

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO  
FOLIAR DEL ÁRBOL *Azadirachta indica* CONTRA ALGUNOS HONGOS  
FITOPATÓGENOS

DIANA MARIA FERNÁNDEZ CAÑÓN  
CÉSAR JAVIER GONZÁLEZ BOHÓRQUEZ

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C.  
Noviembre de 2008

## NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO  
FOLIAR DEL ÁRBOL *Azadirachta indica* CONTRA ALGUNOS HONGOS  
FITOPATÓGENOS

DIANA MARIA FERNÁNDEZ CAÑÓN  
CÉSAR JAVIER GONZÁLEZ BOHÓRQUEZ

APROBADO

\_\_\_\_\_  
JORGE ROBLES CAMARGO Ph.D  
Director

\_\_\_\_\_  
ÁNGELA PINZÓN ESPINOSA  
Codirectora

\_\_\_\_\_  
JULIO PEDROZO PÉREZ Ph.D  
Jurado

\_\_\_\_\_  
DAVID GOMEZ MENDEZ MSc.  
Jurado

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO  
FOLIAR DEL ÁRBOL *Azadirachta indica* CONTRA ALGUNOS HONGOS  
FITOPATÓGENOS

DIANA MARIA FERNÁNDEZ CAÑÓN  
CÉSAR JAVIER GONZÁLEZ BOHÓRQUEZ

APROBADO

---

Dra. INGRID SCHULLER  
Decana Académica  
Facultada de Ciencias

---

Dra. JANETH ARIAS PALACIOS  
Directora de Carrera  
Microbiología Industrial

***A Dios***

***A nuestros asesores***

***A nuestra familia***

***A nuestros amigos***

***Al Néme XD***

## **AGRADECIMIENTOS**

Cuando escogimos nuestro trabajo de grado nunca pensamos encontrar en nuestro camino personas tan especiales como, RODRIGO HOYOS quien con su colaboración desinteresada nos abrió las puertas de la Universidad Nacional de Medellín entregándonos el material necesario para nuestro trabajo. Una vez presentada nuestra propuesta la cual fue acogida y respaldada por el Doctor JORGE ROBLES quien con su gran profesionalismo no dudó en apoyarnos y a la vez dirigir nuestro proyecto. De igual manera estuvimos asesorados por ANGELA PINZON nuestra codirectora a quien agradecemos toda su motivación y guía en nuestros momentos difíciles. Y, a las demás personas que aún cuando no las hemos nombrado formaron parte vital, por su compañía, colaboración, aportes y sugerencias logrando respaldar nuestra investigación.

A Dios quien con toda su sabiduría, logró encaminarnos, siendo siempre nuestro ángel, colmándonos de bendiciones para obtener los resultados que hoy presentamos.

A nuestros padres y hermanos quienes con su apoyo moral, económico y con la ilusión de ver nuestros sueños hechos realidad, estuvieron siempre a nuestro lado de manera incondicional.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
2.1 USO DE EXTRACTOS VEGETALES COMO ANTIFÚNGICOS BIOLÓGICOS... .....	3
2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE <i>Azadirachta indica</i> ..... .....	4
2.2.1 Descripción botánica del genero <i>Azadirachta indica</i> .....	5
2.2.2 Categorías taxonómicas de <i>Azadirachta indica</i> .....	6
2.2.3. Características ambientales.....	6
2.3 Consideraciones Químicas del Neem.....	7
2.3.1 Antecedentes químicos de la especie <i>Azadirachta indica</i> .....	8
2.4 ANTIFÚNGICOS COMERCIALES.....	10
2.41. Ketoconazol.....	11
2.5 DISOLVENTES.....	11
2.5.1 Dimetilsulfoxido.....	11
2.5.2 Tween 80.....	12
2.6 HONGOS FITOPATÓGENOS.....	12
2.6.1 Generalidades de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	13
2.6.1.1 Descripción básica.....	13
2.6.1.2 Infección.....	14
2.6.2 Generalidades de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	16
2.6.2.1 Descripción básica.....	16
2.6.2.2 Infección.....	17

2.6.3 Generalidades de <i>Fusarium roseum</i> .....	18
2.6.3.1 Descripción básica.....	18
2.6.3.2 Infección.....	19
<b>3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	22
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	22
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Objetivo General.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1 Recolección y Preparación del material vegetal.....	25
5.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	25
5.3 Estudio Fitoquímicos.....	26
5.3.1 Obtención del Extracto Etanólico.....	26
5.3.2 Obtención de Fracciones a partir del Extracto Etanólico.....	26
5.4 Pruebas químicas.....	27
5.4.1 Reacciones microquímicas de identificación.....	27
5.4.1.1 Terpenoides.....	28
5.4.1.2 Prueba de Liebermann – Burchard.....	28
5.4.1.3 Prueba de Salkowski.....	29
5.5 Cromatografías bidimensionales para el Análisis de Esteroides y/o Triterpenoides.....	29
5.6 Bioensayo para la valoración antifúngica.....	30
5.6.1 Valoración de la actividad antifúngica.....	31



<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO Y FRACCIONES.....	33
6.2 PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES.....	33
6.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.....	34
6.3.1 CRECIMIENTO DIAMETRAL DE HONGOS FITOPATÓGENOS.....	34
6.3.1.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	35
6.3.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	36
6.3.1.3. <i>Fusarium roseum</i> .....	38
6.3.2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.....	39
6.3.2.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	40
6.3.2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	44
6.3.2.3. <i>Fusarium roseum</i> .....	47
6.3.3 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN SEGÚN TRATAMIENTO.....	50
6.3.3.1. Extracto Etanólico 25mg/mL.....	50
6.3.3.2. Fracción Etérea 7mg/mL.....	51
6.3.3.3. Fracción Diclorometano 7mg/mL.....	53
6.3.3.4. Fracción Acetato de Etilo 2mg/mL.....	54
6.3.4 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN SEGUNDA PRUEBA.....	56
6.4 CROMATOGRAFÍAS.....	63
6.4.1 Cromatografía en capa delgada.....	63
6.4.2 Cromatografía Bidimensional.....	64
6.5 Analisis Estadístico.....	66

<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Tolerancia del Neem a factores climáticos y de suelo.....	7
<b>Tabla 6.1.</b> Peso en gramos de las fracciones obtenidas a partir del extracto Etanólico.....	33
<b>Tabla 6.2.</b> Pruebas químicas preliminares para el extracto etanólico y las fracciones etérea, diclorometano y acetato de etilo.....	34
<b>Tabla 6.3.</b> Crecimiento diametral promedio (cm) de <i>S. sclerotiorum</i> .....	35
<b>Tabla 6.4.</b> Crecimiento diametral promedio (cm) de <i>F.oxysporum</i> .....	36
<b>Tabla 6.5.</b> Crecimiento diametral promedio (cm) de <i>F.roseum</i> .....	38
<b>Tabla 6.6.</b> Parámetros de medición para <i>S.sclerotiorum</i> .....	40
<b>Tabla 6.7.</b> Parámetros de medición para <i>F.oxysporum</i> .....	44
<b>Tabla 6.8.</b> Parámetros de medición para <i>F.roseum</i> .....	47
<b>Tabla 6.9.</b> Parámetros de medición de <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F.roseum</i> para el Extracto Etanólico a una concentración de 25 mg/mL.....	50
<b>Tabla 6.10.</b> Parámetros de medición de <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F.roseum</i> para la Fracción Éter de Petróleo a una concentración de 7 mg/mL.....	51
<b>Tabla 6.11.</b> Parámetros de medición de <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F.roseum</i> para la Fracción Diclorometano a una concentración de 7 mg/mL.....	53
<b>Tabla 6.12.</b> Parámetros de medición de <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F.roseum</i> para la Fracción Acetato de Etilo a una concentración de 2 mg/mL.....	54
<b>Tabla 6.13.</b> Parámetros de medición para <i>S.sclerotiorum</i> , segunda prueba a diferentes concentraciones.....	56
<b>Tabla 6.14.</b> Parámetros de medición para <i>F. oxysporum</i> , segunda prueba a diferentes concentraciones.....	59
<b>Tabla 6.15.</b> Parámetros de medición para <i>F. roseum</i> , segunda prueba a diferentes concentraciones.....	61
<b>Tabla 6.16.</b> Solventes y proporciones empleadas como fase móvil para el extracto y las fracciones.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Follaje de <i>Azadiractha indica</i> .....	6
<b>Figura 2.2</b> Estructura química de los principales compuestos aislados de material foliar del árbol <i>Azadiractha indica</i> .....	10
<b>Figura 2.3.</b> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . A) Macroscopía, B) Microscopía.....	16
<b>Figura 2.4.</b> <i>Fusarium oxysporum</i> . A) Macroscopía, B) Microscopía.....	17
<b>Figura 2.5.</b> <i>Fusarium roseum</i> . A) Macroscopía, B) Microscopía.....	21
<b>Figura 5.1.</b> Rotaevaporador Büchi B-480.....	26
<b>Figura 5.2.</b> Fraccionamiento líquido-líquido. A) Fracción de Éter de petróleo, B) Fracción de Diclorometano, C) Fracción de Acetato de Etilo.....	27
<b>Figura 5.3.</b> Diagrama de flujo de la metodología .....	32
<b>Figura 6.1.</b> Crecimiento diametral promedio (cm) de <i>S. sclerotiorum</i> .....	35
<b>Figura 6.2.</b> Crecimiento diametral promedio (cm) de <i>F.oxysporum</i> .....	37
<b>Figura 6.3.</b> Crecimiento diametral promedio (cm) de <i>F.roseum</i> .....	38
<b>Figura 6.4.</b> Porcentaje de inhibición para <i>S.sclerotiorum</i> .....	41
<b>Figura 6.5.</b> Comportamiento de <i>S. sclerotiorum</i> en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.2mL/mL), Ext. EtOH (25mg/mL), Fra. Etérea (7mg/mL), Fra. Dicloro. (7mg/mL) y Fra. Acetato de Etilo (2mg/mL).....	43
<b>Figura 6.6.</b> Porcentaje de inhibición para <i>F.oxysporum</i> .....	44
<b>Figura 6.7.</b> Comportamiento de <i>F. oxysporum</i> en Ketoconazol (2mg/mL) .DMSO y Tween 80 (0.2mL/mL), Ext. EtOH (25mg/mL), Fra. Etérea (7mg/mL), Fra. Dicloro. (7mg/mL) y Fra. Acetato de Etilo (2mg/mL).....	46
<b>Figura 6.8.</b> Porcentaje de inhibición para <i>F.roseum</i> .....	47
<b>Figura 6.9.</b> Comportamiento de <i>F. roseum</i> en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.2mL/mL), Ext. EtOH (25mg/mL), Fra. Etérea (7mg/mL), Fra. Dicloro. (7mg/mL) y Fra. Acetato de Etilo (2mg/mL).....	49
<b>Figura 6.10.</b> Porcentaje de inhibición del Extracto Etanólico para <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F.roseum</i> .....	51
<b>Figura 6.11.</b> Porcentaje de inhibición de la Fracción Éter de Petróleo para <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F.roseum</i> .....	52
<b>Figura 6.12.</b> Porcentaje de inhibición de la Fracción Diclorometano para <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F.roseum</i> .....	53

