de color amarillo claro, insoluble en agua, con un posible efecto nematocida y/o nemostático por acidez, debido a los valores de pH e índice de refracción que presentaron en los análisis., diferencia significativa presentó el extracto acuoso, con

una consistencia fluida de color amarillo obscura, totalmente soluble en agua, determinando que es un extracto bien preparado, con un pH estable, descartando un posible efecto nematocida y/o nemostático por acidez. A diferencia del extracto etanólico que presentó una consistencia blanda de color rojo oscuro, poco soluble en agua. Identificándolo como un extracto bien preparado debido a su bajo índice de refracción, con un pH estable, descartando un posible efecto nematocida por acidez.

3.6.4. Obtención de las dosis letales (alta, media, baja y mínima), de los extractos (etéreo etanólico y acuoso), con sus respectivas testigos (químico, blanco y absoluto).

3.6.4.1. Dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima), del extracto etéreo a partir de su respectiva solución madre

En varias investigaciones el éter, es utilizado como solvente orgánico de extractos puros, que han permitido la obtención de componente fitoquímicos como lo son; los pertenecientes al grupo de los terpenoides, compuestos fenólicos y derivados de nitrógeno, que se encuentran en diferentes partes de los tejidos vegetales. (Archila, 2008).

Cuadro 16: Componentes de la solución madre etérea

Solución madre etérea 41.67 %	
Extracto etéreo (g)	10
Disolvente (etanol) ml	24

Fuente: Fuel, R. (2015)

Fotografía 8: Solución madre etérea diluido en etanol al 96%



Fuente: Fuel, R. (2015)

En el cuadro 16, se observa los componentes que formaron parte de la solución madre, previo a la obtención de la solución madre, se realizó ensayos de dilución del extracto etéreo en agua destilada. El resultado fue una total insolubilidad en agua, por lo tanto el extracto etéreo se diluyó en etanol al 96%. (Fotografía 8)

Cuadro 17: .Dosis Letales del extracto etéreo y sus respectivas concentraciones *in vitro*.

Extracto etéreo <i>in vitro</i>		
Tratamiento	Concentración (%)	Dosis Letal
Solución madre	41.67	Alta
2	31.25	Media
3	20.83	Baja
4	10.42	Mínima

Fuente: Fuel, R. (2015)

Fotografía 9: Dosis Letales del extracto etéreo *in vitro*,



Fuente: Fuel, R. (2015)

En el cuadro 17, se observa las diferentes dosis letales aplicadas *in vitro*. Para la obtención de las respectivas dosis. La solución madre (Dosis letal alta) de 41,67 % fue diluida en agua destilada para obtener dosis (Media, Baja y Mínima) con concentrados etéreos de; 31,25% - 20,83% y 10,42 %, respectivamente, para su evaluación como agente nematocida en dosis de 5 ml (Fotografía 9).

3.6.4.2. Dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima), del extracto etanólico a partir de su respectiva solución madre

Los extractos etanólicos de raíz, poseen un color característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. (Archila, 2008). Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto.

Cuadro 18: Componentes de la solución madre etanólica.

Solución madre etanólica 44.01 %	
Extracto impuro etanólico (g)	10
Disolvente (etanol) mL	22.72

Fuente: Fuel, R. (2015)

Fotografía 10: Solución madre etanólica



Fuente: Fuel, R. (2015)

En el cuadro 18, se observa los componentes de la solución madre etanólica que fue obtenida después de realizar varios ensayos de dilución en agua. El resultado fue una baja insubilidad. Por la tanto se procedió a diluir en etanol al 96%, para obtener la solución madre de 44.01%. (Fotografía 10)

Cuadro 19: Dosis Letales etanólicas *in vitro*.

Extracto etanólico		
Tratamiento	Concentración (%)	Dosis Letal
Solución madre	44.01	Alto
2	33.01	Medio
3	22.01	Bajo
4	11	Mínimo

Fuente: Fuel, R. (2015)

Fotografía 11: .Dosis Letales del extracto etanólico *in vitro*



Fuente: Fuel, R. (2015)

En el cuadro 19, se observa las diferentes dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima), aplicadas *in vitro*, sobre *Meloidogyne spp* en condiciones *in vitro*. La solución madre de 41,01 % de concentrado etanólico, cuya solución se diluyó en agua destilada y así, se obtuvieron concentraciones de (33,01; 22,01 y 11,00 %), determinadas como dosis letales (Media, Baja y Mínima), cuyas dosis fueron evaluadas como posible agente nematocida en dosis de 5 ml. (Fotografía 11).

3.6.4.3. Dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima), del extracto acuoso a partir de su respectiva solución madre

Se han realizado aportes significativos sobre los efectos nematocidas de algunas plantas de las cuales se usan el tejido total de la planta, o partes de la misma en forma de extractos acuosos o simplemente como abonos verdes, con resultados prometedores (Archila, 2008).

Cuadro 20: Dosis Letales del extracto acuoso *in vitro*

Extracto acuoso		
Tratamiento	Concentración (%)	Dosis Letal
Solución madre	0.14	Alto
2	0.1	Medio
3	0.07	Bajo
4	0.03	Mínimo

Fuente: Fuel, R (2015)

Fotografía 12: Dosis Letales del extracto acuoso *in vitro*



Fuente: Fuel, R. (2015)

En el cuadro 20, se observa las diferentes dosis letales aplicadas *in vitro*, sobre *Meloidogyne spp* en condiciones *in vitro*. La concentración del 0,14 % fue la misma solución madre, a partir de ella se obtuvieron diluciones de 0,10%; 0,07% y 0,03 % con agua destilada y se evaluó su poder nematicida en dosis de 5 ml (Fotografía 12)

3.6.4.4. Dosis alta del testigo blanco (etanol 96%)

Cuadro 21: Dosis Letales del testigo blanco (etanol 96%) *in vitro*.

Blanco		
Tratamiento	Concentración (%)	Dosis Letal
Solución madre	96	Alto
2	72	Medio
3	48	Bajo
4	24	Mínimo

Fuente; Fuel, R. (2015)

Fotografía 13: Dosis Letales del testigo blanco (etanol 96) *in vitro*



Fuente: Fuel, R. (2015)

En el cuadro 21, se observa la concentración del testigo blanco a base de etanol al (24%, 48%, 72% y 96%) El propósito de obtener un testigo blanco, es comprobar su eficacia como posible nematocida, con respecto a los extractos a los cuales se los diluyó con este solvente. (Fotografía 13)

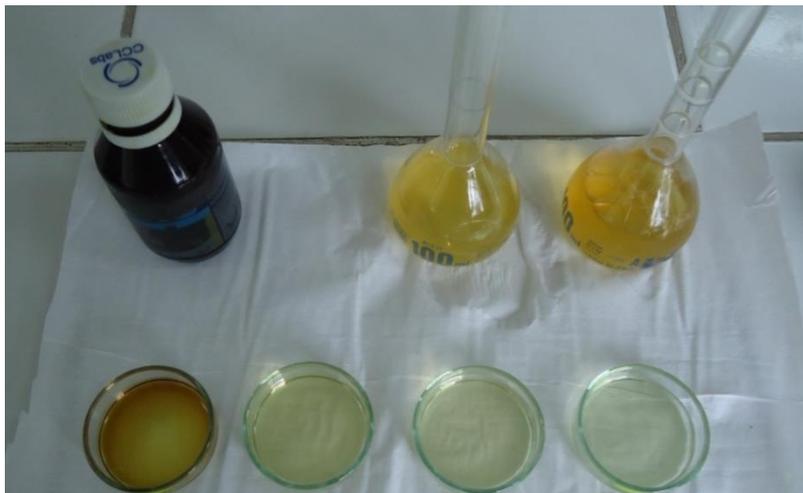
3.6.4.5. Dosis letal alta del testigo químico (Rotenona) y del testigo absoluto (Agua destilada).