<b>Figura 6.13.</b> Porcentaje de inhibición de la Fracción Acetato de Etilo para <i>S.sclerotiorum</i> , <i>F.oxysporum</i> y <i>F. roseum</i> .....	54
<b>Figura 6.14.</b> Comparación del Porcentaje de inhibición de <i>S.sclerotiorum</i> a dos concentraciones diferentes para cada tratamiento.....	57
<b>Figura 6.15.</b> Comportamiento de <i>S.sclerotiorum</i> en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.2mL/mL), Ext. EtOH (20mg/mL), Fra. Etérea (15mg/mL), y Fra. Dicloro. (4mg/mL).....	58
<b>Figura 6.16.</b> Comparación del Porcentaje de inhibición de <i>F. oxysporum</i> a dos concentraciones diferentes para cada tratamiento.....	59
<b>Figura 6.17.</b> Comportamiento de <i>F. oxysporum</i> en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.2mL/mL), Ext. EtOH (20mg/mL), Fra. Etérea (6mg/mL), y Fra. Dicloro. (5mg/mL).....	60
<b>Figura 6.18.</b> Comparación del Porcentaje de inhibición de <i>F. roseum</i> a dos concentraciones diferentes para cada tratamiento.....	61
<b>Figura 6.19.</b> Comportamiento de <i>F. roseum</i> en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.2mL/mL), Ext. EtOH (35mg/mL), Fra. Etérea (20mg/mL), y Fra. Dicloro. (15mg/mL).....	62
<b>Figura 6.20.</b> Cromatografías en capa delgada reveladas con vainillina y bajo luz UV.....	64
<b>Figura 6.21.</b> Cromatografía bidimensional bajo luz UV.....	65
<b>Figura 6.22.</b> Cromatografía bidimensional revelada con Liebermann – Burchard, los círculos señalan manchas rojas, que corresponden a posibles terpenos o esteroides.....	65

## RESUMEN

Se probó la actividad antifúngica *in vitro* del extracto foliar de la planta Neem (*Azadirachta indica*), sobre los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum* a través de estudios biológicos. Para la obtención del extracto etanólico, el material vegetal seco fue molido y suspendido en etanol durante 10 días, el cual se secó en un rotaevaporador. Posteriormente se realizó un fraccionamiento líquido – líquido para obtener las fracciones de éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo. Para cada fracción se realizaron pruebas químicas preliminares y cromatografías en capa delgada. Los ensayos biológicos se realizaron en Agar papa dextrosa (PDA) en una concentración final de 25mg/mL para el extracto etanólico, 7mg/mL para la fracción etérea y de diclorometano y 2mg/mL para la fracción de acetato de etilo. El extracto etanólico mostró una inhibición del 78.02%, 66.80% y 6.59%; la fracción etérea, 1.1%, 25.90% y 0.18%; la fracción de diclorometano, 88.35%, 45.61% y 6.96% y la fracción de acetato de etilo, 13.37%, 19.40% y 1.10% para *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *F. roseum* respectivamente. El extracto etanólico y la fracción de diclorometano demostraron ser más efectivos en la inhibición *in vitro* de estos hongos fitopatógenos, por lo cual se realizó una cromatografía bidimensional para indicar la presencia de posibles compuestos terpénicos con actividad antifúngica. El hongo *F. roseum* demostró ser el más resistente a la acción inhibitoria de la planta. Por último se realizó una segunda prueba a diferentes concentraciones, para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Los datos obtenidos se analizaron con ANOVA a un 95% de confianza mostrando diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

## ABSTRACT

Antifungal activity of Neem leaves was tested *in vitro* against plant pathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium roseum* through biological assay in order to obtain the ethanolic extracts, dry vegetable matter was grinded and immersed in ethanol for ten days which was dried in a **rotaevaporater**. Subsequently separation liquid-liquid was done to find fractions of **petroleum ether**, dichloromethane, and ethyl acetate. Preliminary chemical test and thin layer chromatography were carried out for each fraction. The biological tests were performed in potato dextrose agar (PDA) in final concentration of 25mg/mL for the ethanolic extracts, 7mg/mL for the ether fraction and dichloromethane, and 2mg/mL for ethyl acetate fraction. The ethanol extracts showed an inhibition of 78.02%, 66.80% and 6.59%; the ether fraction of 1.1%, 25.90% and 0.18%; dichloromethane fraction of 88.35%, 45.61% and 6.96% and ethyl acetate fraction of 13.37%, 19.40% and 1.10% for *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* and *F.roseum* respectively. The ethanolic extract showed an inhibition of 78.02%, 66.80% and 6.59%; the ether fraction of 1.1%, 25.90% and 0.18%; dichloromethane fraction of 88.35%, 45.61% and 6.96% and ethyl acetate fraction of 13.37%, 19.40% and 1.10% for *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* and *F.roseum* respectively. The ethanol extracts and dichloromethane fraction proved to be more effective in the inhibition *in vitro* of these pathogenic fungi, therefore a **bidimensional** chromatography was performed to establish the possible presence of terpenoids compounds with antifungal activity. *F.roseum* revealed to be the most resistant to the plant inhibitory action. All test results were analysed with ANOVE to 95% of precision demonstrating significant statistical differences among all treatments.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos Fitopatógenos han causado muchas pérdidas en todo tipo de plantaciones y, aunque se han venido utilizando un sin número de productos sintéticos para controlarlos, no ha sido posible erradicarlos totalmente. Estos hongos poseen mecanismos evolutivos muy complejos que les permite adaptarse a nuevas condiciones impuestas por el medio ambiente. Desafortunadamente los productos químicos que se han venido utilizando para el control de este tipo de hongos, han producido un alto impacto ambiental, por su agudo grado de toxicidad y contaminación, además de causar efectos secundarios en las personas que los manipulan, pues los residuos tóxicos se bioacumulan en el organismo generando graves patologías.

Por otro lado, al estudiar los mecanismos biológicos, las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas y producen compuestos químicos como acción de defensa. Estos mecanismos biológicos se proyectan en el estudio de extractos vegetales y en la obtención de metabolitos secundarios de alto valor agregado para su implementación en el control de plagas a nivel agrícola, debido a la resistencia generada por parte de los microorganismos a fungicidas comerciales utilizados en el control de enfermedades fitopatológicas.

De acuerdo al anterior esquema, en la actualidad se ha estimulado la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, varios de los cuales, han mostrado ser efectivos contra fitopatógenos tanto *in vitro* como *in vivo*, además de ser una alternativa biológica, sostenible y económica que genera un menor impacto ambiental.

Estos extractos han sido estudiados para la obtención de compuestos fitoquímicos con actividad antimicrobiana, insecticida o farmacéutica. Este estudio tiene como fundamento aprovechar de una forma alterna y biológica el árbol *Azadirachta indica* (Meliaceae) comúnmente conocido como Neem o Margosa, el cual se encuentra



ampliamente distribuido en el sur y sureste de Asia y en la mayor parte de las regiones subtropicales del mundo. Este árbol es conocido por sus propiedades medicinales en humanos y por su control de plagas en cultivos agrícolas, ya que contiene diversos agentes bioactivos contra hongos e insectos principalmente.

La presente investigación se efectuó en los laboratorios de Fitoquímica y Microbiología del departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana, en donde se realizó el estudio de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos y fracciones provenientes de las hojas de la planta *Azadirachta indica* (Neem) contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, causante del marchitamiento de algunas plantas por el bloqueo físico de los vasos del xilema, así mismo por la producción de toxinas; *Fusarium roseum*, responsable de la pudrición de los brotes o marchitez a través de la corona foliar y la pudrición cortical y *Sclerotinia Sclerotiorum*, generador de podredumbre blanda en cultivos de tomate y en hortalizas como la lechuga.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 USO DE EXTRACTOS VEGETALES COMO ANTIFÚNGICOS BIOLÓGICOS

Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello se ha empleado las técnicas *in vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas (Hernández, L. y Rodríguez, M., 2001). Además, diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, entre otros (Cowan, 1999; Hernández *et al.*, 2007).

Los hongos constituyen el grupo más importante entre los agentes causales de tipo infeccioso que provocan enfermedades en las plantas. El número exacto de hongos fitopatógenos se desconoce, pero se estima en un número superior a diez mil especies, pertenecientes a diversas categorías taxonómicas (Ascolflores, 1995).

Por otra parte, el control con plantas se ha utilizado hace mucho tiempo y su funcionamiento se basa en repeler insectos y agentes vectores de enfermedades. Las plantas empleadas con estos fines son hierbas aromáticas, malezas que por los metabolitos secundarios y/o principios activos, favorecen o desfavorecen condiciones de desarrollo de otras plantas o cultivos y previenen enfermedades (Celis *et al.*, 2008). Los tipos de control que se usan con mayor frecuencia se hacen con plantas acompañantes, plantas repelentes o con cultivos trampa, los que se hallan combinados para obtener un beneficio mutuo (Flores *et al.*, 2006)

Los compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), son metabolitos secundarios comunes en las plantas con propiedades fungicidas. Las cumarinas están clasificadas como antifúngicas y antibacterianas. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas, se incorporan a la pared vegetal para aumentar su

rigidez e impedir la entrada de los patógenos. En cuanto a las fitoalexinas, estas son sintetizadas por las plantas después de la infección y en actividad inhibitoria de microorganismos patógenos, se ha identificado un grupo importante, la pisatina, un flavonoide sintetizado como reacción a la infección por hongos, siendo esta la primera fitoalexina aislada y caracterizada (Gil, 2002).

Por otro lado, aquellas que hacen parte de la respuesta hipersensible, como es el caso de algunos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente eliminando directamente al microorganismo patógeno y/o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Es así, como algunos metabolitos secundarios contribuyen en parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas al ataque por patógenos (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Ante la necesidad e importancia de reducir el uso de químicos y productos agrícolas, que influyen en la calidad de las plantas, se ha dado cada vez más importancia a los extractos naturales como controladores, con el fin de dar nuevas alternativas, teniendo en cuenta los sistemas de defensa de las plantas, con la ventaja de ser biodegradables y contribuyendo, además, a preservar el medio ambiente y la biodiversidad (Flores *et al.*, 2006).

## **2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE *Azadirachta indica***

El árbol de Neem se encuentra distribuido por el continente africano, asiático, en la parte central y sur del continente americano y Oceanía, la mayor parte de ellos en el sudeste de Asia y al sur de Sahara. Actualmente en 78 países existe Neem y se calcula que en todo el mundo existen entre 64 y 91 millones de ejemplares. En 9 países se utilizan materias activas provenientes de este árbol (Ramos, 2002).

Por otra parte se estima que en Colombia existen más de 100000 árboles de Neem, en los departamentos del Huila, Caquetá, Cauca, Nariño, y Antioquia (Capataz *et al.*, 2007), usados con fines investigativos y rurales para el control biológico de

plagas. Adicionalmente este árbol tiene usos en reforestación ya que no requiere condiciones ambientales y nutricionales exigentes.

En Colombia la planta es usada como fertilizante orgánico, ya que es de mayor calidad que el estiércol vacuno, porcino o de otras fuentes animales. También, como abono es apreciado por aportar nutrientes y no permitir la proliferación de insectos en el mismo, gracias a sus propiedades insecticidas y repelentes, especialmente contra ciertos insectos como las termitas o comejenes y algunos nemátodos. En el departamento del Huila es común esta práctica, especialmente en los cultivos de arroz (AUPEC, 1997).

### **2.2.1 Descripción botánica del genero *Azadirachta indica***

El nombre científico del Neem es *Azadirachta indica*, pertenece a la familia Meliácea. Es un árbol de crecimiento rápido, de hoja perenne, que alcanza alturas de hasta 20 metros en condiciones óptimas, con un diámetro medio de la copa de 5 a 10 metros, destacando su sistema radicular por tener una raíz pivotante muy desarrollada (Ramos, 2002). Además el árbol logra su máxima producción de frutos a los 10 años y llegan a vivir más de 100.

Dentro de la representación botánica, se describe: de corteza gris, o gris oscura, áspera, café rojiza en su interior, de hojas compuestas imparipinadas alternas de 20 a 38 centímetros de largo, y provistas de 8 a 19 folíolos alternados u opuestos, ovalo-lanceolados, oblicuos o subfalciformes, falciforme-lanceolados, brillantes; las flores son blancas o amarillo-pálido, pequeñas, olorosas, numerosas en largas panículas axilares, hermafroditas; (Figura 1). el fruto es una drupa pequeña, indehiscente en forma de nuececilla, verdes, amarillas cuando maduran, aromático, oblongo o ovoide-oblongo, de 1.3 a 1.8 centímetros de largo, con una sola semilla exalbuminosa (Muñoz, 2001).



**Figura 2.1.** Follaje de *Azadirachta indica* (Investigadores, 2008).

### **2.2.2 Categorías taxonómicas de *Azadirachta indica*.**

Según recopilación de Parrotta, 1995, Muñoz, 2001 y Biswas *et al.*, 2002

Reino:	Vegetal.
División:	Embriofitas.
Subdivisión:	Angiospermas.
Clase:	Dicotiledóneas.
Orden:	Rutales.
Suborden:	Rutinae.
Familia:	Meliaceae.
Subfamilia:	Melioideae.
Género:	<i>Azadirachta</i> .
Especie:	<i>indica</i> .
Sinonimia:	<i>Melia indica</i> Juss <i>Melia azadirachta</i> L., Neem, Margosa

### **2.2.3. Características ambientales**

El Neem puede resistir bien la sequía y años extremadamente secos con precipitaciones de 150 mm así como periodos secos de 6 a 9 meses (Tabla 1), aunque en estudios realizados en la India se observó que en años muy secos el

árbol respondió con caída de hojas, mientras que a temperaturas, por debajo de 10°C, es muy difícil que se produzca fructificación (Ramos, 2002).

**Tabla 2.1.** Factores climáticos y de suelo que tolera *A.indica* (Ramos, 2002).

Límites	Límites			
	Intervalo	inferiores	Óptimo	Superiores
Lluvia (mm)	<300	500-800	1800	2000-2500
Temp. (°C)	4	10-20	27	40-49
Arcilla (%)	<25	25-45	>45	>70
Arena (%)	<50	50-75	>75	>85

El rendimiento del árbol puede variar entre 30 y 100 kg de frutos dependiendo de las lluvias, insolación, el tipo de suelo y de variedad. En la India, de los 18 millones de árboles existentes se obtienen 3.5 millones de toneladas de semillas de las cuales se pueden extraer 700.000 toneladas de aceite de estas, mientras que solo se produce 150.000 toneladas de aceite al año (Ramos, 2002), siendo esto un impedimento para la obtención de principios activos durante todo el año, debido a que la planta solo fructifica en determinado periodo de tiempo por lo que sería de gran ayuda aprovechar su forraje.