Cuadro 22: Dosis letales del testigo químico y absoluto *in vitro*

Testigo	Concentración %
Agua Destilada	100
Rotenona 5%	0.17

Fuente: Fuel, R. (2015)

Fotografía 14: .Dosis Letal del testigo químico (Rotenona) *in vitro*.



Fuente: Fuel, R. (2015)

En el Cuadro 22, se observa las concentraciones de los testigos (químico y absoluto). Para la estandarización de la concentración del insecticida (Rotenona), aplicada sobre los nemátodos, se tuvieron en cuenta ensayos previos al establecimiento de esta investigación, donde se aplicó la dosis recomendada por un nematicida, la cual era de 240 ppm, aunque tal dosis tenía un efecto nematicida del 0.9% sobre *Meloidogyne spp*, 48h después de ser aplicado. Por lo cual se aumentó la dosis del insecticida (Rotenona), a 1680 ppm o 0.17% de concentrado (datos no mostrados), donde se obtuvo una mortalidad del 99% en las primeras 6 h de

exposición *in vitro* con dosis de 5 ml. (Fotografía 14). Esto permitió realizar comparaciones con los demás extractos en sus diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

3.6.5. Identificación y aislamiento del nemátodo agallador (*Meloidogyne spp*), presente en la raíz del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*).

3.6.5.1. Características Macroscópicas (Agallamiento radicular)

En el Gráfico 10, se observa un índice de agallamiento significativo, cuya muestra fue receptada por el laboratorio de Nematología de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD. Las muestras provienen de las principales zonas productoras de tomate de árbol, en la provincia del Carchi. (Fotografía 15)

Gráfico 10: Índice de agallamiento en base a una escala de severidad de 0 a 6.

Escala	Criterio	Sintomatología
0	Raíz sana	raíz sana
1	Leve Nodulación	1 al 10%
2	Nodulación leve	11 al 20%
3	Nodulación media	21 al 40%
4	Nodulación moderada	41 al 70%
5	Nodulación alta	71 al 90%
6	Nodulación extrema	91 al 100%

Fuente: (Barker 1985)

Fotografía 15: Sistema radicular de plantas de tomate de árbol con nemátodos del género *Meloidogyne spp*



Fuente: Fuel R. (2015)

3.6.5.2. Características Microscópicas (*Meloidogyne spp*)

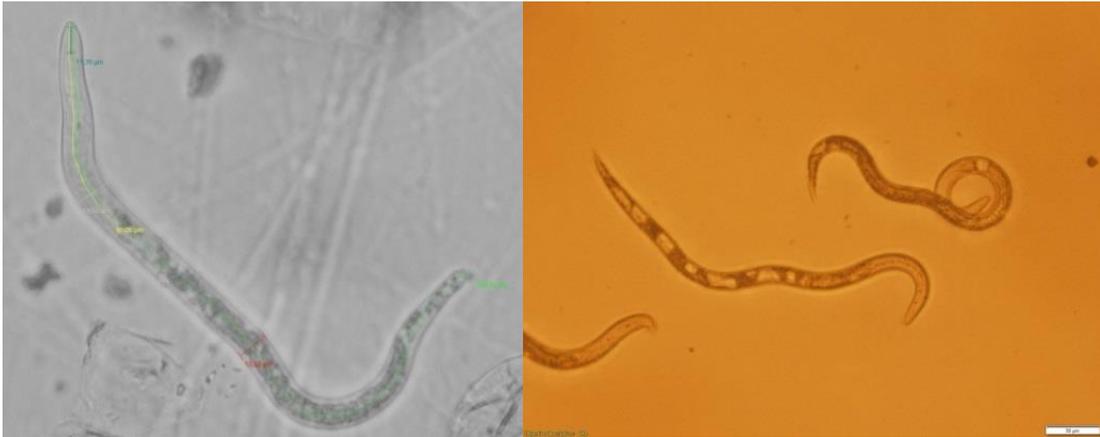
Después de realizar la extracción de muestra, utilizando el método de Stemerding, y tamizado recomendado por Román (2013), se procedió a la identificación de larvas J2 pertenecientes al género *Meloidogyne spp*, presentes en el sistema radicular de la raíz de tomate de árbol *Cyphomandra Betacea*.

3.6.5.2.1. Identificación Morfológica del género *Meloidogyne spp*, en *Cyphomandra Betacea*.

En la Fotografía 16, .se puede observar las medidas útiles para la identificación morfológica basadas en la longitud total de las larvas del género *Meloidogyne spp*, de 346 - 463 μm , en la longitud de la cola de 42 – 62 μm , desde el final de la cabeza a la base del estilete de 14 – 16 μm . La identificación se la pudo realizar con el uso de claves taxonómicas y morfométricas mediante equipos de microscopio óptico

invertido y de un estéreo microscopio (Peraza, Walter; Rosales, Johaner; Esquivel, Alejandro; Hilje, Irena; Molina, Ramon; Castillo, Pablo, 2013)

Fotografía 16: Nemátodo del género *Meloidogyne spp*, estadio J2 presente en la raíz de tomate de árbol *Cyphomandra Betacea*.



Fuente: FUEL, R. (2015)

3.6.6. Evaluación de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), con sus respectivos testigos (químico, absoluto y blanco), sobre *Meloidogyne spp*, en tomate de árbol *Cyphomandra betacea*.

Algunas plantas poseen químicos que resultan tóxicos a los nemátodos como lo son; fenoles, taninos azadirachtinas, ricinas alcaloides y glicosidos. (Reina et al., 2002). Estos compuestos tóxicos, tienen la capacidad de adherirse fuertemente a los anfidios de los nemátodos fitoparásitos como *Meloidogyne spp*, alterando su mecanismo quimiotáctico.

3.6.6.1. Efecto nematicida de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), sobre el nemátodo agallador *Meloidogyne spp*, en condiciones *in vitro*.

Cuadro 23: ADEVA para el análisis del efecto Nematicida.

F.V.	GL	SC	CM	F	F .TAB 5%	F.TAB 1%
Total	203	115147.43	567.2287192			
TRATAMIENTOS	50	114678.68	2293.5736	3.64	1,4382 ns	1,6582 ns
EXTRACTO	2	72790.89	36395.445	57.69	3,0588 ns	4,7476 ns
% CONCENTRACION	3	15419.14	5139.713333	8.15	2,6594 ns	3,9082 ns
TIEMPO	3	2685.81	895.27	1.42	2,6594*	3,9082**
EXTRACTO*% CONCENTRACION	6	1941.41	323.5683333	0.51	2,1588*	2,9182**
EXTRACTO*TIEMPO	6	637.24	106.2066667	0.17	2,1588*	2,9182**
% CONCENTRACION*TIEMPO	9	272.01	30.22333333	0.05	1,9394*	2,5282**
EXTRACTO*% CONCENTRACION*TIEMPO	18	497.14	27.61888889	0.04	3,8994*	6,8097**
TRATAMIENTOS QUIMICOS VS TRATAMIENTO ABSOLUTO	1	19551.04	19551.04	30.99	3,8994 ns	6,8097 ns
TRATAMIENTO QUIMICO BLANCO VS TRATAMIENTO QUIMICO	1	253.13	253.13	0.40	3,8994*	6,8097**
TESTIGOS VS RESTO	1	630.89	630.89			
ERROR	153	431.25				
CV	2.40%					
X	72.87%					

** = significativo al 1%; * = significativo al 5%; ns = no significativo

Elaboración: Fuel R. (2015).

En el análisis de varianza (cuadro 23), se observa que existe diferencia estadística significativa entre tratamientos y bloques (% concentración, y Tiempo de exposición) a nivel del porcentaje de mortalidad (efecto Nematicida), El coeficiente de variación, en esta medición, es 2,40%, con un promedio del experimento del 72,87%.