### 2.3 Consideraciones Químicas del Neem

El Neem contiene cientos de componentes químicos, de especial interés, los terpenoides, compuestos por C, H y O; la presencia del oxígeno hace esos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano, gasolina u otros solventes similares. Actualmente se conoce la existencia de unos 100 terpenoides. En el Neem, el más activo es la azadiractina, de la que existen varios tipos que varían desde la azadiractina A a la azadiractina K (Angulo, 2004., Damaria, 2004 y Ramos *et al.*, 2004).

Entre los principales compuestos bioactivos del Neem se encuentran: nimbidina, nimbidato de sodio, nimbolida, gedunina, azadiractina, ácido gálico, margolona y polisacáridos. Tiene además características destacables como resistencia a algunos insectos por tratarse de una mezcla de componentes bioactivos. Además de ser sistémico a través de las raíces cuando se aplican al suelo, es decir de fácil

absorción por parte de las raíces hasta llevarlo a las hojas, sobre todo por acción de la radiación ultravioleta, con una persistencia de 4 a 8 días y posibilidad de sinergismo con otros productos a base *Bacillus thuringiensis* (Salazar y Pariacote, 2004).

También se han aislado constituyentes como: diterpenos, triperpenoides, polifenoles, compuestos sulfurosos, y poliacetatos derivados (Arshass. *et al*, 1996). Estos extractos están compuestos en su mayoría por productos del metabolismo secundario, como terpenoides, fenoles, aminoácidos no esenciales y alcaloides (Govindachari, *et al.*, 1998). Estudios adicionales han mostrado que los extractos en metanol al 90% por HPLC revelan mayor presencia de triterpenoides. Donde la actividad inhibitoria de hongos se atribuye a fracciones de triterpenoides en el caso de semillas (Govindachari *et al.*, 1998 y Verma *et al.*, 2007)

En forma pura algunos de los triterpenoides tienen una actividad antifúngica muy baja o nula, mientras que la combinación de varios de ellos muestra una excelente actividad contra algunos hongos. Según la literatura los triterpenoides obtenidos de fracciones metabólicas pueden ser antifúngicos, aditivos y tener efectos sinérgicos. Por lo tanto la concentración necesaria para inhibir cada hongo debe ser trabajado independientemente (Govindachari *et al.*, 1998). Además la margosa tiene valor como fuente de agentes antibacterianos, antivirales y nematocidas, por lo que se hace necesario ampliar su estudio para el campo agrícola (Arshass *et al*, 1996).

### **2.3.1 Antecedentes químicos de la especie *Azadirachta indica*.**

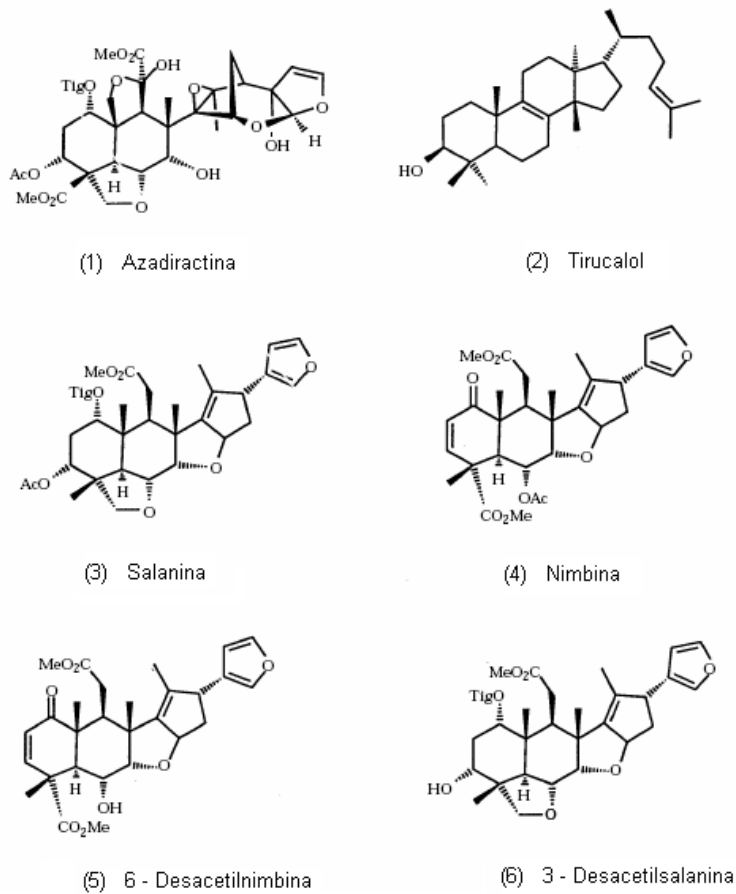
El Neem ha sido usado por siglos como fuente de pesticidas al que los insectos no han desarrollado resistencia, diversos extractos de semillas de Neem, en particular los que contienen el tetratriterpenoide hidrofílico azadiractina, se conoce que influyen en la conducta de alimentación, la metamorfosis, y fecundidad de algunos insectos (Roland *et al.* 1995) y (Carter *et al.* 1992). Yamasaki y colaboradores demostraron que el tetratriterpenoide salanina, puede ser aislado de extractos crudos de la planta, obtenida de las semillas de Neem de la India, las cuales son conocidas por su alto contenido de salanina usando hexano. La actividad biológica

del extracto salanina es reportado por disuadir la alimentación e inhibir el crecimiento cuando es aplicado para insectos masticadores como orugas y escarabajos. Estos estudios a partir de semillas proporcionan un nuevo extracto de Neem libre de azadirachtina y sin embargo muestra ser efectivo como fungicida e insecticida a nivel foliar (Locke *et al.*, 1993, 1994).

Más de 100 metabolitos terpenicos son reportados de semillas/frutos del árbol de neem. Varios métodos han sido descritos para la extracción de estos componentes activos en formas crudas o semicrudas para ser utilizado en vehiculos comercialmente aceptables ya sea en forma líquida y/o formulaciones sólidas (Damaria *et al.*, 2004).

Un sin número de compuestos han sido identificados en las hojas a partir de extractos fitoquímicos usando solventes de diferentes polaridades entre los que se encuentran: vilasina-3-acetil-7-tigloil-lactona, 3-desacetil-3-cinnamoil-azadiractina, 3-deacetil-salanina, 6-desacetilnimbinena, ASH, Azadiractina, Azadiractina-A, nimbina, salanina, Beta-sitosterol, Calcio, Carbohidratos, Fibra, Hiperosido, Isoazadirolide, Magnesio, Nimbaflavona, Nimbadiol, Fósforo, Proteínas, Quercetina, Quercitrina, Rutina, y Vilasanin entre otros (Figura 2). (Williams *et al*, 2007).





**Figura 2.2.** Estructura química de los principales compuestos aislados de material foliar del árbol *Azadirachta indica* (Johnson *et al.*, 1996).

## 2.4 ANTIFÚNGICOS COMERCIALES

Para evaluar la actividad antifúngica de las plantas, es necesario emplear un control positivo con los fungicidas comerciales para tomarlos como punto de referencia, aunque ha sido estudiada la resistencia adoptada por parte de los microorganismos a estos en el control de enfermedades fitopatológicas (Márquez *et al.*, 2007). Los diversos métodos de control disponibles, esencialmente el control químico,

presentan problemas en cuanto a eficiencia, costo e impacto negativo al ambiente (Marcano *et al.*, 2005)

#### **2.41. Ketoconazol**

Es un antimicótico imidazólico que se comporta, dependiendo de la concentración, como fungistático o fungicida. Antimicótico azólico actúa interfiriendo con la actividad de la enzima citocromo P450, que es necesario para la demetilación del 14- $\alpha$ - metilesterol a ergosterol. El ergosterol es el principal esteroide de la membrana celular del hongo, llegando a ser consumida. Este daño de la membrana de la célula, produce modificaciones en las funciones de permeabilidad de la membrana (Hersil, 2002). Este antibiótico es empleado en ensayos de actividad biológica de extractos vegetales como control positivo (SiaRam *et al.*, 2000).

### **2.5 DISOLVENTES**

#### **2.5.1 Dimetilsulfóxido**

El dimetilsulfóxido (DMSO,  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ ) es un líquido incoloro, ligeramente aceitoso, que se utiliza principalmente como solvente industrial se obtiene como subproducto durante el procesamiento de pulpa de madera para fabricación de papel (Tillman, y Bean, 1970), y es líquido a temperatura y presión ambiente. Descubierta por Saytzeff en 1866, se usó como solvente orgánico a partir de la década de 1940, y como criopreservante a partir de 1961. Es aprótico y altamente dipolar, en razón de la separación de cargas entre el oxígeno y el azufre, y, por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos. Puede formar complejos en sistemas biológicos con cationes metálicos, biomoléculas (hormonas, enzimas, eicosanoides) y drogas, al asociarse con pares de electrones no compartidos en aminas, alcoholes, ésteres y ácidos. Atraviesa rápidamente la pared y las membranas celulares de microorganismos sin dañarlas, por lo que sirve como acarreador de drogas y extractos a través de dichas barreras (García, 2001).

En varios bioensayos realizados a partir de extractos vegetales, se encuentran estudios de permeabilidad *in vitro* que utilizan dimetilsulfóxido (DMSO) como cosolvente (SaiRam *et al.*, 2000). Los estudios publicados indican que la presencia de un 1% de DMSO en las disoluciones ensayadas no modifica la integridad de las membranas celulares por lo que no tiene un efecto negativo que impida el crecimiento de microorganismos (Álvarez *et al.*, 2005).

### **2.5.2 Tween 80**

Una de las propiedades fisicoquímicas más conocidas de este surfactante es su actividad tensoactiva, la cual permite la migración de las moléculas a la interfaz de la solución. La alineación de las moléculas del surfactante en la interfaz es un reflejo de la tendencia a asumir la orientación energéticamente más estable. Los surfactantes o tensoactivos se clasifican comúnmente sobre la base de : 1) la carga o naturaleza de la parte hidrofílica y 2) la flexibilidad o naturaleza química de la parte hidrofóbica.

Los grupos principales de los tensoactivos pueden ser aniónicos y catiónicos. El balance entre los grupos hidrofílicos y lipofílicos determina en gran medida su estado físico y característica química.

El tween 80 es un líquido ámbar, agente surfactante hidrofílico y tiene amplia aplicación en la elaboración de alimentos y son generalmente reconocidos en microbiología, en la dispersión de microorganismos durante la preparación de inóculos y para la reconstitución de agentes antimicrobianos hidrofóbicos (Kamande *et al.*, 2000).

## **2.6 HONGOS FITOPATÓGENOS**

Varias enfermedades de las plantas se deben a la acción de hongos fitopatógenos que han mostrado ser específicos para el órgano al que se unen, mientras que algunos colonizan partes aéreas otros pueden invadir tejidos, por mecanismos de

adhesión, penetración e invasión, dejando consigo el deterioro de la planta. La mayoría de los hongos fitopatógenos producen tubos germinales a partir de esporas, en un proceso muy parecido a la germinación de semillas en plantas, ya que se encuentran sujetas a factores ambientales como luz, agua, temperatura, y nutrientes. En este proceso las esporas se desplazan hacia la zona de penetración finalizando en el enquistamiento de la espora y su adherencia a la planta.

La penetración puede ser de forma mecánica, por digestión enzimática o a través de aberturas naturales o de heridas causadas por procesos naturales (caída de hojas, formación de raíces secundarias, etc.) prácticas agrícolas (poda, recolección, etc.) o ataques por insectos.

Muchos de los hongos fitopatógenos se caracterizan por tener un periodo de latencia antes de invadir el tejido vegetal, entre las medidas de control biológico se han usado extractos de origen vegetal a partir de hojas y semillas como manera preventiva contra el ataque de hongos como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum*

## **2.6.1 Generalidades de *Sclerotinia sclerotiorum***

### **2.6.1.1 Descripción básica**

*Sclerotinia sclerotiorum*, es un hongo polífago que afecta un amplio rango de hospedantes (Monaco *et al.*, 1998). Pertenece a la división Ascomycota, habitante del suelo, está distribuido mundialmente de extensa distribución en climas templado y subtropical. Por lo menos 383 especies, en 225 géneros de 64 familias de plantas, han sido listados como hospedantes de este patógeno destructivo de muchos cultivos importantes, entre otros, numerosas hortalizas y especies ornamentales, soja, girasol, maní, tabaco (Cundom *et al.*, 2000). Este patógeno es el agente causante de la enfermedad de la lechuga conocida como 'Moho blanco', 'Putridión blanda' o 'Putridión del cuello', que incrementa substancialmente las pérdidas económicas para el productor (Alexopolus, 1985).

El hongo crece rápidamente en cultivo produciendo un micelio algodonoso blanco, abundante, en el que se desarrollan esclerocios negros hasta de 1 centímetro de diámetro, con una superficie ligeramente punteada, que a menudo exudan gotas de líquido en atmósferas saturadas. *Sclerotinia sclerotiorum* presenta hifas que se ramifican con un diámetro medio de 8.5  $\mu\text{m}$  y que se desarrollan sub-apicalmente a partir de la hifas de infección, se ramifican abundantemente y se penetran en el huésped inter e intracelularmente (Mello *et al.* 2005). En las colonias viejas se forman a menudo microconidias fialídicas unicelulares, no presenta macroconidias. Los esclerocios tienen germinación miceliogénica y carpogénica; en el primer caso dan lugar a hifas vegetativas y en segundo, en condiciones favorables a apotecios que tienen forma de copa. Las ascas son cilíndricas clavadas de hasta 130 x 10 $\mu$ , con 8 esporas. Las ascosporas son uniseriadas y elípticas de 9 – 13 x 4 – 6.5  $\mu$  (Smith, 2002) y son la principal fuente primaria de inóculo para la infección en soja (Monaco *et al.*, 1998).

#### **2.6.1.2 Infección**

*S. sclerotiorum* causa en una amplia gama de huéspedes una podredumbre blanda progresiva de tejidos no lignificados; los daños son especialmente frecuentes en tallos de plantas herbáceas y en órganos de almacenamiento de hortícola (Sun y Yang, 2000). También, causa lesiones de hojas, pero solo si las condiciones para su extensión son muy favorables (Pennypacker, y Risius. 1999). La enfermedad que produce se caracteriza por la formación de lesiones extensas blandas, normalmente de color claro y el crecimiento de un tapiz miceliar blanco algodonoso sobre la superficie y en el interior de las cavidades del huésped. Posteriormente se forma en las cavidades medulares de los tallos y de los pecíolos esclerocios negros prominentes cuya aparición es un carácter de diagnóstico fiable (Mello *et al.*, 2005). El primer síntoma notable en la planta infectada cerca del nivel del suelo se presenta como un marchitamiento, al que sigue rápidamente un colapso total (Purdy, 1999).

Los esclerocios son de principal importancia en la supervivencia y epidemiología de *S. sclerotiorum*; se ha demostrado que este hongo es capaz de formar esclerocios

secundarios en el suelo. Dichos cuerpos de resistencia, bajo condiciones favorables de sequía permanecen viables por al menos 10 años (Cundom, M. *et al.*, 2000).

La colonización inicial de los tejidos muertos provee nutrientes para el establecimiento del patógeno y recursos para infectar tejidos sanos de la planta. El grado de patogenicidad se relaciona con la producción de ácido oxálico y la expresión de enzimas que degradan la pared celular y causa lesiones que se expanden (Mueller. *et al.*, 2002). Estas actividades liberan pequeñas moléculas (oligo-galacturonidos y péptidos) que sirven para inducir la expresión de una segunda onda de enzimas degradativas que colectivamente llevan a la disolución casi total de los tejidos de la planta (Arias *et al.*, 2007). También parece que para la infección se necesita una base exógena de nutrientes. Los tejidos heridos, muertos o senescentes se colonizan con facilidad y sirven como una base nutritiva desde la que puede tener lugar la infección de tejidos sanos (Reichard *et al.*, 1997).

El ciclo de la enfermedad inicia en el suelo cuando las estructuras de reposo, denominadas “esclerocios”, comienzan el proceso de germinación que se puede presentar en dos modalidades: a) carpogénica, que produce apotecios los cuales forman ascosporas que se transportan a través del viento hacia plantas susceptibles; y b) miceliogénica, la de mayor frecuencia en el trópico, en la cual el esclerocio produce un micelio que ataca las partes de la planta que están en contacto con la superficie del suelo. La dispersión del inóculo de la enfermedad se da a través del viento en el caso de las ascosporas (Sun y Yang, 2000), mientras los esclerocios y el micelio se diseminan por el movimiento de suelo contaminado de un lugar a otro; también mediante las herramientas de la finca, el calzado, plántulas infectadas, la fertilización con estiércol de animales alimentados con residuos de cosechas infectados y las semillas. (Arias *et al.*, 2007 y Alexopolus, 1985).

Las ascosporas germinales producen apresorios que pueden variar desde formas lobuladas simples a ramificados complejos; la penetración normalmente es directa a través de la cutícula, ayudada por una importante disolución pectolítica y ceulolítica de la estructural celular del huésped. Al descomponerse el huésped los

esclerocios vuelven al suelo o pueden distribuirse por las operaciones culturales, la recolección, el pastoreo, etc (Agrios, 1998)



**Figura 2.3.** *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Macroscopía, B) Microscopía (Investigadores, 2008)

## 2.6.2 Generalidades de *Fusarium oxysporum*

### 2.6.2.1 Descripción básica

Esta especie, la más importante del género *Fusarium*, en medio papa dextrosa (PDA) las colonias tienen un aspecto variable que depende de la cepa; en general el micelio aéreo y el medio cambia de color a distintos tonos desde violeta a morado oscuro; si abundan los esporodocios las colonias pueden aparecer color crema o naranja (Agrios, 1998).