Cuadro 24: Prueba de significación Tukey al 5% para cada uno de los tratamientos y la acción del efecto Nematicida.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	RANGOS
TRATAMIENTO ABSOLUTO (AGUA DESTILADA)	8,75	A
EXTRACTO ACUOSO	21,25	B
EXTRACTO ACUOSO	25	B
EXTRACTO ACUOSO	30	C
EXTRACTO ACUOSO	33,75	C
EXTRACTO ACUOSO	38,75	D
EXTRACTO ACUOSO	38,75	D
EXTRACTO ACUOSO	40	D
EXTRACTO ACUOSO	42,5	D E
EXTRACTO ACUOSO	46,25	E
EXTRACTO ACUOSO	53,75	F
EXTRACTO ACUOSO	55	F G
EXTRACTO ACUOSO	58,75	G
EXTRACTO ACUOSO	58,75	G
EXTRACTO ACUOSO	63,75	H
EXTRACTO ACUOSO	63,75	H
EXTRACTO ACUOSO	65	H
EXTRACTO ETANOLICO	70	I
EXTRACTO ETANOLICO	70	I
EXTRACTO ETANOLICO	70	I
EXTRACTO ETEREO	75	J
EXTRACTO ETANOLICO	75	J
EXTRACTO ETEREO	75	J
EXTRACTO ETEREO	81,25	K
EXTRACTO ETEREO	81,25	K
EXTRACTO ETANOLICO	85	K L
EXTRACTO ETANOLICO	85	K L
EXTRACTO ETANOLICO	85	K L
EXTRACTO ETANOLICO	85	K L
EXTRACTO ETANOLICO	85	K L
EXTRACTO ETANOLICO	85	K L
EXTRACTO ETANOLICO	85	K L
EXTRACTO ETEREO	85	K L
EXTRACTO ETEREO	86,25	L M
EXTRACTO ETANOLICO	88,75	L M N
TRATAMIENTO QUIMICO BLANCO	88,75	L M N
EXTRACTO ETEREO	88,75	L M N
EXTRACTO ETEREO	90	M N O
EXTRACTO ETEREO	90	M N O
EXTRACTO ETANOLICO	90	M N O
EXTRACTO ETANOLICO	90	M N O
EXTRACTO ETEREO	91,25	N O P
EXTRACTO ETANOLICO	91,25	N O P
EXTRACTO ETEREO	93,75	O P Q
EXTRACTO ETANOLICO	95	P Q
EXTRACTO ETEREO	96,25	Q R
EXTRACTO ETEREO	100	R
EXTRACTO ETANOLICO	100	R
EXTRACTO ETEREO	100	R
EXTRACTO ETEREO	100	R
EXTRACTO ETEREO	100	R
TRATAMIENTO QUIMICO ROTENONA	100	R

Elaboración: Fúel R. (2015).

En el cuadro 24, se evidencia el efecto nematicida en condiciones *in vitro*, de cada uno de los extractos y sus respectivos testigos. El mayor efecto nematicida es representado por el testigo químico (Rotenona), con escasa diferencia significativa, frente al extracto etéreo y etanólico, cuyo efecto nematicida es similar al testigo blanco (etanol). Los anteriores tratamientos presentan una diferencia estadísticamente significativa mayor, frente al extracto acuoso, cuyo testigo absoluto representado por agua destilada, presenta un reducido efecto nematicida frente a los demás tratamientos.

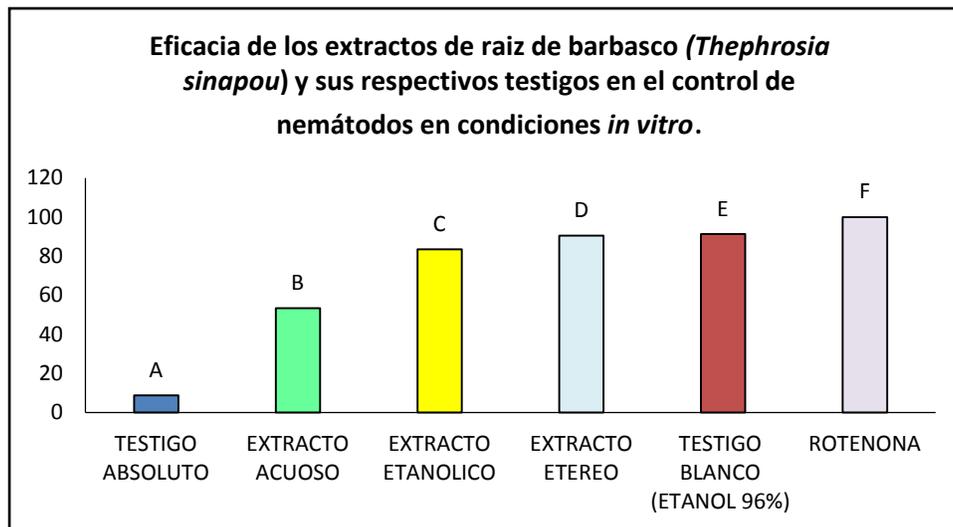
Cuadro 25: Prueba de significación Tukey al 5% para el tipo de Extracto.

TIPO DE EXTRACTO	MEDIAS	RANGOS
TESTIGO ABSOLUTO	8,75	A
EXTRACTO ACUOSO	53,44	B
EXTRACTO ETANOLICO	83,52	C
EXTRACTO ETEREO	90,55	D
TESTIGO BLANCO (ETANOL 96%)	91,25	E
ROTENONA	100	F

MEDIAS= % de mortalidad de nematodos
RANGOS= F; mayor mortalidad y A; mínima mortalidad

Elaboración: Fuel R. (2015).

Gráfico 11: Tipos de extractos, con sus respectivos testigos, utilizados para evaluar el efecto Nematicida.



Elaboración: Fuel R. (2015).

Como se puede observar en el cuadro 25. Los promedios de mortalidad más altos, lo tuvo el testigo químico (Rotenona), con 100% de mortalidad, seguidamente el testigo blanco (etanol), con un índice de mortalidad de 91.25%, significativamente similar al que presentó el extracto etéreo con un efecto nematicida de 90.55%, diferencia significativa frente al extracto etanólico con 83.52% de mortalidad de nemátodos fitoparasitarios, cuyo efecto fue estadísticamente superior al extracto acuoso que presentó una mortalidad de 53.44%. Los valores anteriores son estadísticamente superiores al que presentó el testigo absoluto (agua destilada) con un índice bajo de mortalidad de 8.75% (Gráfico 11).

3.6.6.2. Efecto del extracto etéreo de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), sobre el nemátodo agallador (*Meloidogyne spp*) *in vitro*.

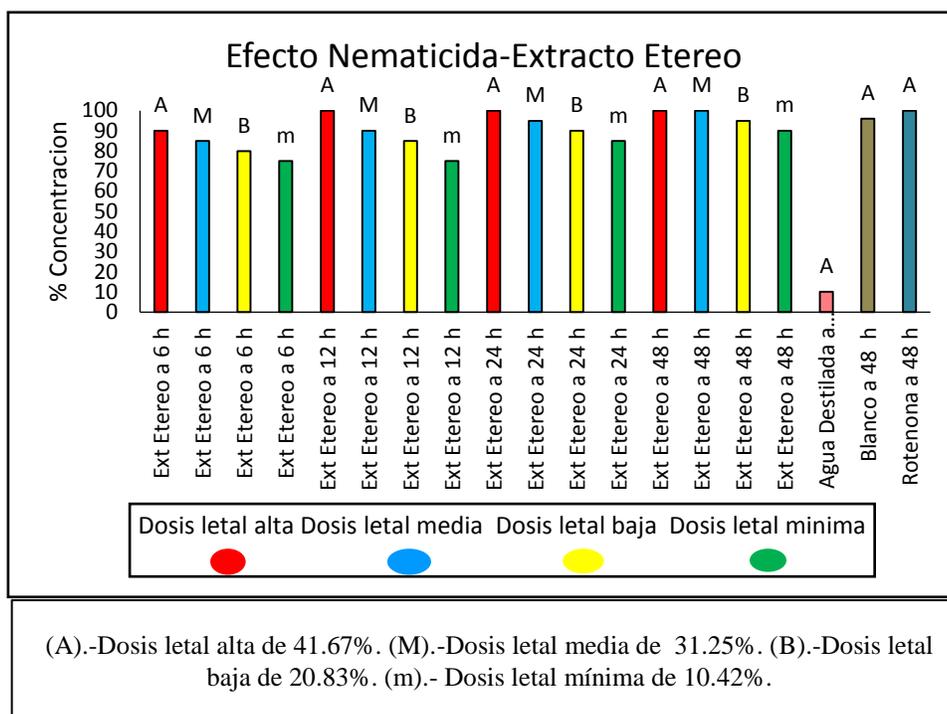
Podemos observar en el cuadro 26, las diferentes dosis letales etéreas expuestas *in vitro*, evaluadas en cuatro periodos de tiempo (6, 12, 24 y 48 horas), sobre veinte nemátodos del género agallador *Meloidogyne spp*, en dosis de 5 ml. Las concentraciones fueron evaluadas como dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima).