Perteneciente a la clase Deuteromycete (por no poseer un ciclo sexual definido), y a la familia tuberculariacea. Los hongos de este género se caracterizan por presentar macroconidias con una célula basal definida presencia o ausencia de microconidias y clamidosporas terminales. Las conidias son producidas en formas simples, polifialídicas, enteroblásticas o clamidosporas. Las microconidias son abundantes sin septas o con una septa, de forma piriforme, oval o cilíndrica y se origina en fialides simples que salen lateralmente de las hifas o de cortos conidioforos ramificados. Las macroconidias en algunas septas son escasas, con 0 a 10 septas; son de pared delgada, de forma recta o curva fusoides o puntuadas en ambos extremos y de varios tamaños, se originan de conidióforos ramificados que forman

esporodocios. Las clamidiosporas son abundantes de pared lisa como rugosa y son terminales e intercalares, solitarias y ocasionalmente en pares o cadenas (Sarasola, 1975; Pereira, 1995). Tiene la ventaja de poder invadir fácilmente el tejido vascular y junto con los conidios bloquea físicamente los vasos del xilema impidiendo el transporte de agua. Cuando se bloquean una cantidad considerable de vasos se produce marchitamiento de la planta (Alexopolus, 1985).



**Figura 2.4.** *Fusarium oxysporum*. A) Macroscopía, B) Microscopía. (Investigadores, 2008)

### 2.6.2.2 Infección

El género *Fusarium* habita en el suelo y sobrevive entre los restos de plantas infectadas que yacen en el mismo en forma de micelios mediante clamidiosporas (Landa *et al.*, 2001). Los tubos germinales de las esporas penetran directamente por las puntas de la raíz, mediante heridas o a nivel de zonas donde se forman las raíces laterales (Summerell *et al.*, 2003). El micelio se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilemáticos ascienden hasta la parte superior de las plantas en el torrente de la savia obstruyendo los vasos y afectando el transporte de agua, causando la marchitez de las hojas (Moros *et al.*, 2003). Esta marchitez varía según el huésped, el patotipo y las condiciones de infección; en general las hojas más viejas muestran un aclarado vascular leve, clorosis de la lamina o marchitez, y estos síntomas progresan posteriormente a las hojas jóvenes, a menudo iniciándose unilateralmente en correspondencia con una infección localizada en la parte del sistema vascular de raíz y tallo; las partes



afectadas de la planta empardecen (Summerell *et al.*, 2003). En el tallo aparecen estrías longitudinales necróticas que se extienden hasta el ápice (Agrios, 1998). Los síntomas internos pueden verse a simple vista en secciones de raíz, tallo y peciolo. El empardecimiento comienza en el tejido vascular y se extiende al córtex en las fases tardías de la infección (Nelson *et al.*, 1994). La marchitez se desarrolla con especial rapidez en la floración o fructificación. En los cultivos aparecen en focos que se extienden causando la muerte prematura de las plantas afectadas (Agrios, 1998).

La patogénesis esta relacionada con el bloqueo de los vasos y la formación de enzimas y toxinas. La marchitez se debe a que las clamidiosporas pueden resistir de forma inactiva durante varios años y germinar al disponer de nutrientes, por ejemplo en partes jóvenes de raíz (Smith, 2002).

### **2.6.3 Generalidades de *Fusarium roseum***

#### **2.6.3.1 Descripción básica**

Las especies de *F. roseum* son predominantes en estudios aerobiológicos en prácticamente todo el mundo. Se distribuyen en numerosas plantas y están presentes en diferentes tipos de suelo. Pueden ser importantes fitopatógenos del arroz, caña de azúcar, sorgo y maíz. También pueden afectar a plátanos, tomates y melones. Su esporulación es más intensa en periodos cálidos y húmedos. Durante los meses fríos o en estaciones secas, las especies de *F. roseum* sobreviven en los restos de plantas y el suelo (Smith. 2002).

*Fusarium roseum*, presenta colonias de crecimiento rápido, vellosas, algodonosas, inicialmente blancas, y, en algunos medios de cultivo, con una pigmentación rosa en el centro que difunde a todo el cultivo. Las colonias pigmentadas tienen el centro rosa-naranja intenso, con zona marginal rosa pálido y bordes blancos. Reverso de color rosa-naranja intenso (Smith. 2002). Los cultivos de este hongo en medio papa-dextrosa son predominantemente rosa-rojizos con micelio de  $3,5 \times 10-14 \mu\text{m}$  y conidios en forma de hoz, de  $2,5 \times 35-63 \mu\text{m}$ , y comúnmente con 3 a 7 células. Estos conidios se caracterizan por presentar una célula basal o pie, bien desarrollada. Las

clamidosporas, cuando son formadas, son globosas, midiendo de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, simples o en cadena. Se forman a partir de un estroma, de forma ovoide, papilado, con diámetro de 150-350  $\mu\text{m}$ . Poseen ascos insetos, conteniendo 8 esporas hialinas. Estas esporas miden de 3,5 x 17-25  $\mu\text{m}$ , presentan de 0 a 4 septos, normalmente de 4 células. Los peritecios son formados con temperaturas de 5-35°C, presentando un óptimo de 29°C, a partir de la ocurrencia de alta humedad y baja incidencia de luz ultravioleta (Llanos, 2000).

En lo que se refiere a la temperatura, *Fusarium roseum* que necesita de un mínimo de 15°C para desarrollarse con un óptimo entre 24 y 27°C y que en cambio, una de las micotoxinas que puede producir como es el caso de zearalenona, solo la producirá a temperaturas entre 10-12°C (Hagler, W. *et al.*, 1979). *Fusarium roseum* es uno de los grupos de mohos con más capacidad genética para producir micotoxinas cuando se tienen las condiciones físicas, químicas y biológicas adecuadas para ello (Gimeno, 2003).

### **2.6.3.2 Infección**

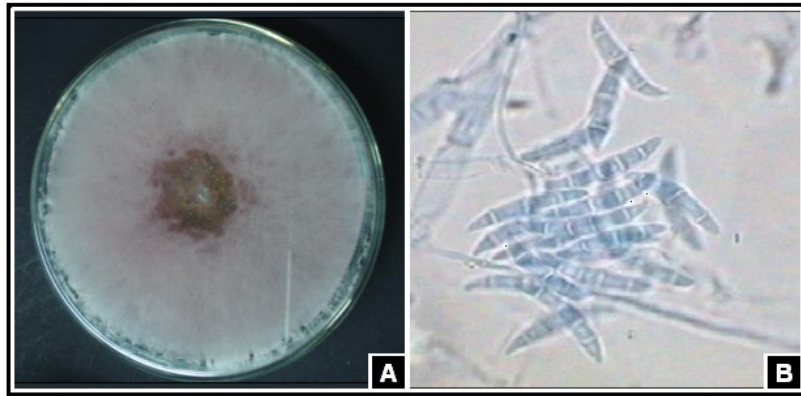
La enfermedad denominada en diversas formas como Fusarium de tallo, pudrición de los brotes o marchitez rosada es causada por el hongo *Fusarium roseum* y se puede presentar en estados iniciales de desarrollo de los esquejes de clavel, en forma de lesiones café rojizas que se van extendiendo a partir de tejidos heridos en la base de la planta; en éste estado inicial no se observa ninguna decoloración vascular puesto que el hongo infecta primariamente el parénquima cortical. En bancos de enraizamiento puede presentarse inhibición del proceso si la infección es severa. Después del trasplante a campo, si las condiciones para la actividad parasítica continúan, una pudrición puede observarse en el cuello de la planta, en la zona de contacto con el suelo/sustrato debido presumiblemente al estrés presentado por las variaciones en potencial hídrico a las que se somete esa porción de la planta (Summerell *et al.*, 2003).

En plantas más maduras los síntomas externos se manifiestan en forma de coloraciones café y rosadas en los tallos, presentadas en la zona adyacente a los

tejidos podridos; ocasionando debilidad en las plantas, pérdida de turgencia de las hojas y marchitamiento parcial de brotes. Las lesiones pueden aparecer en cualquier parte de la superficie, pero comúnmente el extremo basal es el más afectado (Ruíz *et al.*, 2004). Los síntomas de *Fusarium roseum* pueden distinguirse de los de *Fusarium oxysporum* en que la decoloración vascular de éste último se presenta en un sector a lo largo del tallo afectado y casi siempre acompañada de fuerte clorosis en las hojas, todo esto en una porción lateral de la planta, mientras que en el primero ocurre sólo en la zona inmediatamente cercana a los tejidos podridos (Han *et al.*, 2001). En ocasiones se torna difícil distinguir la pudrición por *Fusarium roseum* de la presentada por *Rhizoctonia* ya que sus síntomas son muy similares (Alexopolus, 1985)

Por ser un hongo saprófito de bajos requerimientos nutricionales, sobrevive con facilidad en restos culturales de diferentes cultivos (Goswami, y Kistler, 2004). *F. roseum* presenta poca habilidad de sobrevivir como micelio y es por eso que, en poco tiempo, forma macroconidios y principalmente ascosporas, disminuyendo significativamente su biomasa. De esta forma necesita menor cantidad de nutrientes para su mantenimiento y, en consecuencia, los restos culturales son descompuestos con menor velocidad permitiendo un mayor período de supervivencia (Llanos. 2000).

Las ascosporas se forman en el interior de peritecios de coloración púrpura a negra, los cuales se originan en un estroma sobre tejido o rastrojo de los hospedantes. Los macroconidios se forman en esporodoquios, sobre tejidos infectados. Los macroconidios pueden transformarse en clamidosporas de paredes gruesas cuando son incorporadas al suelo o cuando son inoculados en la espiga. La mayoría de las colonias de *F. roseum* originadas en placas de Petri, conteniendo medio selectivo, sobre las que se vertió una suspensión del suelo, se desarrollan a partir de hifas (Kotsonis *et al.*, 1975). La naturaleza del inóculo para infectar espigas de trigo requiere diseminación aérea para que alcancen los sitios de infección. Por eso las ascosporas, y probablemente los macroconidios, sean los tipos más importantes de inóculos para las epidemias (Llanos. 2000).



**Figura 2.5.** *Fusarium roseum*. A) Macroscopía, B) Microscopía. (Investigadores, 2008)

### **3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Existe una gran incidencia de hongos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum* en el sector agropecuario, que ocasionan bajas considerables en el rendimiento y la productividad de los cultivos, no solo por las enfermedades que desencadenan durante la pre- y postcosecha, sino porque la mayoría de veces, han tratado de ser controlados con productos químicos, ocasionando además del deterioro ambiental, problemas de salud para quienes aplican y consumen los productos tratados con ellos, junto con el desarrollo de resistencia en los fitopatógenos, resultando en pérdidas de la rentabilidad de los cultivos.

Esta situación plantea la necesidad de buscar otro tipo de estrategias de control de estos fitopatógenos, que evite el empleo de químicos de elevado costo en el tratamiento de estos. Mediante la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos foliares de la planta de Neem (*Azadirachta indica*) que por su amplio reservorio de compuestos bioactivos, pueden ser aplicados de manera preventiva, para el control natural de estos hongos fitopatógenos.

#### **3.2 JUSTIFICACIÓN**

La biodiversidad encontrada dentro de los extractos de diferentes plantas, ha resultado en el descubrimiento de un gran número de productos bioactivos con aplicación en diferentes campos. Para la fitoprotección de cultivos agrícolas, se han encontrado compuestos con potencial biocontrolador, que pueden inhibir el crecimiento o interferir con eventos relacionados con la patogénesis de fitopatógenos, contribuyendo así con la disminución de la resistencia a los fungicidas químicos empleados comúnmente y minimizando los efectos negativos de ambos factores (patógeno y productos químicos), sobre las cosechas.

Las propiedades de la planta de Neem (*Azadirachta indica*) han sido corroboradas por la ciencia actual y se puede obtener provecho de todas las partes del árbol. El aceite de Neem es utilizado en la agricultura biológica por ser biodegradable y no tóxico; se cree que puede sustituir a los insecticidas petroquímicos. Es repelente de insectos, antibacterial, antiinflamatorio, antihelmíntico, antimalárico, antiviral, antioxidante, entre otras.

Estos beneficios potenciales pueden ser descubiertos mediante bioensayos de los extractos foliares del árbol *Azadirachta indica* y de su actividad antifúngica *in vitro* contra los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, y *Fusarium roseum* que beneficiaría en el futuro a un gran número de productores y comercializadores del campo agroindustrial del país.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antifúngica del extracto foliar de la planta de Neem (*Azadirachta indica*), *in vitro* contra los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Emplear métodos fitoquímicos para la obtención del extracto Etanólico de las hojas del árbol *Azadirachta indica*.
- Obtener las diferentes Fracciones de Éter de Petróleo, Diclorometano y Acetato de etilo a partir del extracto etanólico de *Azadirachta indica*.
- Valorar la actividad inhibitoria del crecimiento de los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum*, probados contra el extracto etanólico y cada una de las fracciones derivadas de las hojas de la planta *Azadirachta indica*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación se realizó dentro de las instalaciones del laboratorio de Fitoquímica y Química Microbiológica del departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana, siguiendo paso a paso los métodos tradicionales usados en los estudios Fitoquímicos (recolección, secado, extracción, fraccionamiento y bioensayos).

### **5.1 Recolección y Preparación del material vegetal**

La recolección del material vegetal de *Azadiractha indica* se realizó en el Departamento de Antioquia, en el municipio de Santa Fe de Antioquia, en la vereda el Espinal, con una altitud promedio de 500 m.s.n.m, libre de plagas y enfermedades. La muestra se seco a temperatura ambiente durante siete días, se molió finamente en un molino de cuchillas con el objeto de obtener mayor área de contacto del solvente haciendo el proceso extractivo más eficiente, y se procedió a la obtención del extracto y fracciones.

Un ejemplar de la especie estudiada se encuentra en el Herbario Pontificia Universidad Javeriana (HPUJ), identificada con número: 027194

### **5.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

Los métodos de extracción del material vegetal deben obedecer a la naturaleza química de las sustancias presentes en la planta y al propósito de investigación, en la búsqueda de sustancias para la comprobación de la actividad biológica, la extracción del material vegetal frecuentemente se realiza con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y baja reactividad. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los compuestos presentes. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados (Tood, 1998).

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para sustancias de baja polaridad se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para



sustancias de mediana polaridad y alta polaridad el acetato de etilo, etanol y acetona (Torrenegra, 1983).

### **5.3 Estudio Fitoquímicos**

#### **5.3.1 Obtención del Extracto Etanólico**

Para la extracción fitoquímica se tomaron aproximadamente 1100g de hojas, finamente picadas, maceradas y depositadas en un erlenmeyer de 5000 mL al cual se la adicionó etanol, hasta cubrir el material vegetal dejando durante 10 días (Márquez et al., 2007), para así obtener el extracto etanólico. Luego con la ayuda de un embudo y utilizando papel filtro la mezcla obtenida se filtró para eliminar el material vegetal y los sólidos remanentes. Posteriormente se realizó un secado y concentración en un rotaevaporador a presión reducida (Figura 5.1).

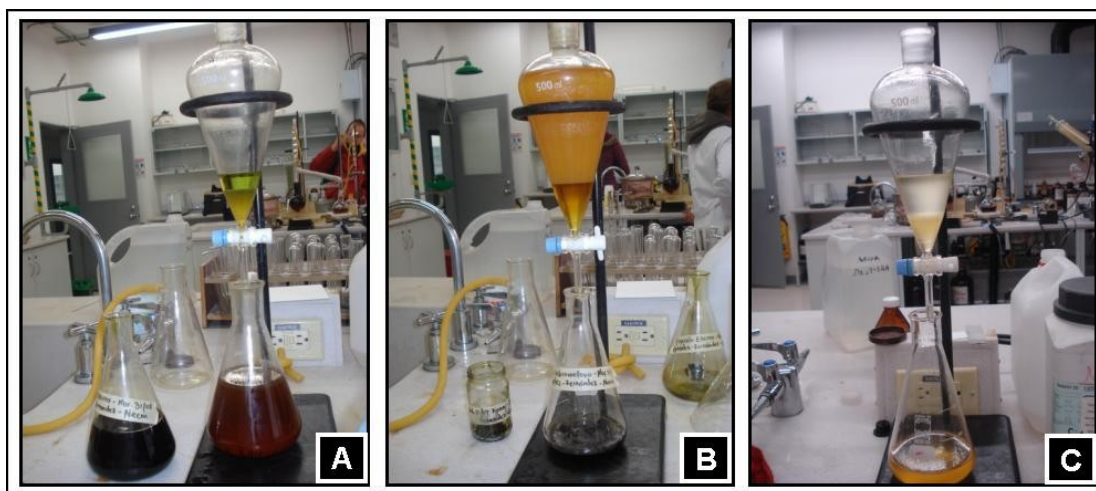


**Figura 5.1.** Rotaevaporador Büchi B-480 (Investigadores, 2008)

#### **5.3.2 Obtención de Fracciones a partir del Extracto Etanólico**

Al extracto etanólico se le realizó un proceso de fraccionamiento líquido - líquido discontinuo con Éter de Petróleo, Diclorometano y Acetato de Etilo para obtener las respectivas fracciones que se utilizaron en este estudio. La técnica de Extracción discontinua usa un embudo de decantación en el que se colocan el liquido a extraer y el solvente de fragmentación, se tapa y se agita (Figura 5.2). (teniendo en cuenta

la precaución de quitar la tapa y/o abrir la llave inferior del embudo para disminuir la presión interna) (Pedrozo, 1999). Para aumentar la eficiencia de la extracción fue necesario hacer pasar 50 mL por 10 veces de cada uno de los solventes de fragmentación hasta completar un volumen final de 500 mL respectivamente o hasta obtener el solvente de fragmentación incoloro. Luego se concentro cada una de las fracciones obtenidas a presión reducida en un rotaevaporador Büchi B-480 controlando temperatura y presión para cada una de ellas.