Cuadro 26: Efecto nematocida del extracto etéreo, sobre el nemátodo agallador *Meloidogyne spp*, en condiciones *in vitro* a 23 °C.

TRATAMIENTOS		% MORTALIDAD
DOSIS LETAL		
Ext etéreo a 6 h	Alta	90
Ext etéreo a 6 h	Media	85
Ext etéreo a 6 h	Baja	80
Ext etéreo a 6 h	Mínima	75
Ext etéreo a 12 h	Alta	100
Ext etéreo a 12 h	Media	90
Ext etéreo a 12 h	Baja	85
Ext etéreo a 12 h	Mínima	75
Ext etéreo a 24 h	Alta	100
Ext etéreo a 24 h	Media	95
Ext etéreo a 24 h	Baja	90
Ext etéreo a 24 h	Mínima	85
Ext etéreo a 48 h	Alta	100
Ext etéreo a 48 h	Media	100
Ext etéreo a 48 h	Baja	95
Ext etéreo a 48 h	Mínima	90
Agua Destilada a 48 h	Alta	10
Blanco a 48 h	Alta	96
Rotenona a 48 h	Alta	100

Elaboración: Fuel R. (2015)

Gráfico 12: Efecto nematicida en el extracto etéreo *in vitro* a 23 ° C



Elaboración: Fuel R. (2015).

En el Cuadro 20. evidencia un efecto nematicida de 100% con DLA , entre (12 a 48 h) de exposición, similar efecto tuvo la DLM a las 48 h, conjuntamente con el testigo químico (Rotenona), que presentó un efecto nematicida mayor de 100 %, entre (6 a 48 h), seguido del testigo blanco (etanol), que tuvo una mortalidad de 96%, en 48 h, este valor es similar al efecto nematicida que presentó la DLM y DLB de 95% entre (24 48 h); sin embargo, se evidenció una mortalidad menor de 90%, para la (DLA, DLM, DLB y DLm) en (6, 12, 24 y 48 h), respectivamente. Posteriormente se evidencia una mortalidad de 85% con (DLM, DLB y DLm) en (6, 12 y 24 h), respectivamente. Un efecto nematicida menor de 80%, se evidenció con la DLB en 6h de exposición *in vitro*, frente al 75% de la DLm entre (6 a 12h) de estar expuestos los nemátodos al extracto. Los anteriores tratamientos presentan una diferencia estadística superior a la del testigo absoluto (agua destilada) que tuvo una mortalidad muy reducida como nematicida de 10%, (Gráfico 12)

3.2.6.3. Efecto del extracto etanólico de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), sobre el nemátodo agallador (*Meloidogyne spp*) *in vitro* a 23 °C.

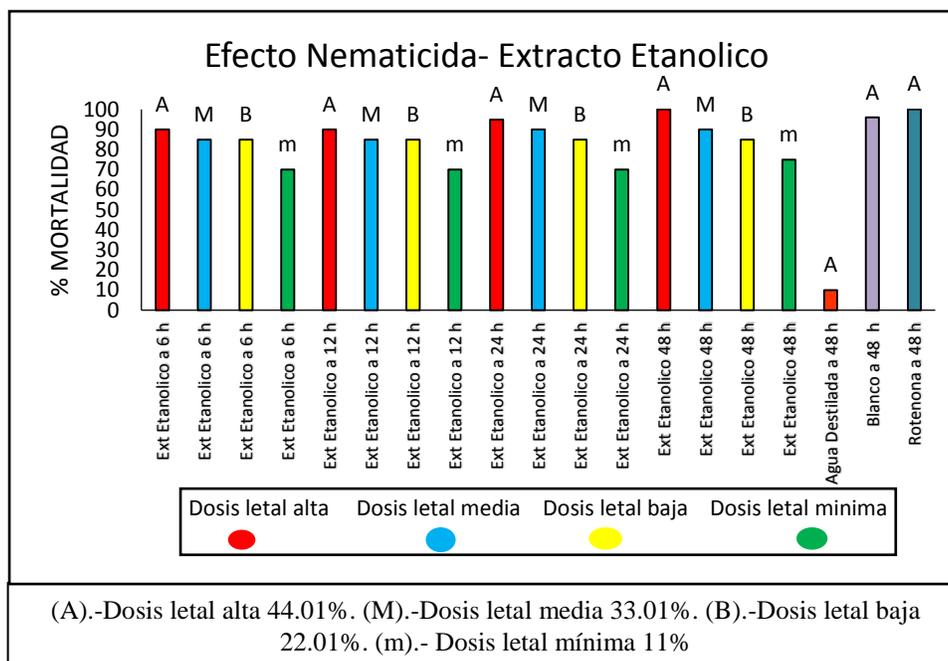
En el cuadro 27, podemos observar el porcentaje de mortalidad de los diferentes tratamientos (extractos etanólicos), evaluados en distintas dosis letales (Alta, Media, Baja y Mínima), en condiciones *in vitro*, en cuatro tiempos de exposición de (6, 12, 24 y 48 h), sobre veinte nemátodos del género *Meloidogyne spp*, cuya dosis de aplicación fue de 5 mL

Cuadro 27: Efecto nematocida del extracto etanólico, sobre el nemátodo agallador *Meloidogyne spp*, en condiciones *in vitro* a 23°C.

TRATAMIENTOS	DOSIS LETAL	% MORTALIDAD
Ext etanólico a 6 h	Alta	90
Ext etanólico a 6 h	Media	85
Ext etanólico a 6 h	Baja	85
Ext etanólico a 6 h	Mínima	70
Ext etanólico a 12 h	Alta	90
Ext etanólico a 12 h	Media	85
Ext etanólico a 12 h	Baja	85
Ext etanólico a 12 h	Mínima	70
Ext etanólico a 24 h	Alta	95
Ext etanólico a 24 h	Media	90
Ext etanólico a 24 h	Baja	85
Ext etanólico a 24 h	Mínima	70
Ext etanólico 48 h	Alta	100
Ext etanólico 48 h	Media	90
Ext etanólico 48 h	Baja	85
Ext etanólico 48 h	Mínima	75
Agua Destilada a 48 h	Alta	10
Blanco a 48 h	Alta	96
Rotenona a 48 h	Alta	100

Elaboración: Fuel R. (2015)

Gráfico 13: Efecto nematicida en el extracto etanólico *in vitro* a 23 °C



Elaboración: Fuel R. (2015)

Se evidencia una mortalidad de 100% con DLA en 48 h de exposición *in vitro*, similar efecto nematicida se evidenció con el testigo químico (Rotenona), similar efecto nematicida de 96% tuvo el testigo blanco (etanol) en 48h, cuyo efecto nematicida es significativamente similar el que presentó la DLA en 24 h, con 95% de mortalidad; sin embargo, los anteriores valores son estadísticamente mayores al 90% de mortalidad, que demostró la DLA entre (6 a 12h), similar efecto nematicida presentó la DLM entre (24 a 48 h) de exposición *in vitro*, estos valores presentan una diferencia estadística mayor frente al 85% de mortalidad que tuvo la DLM entre (6 a 12 h) y la DLB entre (6 a 24), de estar expuestos al producto, con diferencia significativa al efecto nematicida de 75%, en 48 h de exposición, que produjo la DLm. Los anteriores tratamientos presentan una mortalidad estadística superior frente al 70% que presentó la DLm entre (6 a 24h), de exposición en condiciones *in vitro*. A diferencia del testigo absoluto (agua destilada) que obtuvo una eficiencia muy reducida como nematicida de 10%, frente a los demás tratamientos. (Gráfico 13)

3.2.6.4. Efecto del extracto acuoso de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), sobre el nemátodo agallador (*Meloidogyne spp*) *in vitro* a 23 °C.

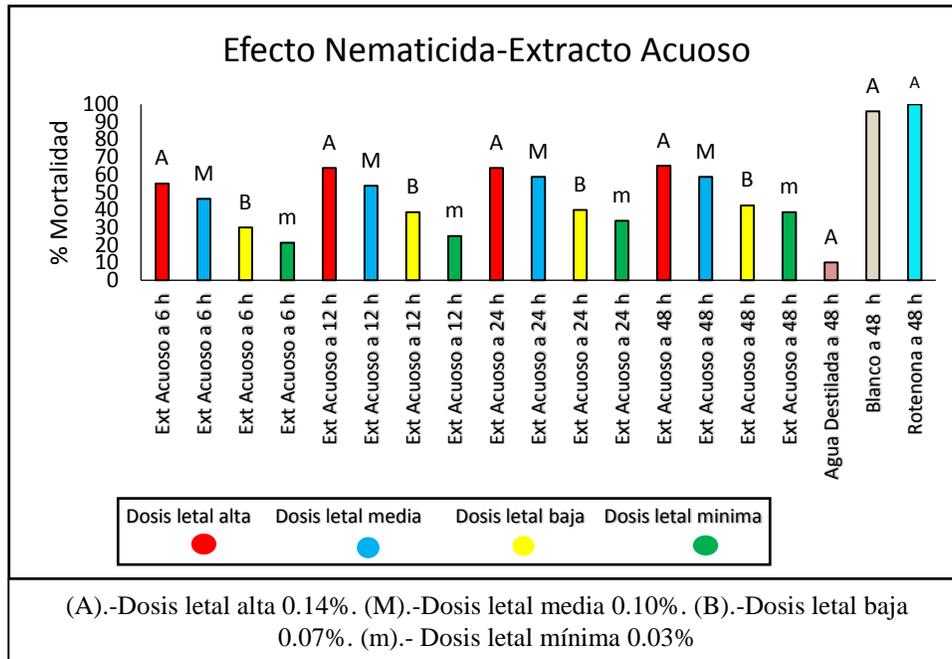
En el cuadro 28, se puede observar las dosis letales acuosas (Alta, Media, Baja y Mínima) expuestas a evaluación en condiciones *in vitro*, sobre veinte nemátodos del género *Meloidogyne spp*, en cuatro tiempos diferentes de exposición (6, 12, 24y 48h), aplicado en dosis de 5 ml.

Cuadro 28: Efecto nematocida del extracto acuoso, sobre el nemátodo agallador *Meloidogyne spp*, en condiciones *in vitro* a 23 °C.

TRATAMIENTOS	DOSIS LETAL	% MORTALIDAD
Ext Acuoso a 6 h	Alta	55
Ext Acuoso a 6 h	Media	46,25
Ext Acuoso a 6 h	Baja	30
Ext Acuoso a 6 h	Mínima	21,25
Ext Acuoso a 12 h	Alta	63,75
Ext Acuoso a 12 h	Media	53,75
Ext Acuoso a 12 h	Baja	38,75
Ext Acuoso a 12 h	Mínima	25
Ext Acuoso a 24 h	Alta	63,75
Ext Acuoso a 24 h	Media	58,75
Ext Acuoso a 24 h	Baja	40
Ext Acuoso a 24 h	Mínima	33,75
Ext Acuoso a 48 h	Alta	65
Ext Acuoso a 48 h	Media	58,75
Ext Acuoso a 48 h	Baja	42,5
Ext Acuoso a 48 h	Mínima	38,75
Agua Destilada a 48 h	Alta	10
Blanco a 48 h	Alta	96
Rotenona a 48 h	Alta	100

Elaboración: Fuel R. (2015)

Gráfico 14: Efecto nematicida en el extracto acuoso *in vitro* a 23 °C



Elaboración: Fuel R. (2015).

El mayor efecto nematicida lo tuvo el testigo químico (Rotenona) con 100% de mortalidad entre (6 a 48 h), similar al del testigo absoluto (etanol), con 96% de mortalidad en 48 h de estar expuestos al producto. Posteriormente la DLA acuosa, tuvo un efecto nematicida de 65% en 48 h, y 63.75% entre (12 a 24h) de exposición *in vitro*, con efecto nematicida menor de 58.75%, presentó la DLM entre (24 a 48 h), con diferencia estadística de 55% de mortalidad, tuvo la DLA en 6 h, similar efecto nematicida tuvo la DLM, con 53.75% de mortalidad en 12h, frente al 46.25% de mortalidad que tuvo la DLM en 6 h, efecto nematicida superior al 42.5% que evidenció la DLB en 48 h, cuyo efecto nematicida similar presentó la DLB con 40% de mortalidad en 24 h. Estos valores son estadísticamente superiores al 38.75%, que presentó la DLB en 12h, y la DLM en 48 h, valores superiores frente al efecto nematicida de 33.75% de la DLM en 24h, seguido de la DLB con 30% en 6 h, y la DLM de 25% en 12 h, finalizando con un efecto nematicida de 21.25% en 6h frente al testigo absoluto (agua destilada) que obtuvo una eficiencia muy reducida como nematicida de 10%, con respecto a los anteriores tratamientos. (Gráfico 14).

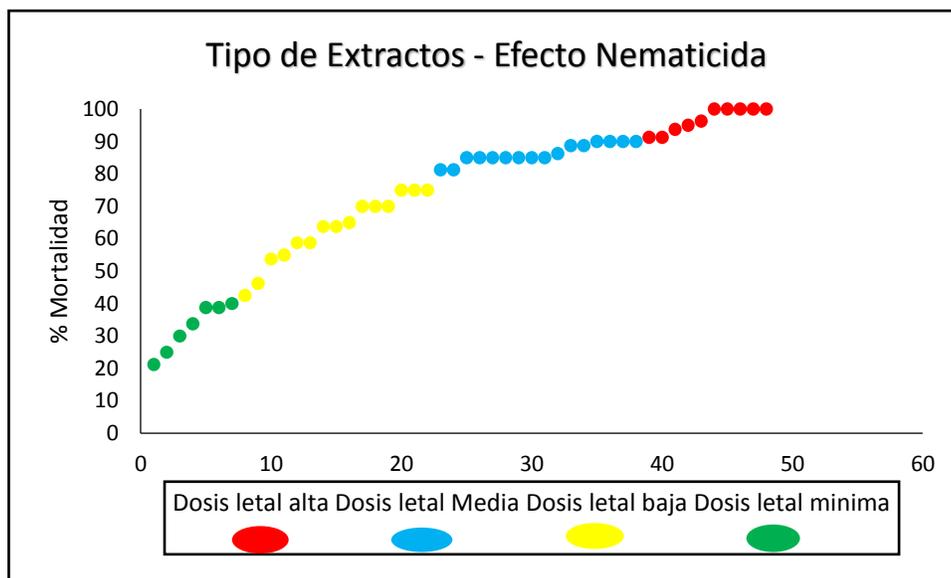
Porcentaje del efecto nematocida *in vitro* de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso).

Cuadro 29: Prueba de significación Tukey al 5% para el tipo de extracto, tipo de concentración y su relación con los diferentes tiempos empleados en el efecto Nematocida.

EXTRACTO- %CONCENTRACION - TIEMPO	Medias	RANGOS
Ext Acuoso con % concentracion minima sometido a 6 horas	36,25	A
Ext Acuoso con % concentracion Baja sometido a 6 horas	40	A
Ext Acuoso con % concentracion minima sometido a 12 horas	40	A
Ext Acuoso con % concentracion baja sometido a 48 horas	48,75	B
Ext Acuoso con % concentracion minima sometido a 48 horas	48,75	B
Ext Acuoso con % concentracion baja sometido a 12 horas	50	B C
Ext Acuoso con % concentracion media sometido a 6 horas	51,25	B C
Ext Acuoso con % concentracion baja sometido a 24 horas	52,5	B C
Ext Acuoso con % concentracion minima sometido a 24 horas	53,75	B C D
Ext Acuoso con % concentracion alta sometido a 6 horas	55	C D
Ext Acuoso con % concentracion media sometido a 12 horas	58,75	D E
Ext Acuoso con % concentracion media sometido a 24 horas	63,75	E F
Ext Acuoso con % concentracion alta sometido a 24 horas	63,75	E F
Ext Acuoso con % concentracion alta sometido a 48 horas	63,75	E F
Ext Acuoso con % concentracion media sometido a 48 horas	63,75	E F
Ext Acuoso con % concentracion alta sometido a 12 horas	65	F
Ext Etanolico con % concentracion minima sometido a 12 horas	65	F
Ext Etanolico con % concentracion baja sometido a 12 horas	73,75	G
Ext Etanolico con % concentracion minima sometido a 48 horas	75	G H
Ext Etanolico con % concentracion minima sometido a 6 horas	75	G H
Ext Etanolico con % concentracion minima sometido a 24 horas	75	G H
Ext Etereo con % concentracion minima sometido a 12 horas	80	H I
Ext Etereo con % concentracion minima sometido a 6 horas	80	H I
Ext Etereo con % concentracion baja sometido a 6 horas	81,25	I J
Ext Etanolico con % concentracion baja sometido a 48 horas	81,25	I J
Ext Etanolico con % concentracion baja sometido a 6 horas	82,5	I J
Ext Etanolico con % concentracion baja sometido a 24 horas	83,75	I J K
Ext Etanolico con % concentracion media sometido a 12 horas	85	I J K L
Ext Etereo con % concentracion media sometido a 6 horas	85	I J K L
Ext Etanolico con % concentracion media sometido a 6 horas	85	I J K L
Ext Etereo con % concentracion minima sometido a 24 horas	86,25	J K L M
Ext Etereo con % concentracion baja sometido a 12 horas	86,25	J K L M
Ext Etanolico con % concentracion media sometido a 48 horas	88,75	K L M N
Ext Etereo con % concentracion alta sometido a 6 horas	88,75	K L M N
Ext Etereo con % concentracion baja sometido a 24 horas	90	L M N O
Ext Etereo con % concentracion minima sometido a 48 horas	90	L M N O
Ext Etanolico % concentracion alta sometido a 6 horas	90	L M N O
Ext Etanolico % concentracion alta sometido a 12 horas	90	L M N O
Ext Etereo % concentracion media sometido a 12 horas	91,25	M N O P
Ext Etanolico % concentracion media sometido a 24 horas	91,25	M N O P
Ext Etereo % concentracion baja sometido a 48 horas	93,75	N O P
Ext Etanolico % concentracion alta sometido a 24 horas	95	O P Q
Ext Etereo % concentracion media sometido a 24 horas	96,25	P Q
Ext Etereo % concentracion media sometido a 48 horas	100	Q
Ext Etereo % concentracion alta sometido a 12 horas	100	Q
Ext Etanolico % concentracion alta sometido a 48 horas	100	Q
Ext Etereo % concentracion alta sometido a 48 horas	100	Q
Ext Etereo % concentracion alta sometido a 24 horas	100	Q

Elaboración: Fuel R. (2015).

Gráfico 15: Efecto Nematicida en cada extracto



Elaboración: Fuel R. (2015).

El cuadro 29, demuestra el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5%, que permitieron determinar el efecto nematicida *in vitro*, entre los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), de raíz de barbasco, sobre veinte nemátodos del género *Meloidogyne spp*, cuyo resultado determinó que las dosis letales altas etéreas y etanólicas, tuvieron un efecto nematicida de (90 a 100%), con diferencia estadística superior a la dosis alta del extracto acuoso con un índice de mortalidad (55 a 65%) Al evaluar la dosis letales medias se tuvo un efecto nematicida de (85 a 100%) para el extracto etéreo y (85 a 90%) para el extracto etanólico con diferencia estadística superior a la dosis media del extracto acuoso que evidenció una mortalidad de (46.25 a 58.75%). Se evidencio una escasa diferencia en la dosis letal baja con una mortalidad de (80 a 95%) para el extracto etéreo, similar porcentaje obtenido por el extracto etanólico con una mortalidad de (85 a 90%), estos valores son estadísticamente superiores al de la dosis letal baja del extracto acuoso de (30 a 42.5%) de mortalidad. La dosis letal mínima del extracto etéreo fue de (75 a 90%), con diferencia significativa frente al extracto etanólico entre (70 a 75%) de mortalidad, y muy significativo frente al extracto acuoso entre (21.25 a 38.75%) de mortalidad en nemátodos. (Gráfico 15).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Ensayo "A" (E.A.)- Rendimiento de los extractos de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente (éter, etanol y agua) mediante técnicas de maceración continua y simultánea.

- Los análisis estadísticos determinaron diferencia significativa en el rendimiento de obtención de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso) de raíz de barbasco. Con el uso del solvente (éter etílico al 100%), Se obtuvo un extracto de coloración amarillo canario, características propias de un extracto etéreo bien preparado, mediante técnicas continuas y simultáneas de extracción, acorde a Lizcano (2008), cuyo rendimiento fue de 2,05 %, que se reduce fácilmente a polvo, debido a la eliminación total del solvente (éter), con escasa solubilidad en agua.
- El extracto etanólico cuyo rendimiento fue de 2.56 %, frente a los demás extractos, utilizando etanol al 96% como solvente resulta más eficaz en la recuperación de compuestos y principios activos como lo manifiesta Ramírez (2009). Obteniendo un extracto blando de color rojizo, característico de este tipo de extracción, parcialmente soluble en agua.
- El extracto acuoso con 0.83 % de rendimiento, presentó la extracción más baja con respecto a los demás tratamientos, de color amarillo oscuro, propiedades características de la materia prima como lo manifiesta Arboleda (2012), totalmente soluble en agua.

4.2 Ensayo "B" (E.B.)- Efecto nematocida de los extractos (etéreo, etanólico y acuoso), sobre larvas J2 del género *Meloidogyne spp* en condiciones *in vitro*.

- El análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5% permitieron determinar que se presentaron diferencias significativas entre los diferentes extractos de raíz de barbasco *Thephrosia sinapou* y los testigos en el efecto nematocida sobre el nemátodo agallador *Meloidogyne spp*, dependiendo de las dosis y los diferentes tiempos de exposición en condiciones *in vitro*.
- El testigo químico (Rotenona) presentó el mayor efecto nematocida de 100% entre (6 a 48 h), cuya mortalidad es similar a la que presentó la DLA etérea entre (24 a 48 h), además de la DLA etanólica y DLM etérea en 48h de exposición *in vitro*, con escasa diferencia estadística al que presentó el testigo blanco (etanol) de 96% de mortalidad en 48 h, similar efecto nematocida de 95% tuvo la DLA etanólica en 24 h y (DLM y DLB) etéreas entre (24 a 48 h), frente a 90% de mortalidad de la DLA etérea y DLA etanólica en 6h de exposición *in vitro*, efecto nematocida que aumentó con la DLA etanólica y DLM etérea en 12 h, seguida de la DLM etanólica y DLB etérea en 24 h, terminando con la DLM etanólica y DLm etérea en 48 h de exposición *in vitro*. Posteriormente se evidenció una mortalidad de 85% para la DLM etérea y (DLM y DLB) etanólicas en 6 h, cuyo efecto nematocida aumentó a las 12 h con la DLB etérea y DLM, DLB etanólica, seguido de la DLm etérea en 24h, finalizando con la DLB etanólica entre (24 a 48 h), con diferencia estadística significativa mayor al 80% que presentó la DLB etérea en 6 h, frente a un 75% de mortalidad que demostró la DLm etérea entre (6 a 12h) y DLm etanólica en 48 h de exposición *in vitro*, frente al 70% de mortalidad que tuvo la DLm etanólica entre (6 a 24 h) de exposición *in vitro*. Los anteriores valores son significativamente mayores, frente a la DLA acuosa, que tuvo un efecto nematocida de 65% en 48 h, y 63.75% entre (12 a 24h) de exposición *in vitro*, con efecto nematocida menor de 58.75% , presentó la DLm entre (24 a

48 h), con diferencia estadística de 55% de mortalidad, tuvo la DLA en 6 h, similar efecto nematicida tuvo la DLM, con 53.75% de mortalidad en 12h, frente al 46.25% de mortalidad que tuvo la DLM en 6 h, efecto nematicida superior al 42.5% que evidenció la DLB en 48 h, cuyo efecto nematicida similar presentó la DLB con 40% de mortalidad en 24 h . Estos valores son estadísticamente superiores al 38.75%, que presentó la DLB en 12h, y la DLM en 48 h, valores superiores frente al efecto nematicida de 33.75% de la DLM en 24h, seguido de la DLB con 30% en 6 h, y la DLM de 25% en 12 h , finalizando con un efecto nematicida de 21.25% en 6h frente al testigo absoluto (agua destilada) que obtuvo una eficiencia muy reducida como nematicida de 10%, con respecto a los anteriores tratamientos.

- Los resultados anteriores demuestran una similitud al efecto nematicida de extractos cetónicos de *Ricinus communis* Linneo, presentado por Arboleda (2012) sobre el nemátodo barrenador *Raddopholus similis*, *in vitro*, con poder nematicida de (73 a 89%) con una concentración cetónica del 100% en un periodo de tiempo de 48 h. cuyo efecto nematicida es similar a la obtenida por Vinueza (2006), controlando *Meloidogyne incognita*, con diferentes plantas entre ellas, el fruto verde de *Ricinus communis*, con el cual se logró una mortalidad de 100% y la inflorescencia de *Suaveolens officinale* con 100% de mortalidad después de 72 h de exposición, estos valores demuestran la efectividad de extractos acuosos como los evaluados por Vinueza (2006), cuyos resultados reflejan que; Los extractos de fruto verde de *Ricinus communis* en concentraciones de 32,64 y 100%, presentaron un índice de mortalidad de 98.9 % en sus tres concentraciones en un periodo de tiempo de 72 horas, respectivamente. Los extractos de inflorescencia de *Schoenocaulon officinale* a concentraciones de 32, 64 y 100%, obtuvieron un índice de mortalidad de 80,5, 84,1, y 100% después de 72 horas de exposición. Espigas y hojas de *Schoenocaulon officinale* en la concentración del 100% indujeron una mortalidad del 65.9 y 98.8 %, respectivamente después de 72 horas. El extracto acuoso de inflorescencia en una

concentración del 100%, presentó un índice de mortalidad de 100%, después de 48 horas de exposición *in vitro*.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- A nivel de laboratorio el mejor rendimiento de obtención de extracto a partir de la raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), mediante extracciones simultaneas y continuas, se presentó en la extracción etanólica con 2.56 %, seguido de la extracción etérea con 2.05%, finalizando en el rendimiento más bajo para la extracción acuosa de 0.83%.
- Entre los diferentes tratamientos el mejor resultado como agente nematocida, lo presentó el testigo químico (Rotenona) con un porcentaje de 100% en las primeras 6 h de exposición con diferencia estadística en el tiempo de exposición respecto al testigo blanco (etanol), con 96% en 48h de mortalidad, similar resultado estadístico presentaron los extractos etéreo y etanólico.
- Los extractos etéreo y etanólico no poseen un efecto nematocida sobre las larvas de *Meloidogyne spp*, debido a que su solvente y testigo (etanol), presentó estadísticamente un efecto nematocida similar.
- El extracto acuoso tuvo una mortalidad baja de 65% con respecto al resto de tratamientos, con una diferencia estadística superior a la presentada por el testigo absoluto (agua destilada) que fue de 10%.
- Se concluye que el extracto acuoso de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*), tiene propiedades nematocidas convirtiéndose en una alternativa promisoría que debe ser validada con condiciones en campo dentro de un manejo integrado de *Meloidogyne spp*, posibilitándole a los agricultores producir estos

productos en sus fincas de una forma económica y viable, aprovechando sus recursos y al mismo tiempo generando una agricultura respetuosa con el medio ambiente.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- Agrios, G. (2007). *Control de nemátodos*. México: limusa.
- Agrios, G. (2007). *Nemátodos formadores de nódulos de la raíz*. México: Limusa.
- Arboleda, F., Guzman, A., & Mejia, L. (2012). Efecto de extractos cetonicos de higuierilla sobre el nemtaodo barrenador en condiciones in vitro . *Luna Azul*, 4.
- Archila, J. (2008). *Estudio de los metabolitos secundarios de los extractos y aceites esenciales de flores*. Santander.
- Calpa, F. (2015). *Efectividad de rotenona y spinetoram para el control de Neolucinoides elegantalis en naranjilla*. tulcan.
- Calvo, I. (2009). Cultivo de Tomate de Árbol. *Sector Agropecuario*, 3-5.
- Cantuña, N. (2013). *Deteccion e Identificacion del nematodo dormador de agallas Meloidogyne spp, mediante la tecnica PCR*. Sangolqui: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- CORPOICA. (2007). *Alelopatía*. Bogotá: Produmedios.
- Coyne, D. Nicol, J. Claudius-Cole, B. (2009). *Nematologia practica*. Quito: International Institute of Tropical Agriculture.
- Cruz, L. (2013). *Identificacion del nematodo Agallador de la raiz de cafeto en la region de Veracruz*. Veracruz: Universidad Veracruzana.
- Diaz, N. (2012). *Obtención y evaluación in vitro de la eficiencia de extractor con principios activos de eucalipto (eucaliptus globulus), Ajo (Allium sativum) y Crisantemo (chryssanthemum cinerariaefolium) como fungicidas naturales para el control de Botrytis cinérea, pra*. Sangolqui: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Farban, D., & Zambrano, M. (2010). *Plan de negocio para comercializar el tomate de arbol desde el Ecuador hacia los Estados Unidos de Norte America*. Manta: Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabi.
- Garcia, C., & Carrion, A. (2010). *Preparacion de extractos vegetales: Determinacion de Eficiencia de metodica*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Guerra, A. (2005). *Obtencion caracterizacion y evaluacion de las propiedades fisicoquimicas de los extractos fluidos, blandos y secos asi como de las*

- tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala a nivel de laboratorio.* Guatemala: Universidad de San Carlos Guatemala.
- Gutierrez, M. (2006). *Evaluacion de extractos de plantas tropicales sobre la moratalidad de Radopolus similis cobb.* Guacimo: Universidad Earth.
- Hinojosa, W. (2011). *Eficiencia de cinco productos organicos para el control de nemtodos fitoparasitos en el cultivo Hypericum.* Sangolqui: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Lara, J. S. (2001). *Historia de la iglesia catolica en el Ecuador.* Quito: Abya - Yala.
- Leon, R. (2009). *Determinacion de los efectos de productos comerciales obtenidos a base de citricos y de neem para el manejo de sigatoga negra y su agente causal.* Guayaquil: Escuela Superior del Litoral .
- Lizcano, R. (2008). *Evaluacion de la actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y/o aceites de las especies vegetales frente a microorganismos patogenos y fitopatenos.* Quito: Universidad Javeriana.
- Lopez, I. (2009). *Control de nematodos Meloidogyne spp en viveros de cafe mediante el hongo Paecilomyces lilacinus.* Universitaria: Universidad de El Salvador.
- Meier, M. (26 de noviembre de 1997). Las raices del barbasco. *El Comercio*, pág. 4.
- Moralez, J. (2001). *Poblaciones de nematodos fitoparasitos en plantaciones mixtas de cafe y musaceas.* Francisco Morazan : Universidad Zamorano.
- Naveda, F. (2010). *Establecimiento de un proceso de obtencion de extracto de Ruda con alto contenido de polifeniles.* Quito: Universidad Politecnica Nacional.
- Parada, R., & Guzman, R. (1997). Evaluacion de extractos botanicos contra el nematodo Meloidogyne incognita en frijol . *Agronomia Mesoamericana*, 108-114.
- Peraza, W., Rosales, J., Esquivel, A., Hilje, I., Molina, R., & Castillo, P. (2013). Identificacion morfologica , morfometrica y molecular de Meloidogyne spp en higuera en Costa Rica. *Agronomia Mesoamericana* , 337-339.
- Ramirez, T. (2009). Perfil de tomate de arbol . *Centro de Informacion e Inteligencia Comercial*, 2-3.

- Rodriguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). *Procedimiento para la extraccion de aceites en plantas aromaticas*. Mexico: Centro de investigaciones biologicas.
- Roman, J., & Acosta, N. (2013). *Nematodos (Diagnostico y Combate)*. San Juan: Universidad de Puerto Rico.
- Rondon, J. (2002). Guia descriptiva de los barbasco de Venezuela. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 43, 39-40.
- Rosa, L., & Sosa, C. (2014). *Metodos de Extraccion de nematodos*. Senasica: Laboratorio de Nematologia.
- Salazar, W., & Guzman, T. (2014). Efecto nematocida de extractos de Quassia amara y Brugmancia suaveolens sobre Meloidogyne sp, asociado al tomate en Nicaragua. *Agronomia Mesoamericana*, 111-119.
- Sanabria, A., Lopez, I., & Galdron, R. (1997). Estudio Fitoquimico preliminar y letalidad sobre atemia salina de plantas colombianas. *Departamento de Farmacologia*, 3.
- Sandoval, A., & Lomas, L. (2007). *Incidencia severidad rango de hospederos y especies del nematodo del rosario en el valle del chota*. Ibarra: Universidad Tecnica del Norte.
- SENA. (2012). Extractos vegetales. En SENA, *ntroducción a la Industria de los Aceites Esenciales Extraídos de Plantas Medicinales Y Aromáticas* (págs. 15-16). Bogotá: Textos Regional Caldas.
- Sharapin, N. (2000). Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmaceuticos. *Revista de Fitoterapia*, 197-202.
- Talavera, M. (2003). *Manual de Nematolia Agricola*. Brasilia: Cansilleria de Agricultura.
- Touqeer, S. Ajaib, M. (2013). A Review on the Phytochemistry and Pharmacology of Genus. *Phytopharmacology*, 598-605.
- Ubidia, P. (2008.). Nematodos fitoparasitos asociados con el tomate de arbol en la sierra ecuatoriana. *XXXII Jornadas nacionales de biologia.*, 1-2.
- Vegas, A., Crozzoli, R., & Perichi, G. (2010). Efecto de extractos acuosos y etanolicos de diferentes plantas sobre la eclosion de los huevos de Meloidogyne enterolobii. *Universidad Central de Venezuela*, 111-112.

Vinueza, S., Crozzoli, R., & Perichi, G. (2006). Evaluacion in vitro de extractos acuosos de plantas para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. *Universidad Central de Venezuela, XIX(2)*, 26.

Wikipedia. (2015). *Tephrosia*. Recuperado el 31 de marzo de 2015, de Tephrosia: <http://es.wikipedia.org/wiki/Tephrosia>

Zeiger, E., & Taiz, L. (2006). *Ciencias Experimentales*. Castellon de la Plana: Publicaciones de la Universidad de Jaume.

VI. ANEXOS.

Anexo 1: PRESUPUESTO

DETALLES	UNIDAD	CANTIDAD	\$ COSTO U.	\$ COSTO T.
FASE DE CAMPO				
Transporte	días	8	\$5,00	\$40,00
Alimentación	días	8	\$7,00	\$56,00
Hospedaje	días	8	\$4,00	\$32,00
Búsqueda y extracción de planta	Días	8	\$8,00	\$64,00
subtotal 1				\$192,00
FASE DE LABORATORIO UPEC Preparación de la materia prima				
Transporte	Días	\$60,00	\$0,50	\$30,00
Adquisición de éter	cc	5000	\$105,00	\$132,00
Adquisición de etanol	cc	5000	\$32,00	\$32,00
Adquisición de cierra manual	unidad	1	\$5,00	\$5,00
subtotal2				\$199,00
FASE DE LABORATORIO UPEC Obtención de los extractos				
Adquisición de papel aluminio	unidad	3	\$0.95	\$2.85
Adquisición de Frascos color ámbar	unidad	24	\$1,00	\$32,00
Adquisición de hielo	unidad	9	\$1.25	\$11.25
subtotal 3				\$46.10
FASE DE LABORATORIO UPEC Estandarización del testigo químico				
Adquisición de producto químico Rotenona 5%	cc	2000	\$23,00	\$23,00
subtotal 4				\$23,00
FASE DE LABORATORIO AGROCALIDAD Obtención de nematodos				
Transporte	días	16	\$12,00	\$192,00
Alimentación	días	80	\$5,00	\$400,00
hospedaje	meses	4	\$70,00	\$250,00
subtotal 5				\$842,00
MATERIALES Y EQUIPOS				
Camara digital	unidad	1	\$120	\$120
Cuaderno	unidad	1	\$1.50	\$1.50
Esferográfico	unidad	2	\$0.30	\$0.30
subtotal 6				\$121,80

GASTOS BIBLIOGRAFICOS				
Tinta de impresión	unidad	4	\$20	\$80,00
Gastos de internet	mes	10	\$10	\$100,00
Papel de impresión (resmas)	unidad	2	\$5	\$10,00
subtotal 7				\$190,00
SUB-COSTO TOTAL				\$1,614
IMPREVISTO 10%				\$161.14
COSTO TOTAL				\$1775,00

Elaboración: Fuel, R. (2015)

Anexo 3: Recolección y preparación del material vegetal a partir de raíz de barbasco (*Thephrosia sinapou*)



a) Selección



b) Lavado



c) Picado



d) Secado



e) Triturado

Anexo 4: Obtención del extracto (etéreo y etanólico), utilizando como solvente orgánicos éter al 100 % y etanol al 96%.



a) Pesado Inicial



b) Macerado



c) Filtrado



d) Rotavaporado



e) Pesado Final



f) Transvasado

Anexo 5: Obtención del extracto acuoso, utilizando como solvente orgánico (Agua destilada).



a) Pretratamiento



b) Picado



c) Pesado



d) Licuado



e) Macerado



f) Filtrado



g) Rotavaporado



h) Trasvasado

Anexo 6: Obtención de extracto de raíz de tomate de árbol *Cyphomandra betaceae*.



a) Selección



b) Pesado



c) Picado



e) Licuado



f) Tamizado



e) Concentrado de extracto de raíz

Anexo 7: Evaluación de los extractos; etéreo, etanólico y acuoso, con sus respectivos testigos (químico, absoluto y blanco) *in vitro*.



a) Concentraciones de los extractos *in vitro*.



b) Concentraciones de nematodos *Meloidogyne spp.*



c) Pesca de nematodos *Meloidogyne spp.*



d) Evaluación del efecto nematicida