**Figura 5.2.** Fraccionamiento líquido-líquido. A) Fracción de Éter de petróleo, B) Fracción de Diclorometano, C) Fracción de Acetato de Etilo (Investigadores, 2008).

## 5.4 Pruebas químicas

### 5.4.1 Reacciones microquímicas de identificación

Las pruebas fitoquímicas preliminares de caracterización, consisten en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas. Estas pruebas se emplean para identificar los compuestos presentes en determinado material como, terpenos, esteroides, sesquiterpenos, fenoles, flavonoides, glicósidos y saponinas (Robles, 1992).

Para asegurar su reproducibilidad, se recomienda, indicar si el material vegetal está fresco o seco; qué cantidad se extrajo, el peso del extracto obtenido y el volumen de la solución de las que se tomaron las alícuotas para las pruebas y la composición exacta de los reactivos empleados. El rendimiento de un extracto obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas del peso vegetal hasta 1-3%. Su composición puede cambiar con la época de recolección, el lugar geográfico o pequeños cambios genéticos (Dominguez, 1973).

En la determinación del tipo de compuestos químicos obtenidos, según Domínguez como lo reporta Robles, 1992; se utilizó las siguientes pruebas cualitativas:

- a) Terpenoides: Lieberman-Burchard y Salkowski.
- b) Sesquiterpenos: Hidroxamato ferrico, Baljet y Legal.
- c) Fenoles y Flavonoides: Cloruro ferrico y Shinoda.
- d) Glicósidos: Antrona.
- e) Antrona disuelta en  $H_2SO_4$

Prueba de Saponinas

#### **5.4.1.1 Terpenoides**

Hidrocarburos, compuestos oxigenados y hasta alcaloides, derivados del ácido mevalónico. Son útiles en taxonomía porque, pueden analizarse con precisión aún en cantidades de microgramos; numerosas estructuras han sido estudiadas, lo que facilita la identificación y correlación; tienen una extensa distribución en los vegetales superiores (Dominguez, 1973).

#### **5.4.1.2 Prueba de Liebermann – Burchard**

Es la prueba más utilizada para el análisis cualitativo y cuantitativo de esteroides y aunque se viene empleando desde hace más de sesenta años, no se conoce bien el mecanismo ni los requerimientos estructurales exactos para que una sustancia de positiva la prueba (Allen's, 1924). En esta prueba, si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva. El orden y tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 minutos) tiene cierto valor diagnóstico;

así, una coloración amarilla después de 15 minutos, parece corresponder a C-14-metilo y una instauración. La prueba es positiva con esteroides que contienen dos enlaces doble conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización o por isomerización (Domínguez, 1973); sin embargo, la experiencia ha demostrado que en general en cualquier esteroide o triterpenoide que posea por lo menos un doble enlace (y en algunos casos aun siendo saturado), puede dar positiva la reacción de Liebermann - Buchard. Como lo anoto Wall y colaboradores (Wall *et al.*, 1954 y Sanabria, 1983).

#### **5.4.1.3 Prueba de Salkowski**

Esta prueba es específica para la identificación de terpenos. Similar a la de Liebermann – Burchard, la muestra (1-2 mg) en 1 mL de cloroformo se pone en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se presentan colores amarillo o rojo (Domínguez, 1973).

### **5.5 Cromatografías bidimensionales para el Análisis de Esteroides y/o Triterpenoides**

En dos placas de Alumina de 10x10 cm cubiertas con sílica gel G60 F254, de 0.25 mm de espesor, se aplico sobre la diagonal y a 2 cm. del vértice inferior izquierdo una muestra de los tratamientos que presentaron mayor actividad antifúngica, en este caso el extracto etanólico y la fracción de éter de petróleo; se corrió la placa en la primera dirección con Diclorometano - Metanol (9,5 : 0,5), se dejo evaporar el solvente de la placa, posteriormente se giro 90° hacia la izquierda y se corrió con una mezcla de éter de petróleo – acetato de etilo (7 : 3). Luego se marco todas las manchas coloreadas, posteriormente se asperjó dentro de una vitrina extractora de vapores con el reactivo de Liebermann – Burchard (Stahl, 1969) y se calentó de 5 a 10 minutos en una estufa a 100°C. Manchas con tonalidad del rojo, azules o verdes, se considera que la planta posee esteroides y/o triterpenoides libres. Las manchas coloreadas que habían sido marcadas no se tienen en cuenta aunque sean reveladas porque pueden corresponder a carotenoides y o xantofilas que son de color amarillo. Para algunos autores cuando se revela, las manchas rosadas, rojas o

violetas indican la presencia de triterpenoides pentacíclicos y las azules o verdes son debidas a esteroides, pero se ha demostrado que existen muchas excepciones a esta regla y por tanto, es preferible hablar de esteroides y/o triterpenoides libres (Sanabria, 1983).

## **5.6 Bioensayo para la valoración antifúngica**

Las cepas seleccionadas fueron donadas por el laboratorio de Microbiología Ambiental y el laboratorio de Química Microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana. Estas cepas se incubaron en agar Papa Dextrosa (PDA OXOID ®) por 7-10 días a 22°C +/- 5°C.

El extracto etanólico, la fracción de diclorometano y acetato de etilo se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO), para quedar a una concentración final en agar PDA de 25mg/mL para el Extracto Etanólico, de 7mg/mL para la fracción de Diclorometano y 2mg/mL para Acetato de Etilo, mientras que la fracción de éter de petróleo se disolvió en tween 80, empleado una concentración final de 7mg/mL. A su vez el diluyente empleado quedo a una concentración final de 0.01mL/mL,

Como control negativo de crecimiento se utilizó (DMSO) al 1% y Tween 80 al 1%. Como control positivo se empleó ketoconazol en una concentración final de 2mg/mL.

La evaluación de la actividad del extracto etanólico y de las fracciones de éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo; contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum* y *Sclerotinia sclerotiorum*, se llevó a cabo por triplicado y se valoró por la técnica de crecimiento radial. Se realizaron mediciones cada 48 horas de cada uno de los hongos fitopatógenos, comparados con el control negativo de dimetilsulfoxido y/o tween 80 para determinar el porcentaje de inhibición.

Para la siembra se empleó discos de agar de 0.6cm de diámetro, colonizados con micelio de los hongos fitopatógenos crecidos. Los discos se colocaron en el centro

de las cajas con medio de cultivo. El medio se elaboró por el método de difusión en placa con los extractos, fracciones, y controles en agar PDA (PDA OXOID®). Las cajas se sellaron, etiquetaron y se incubaron por 4-10 días a 22°C +/- 5°C, se midió el crecimiento diametral de la colonia cada dos días. La medición de la colonia se realizó en dos direcciones, y fue promediado. Estos valores permitieron calcular el porcentaje de crecimiento (%C) tomando el control negativo como el 100%. Los porcentajes de crecimiento permitieron calcular los porcentajes de inhibición según la ecuación: % Inhibición = 100 - %C (Pereira, 1995).

Una vez realizados los bioensayos, se consideró que hay actividad inhibitoria de crecimiento, en la técnica de crecimiento diametral, cuando el porcentaje de inhibición es mayor a 20% (Torrenegra y Pedrozo, 1993).

### **5.6.1 Valoración de la actividad antifúngica**

La valoración de la actividad antifúngica de los extractos y de las fracciones se determinan mediante los siguientes parámetros.

a) Crecimiento Diametral (**CD**): Es el promedio aritmético del crecimiento diametral de la colonia en dos cajas.

b) Porcentaje de crecimiento (**% C**): Es el crecimiento diametral de la colonia en la sustancia de prueba relativo al crecimiento de la colonia en el control negativo (C.N) (Torrenegra y Pedrozo, 1993).

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro del crecimiento del hongo en el ext.} \times 100}{\text{Diámetro del control negativo}}$$

(Márquez et al., 2007).

c) Porcentaje de inhibición (**% de IN**): se expresa mediante la formula

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \text{porcentaje de crecimiento}$$

(Márquez et al., 2007).

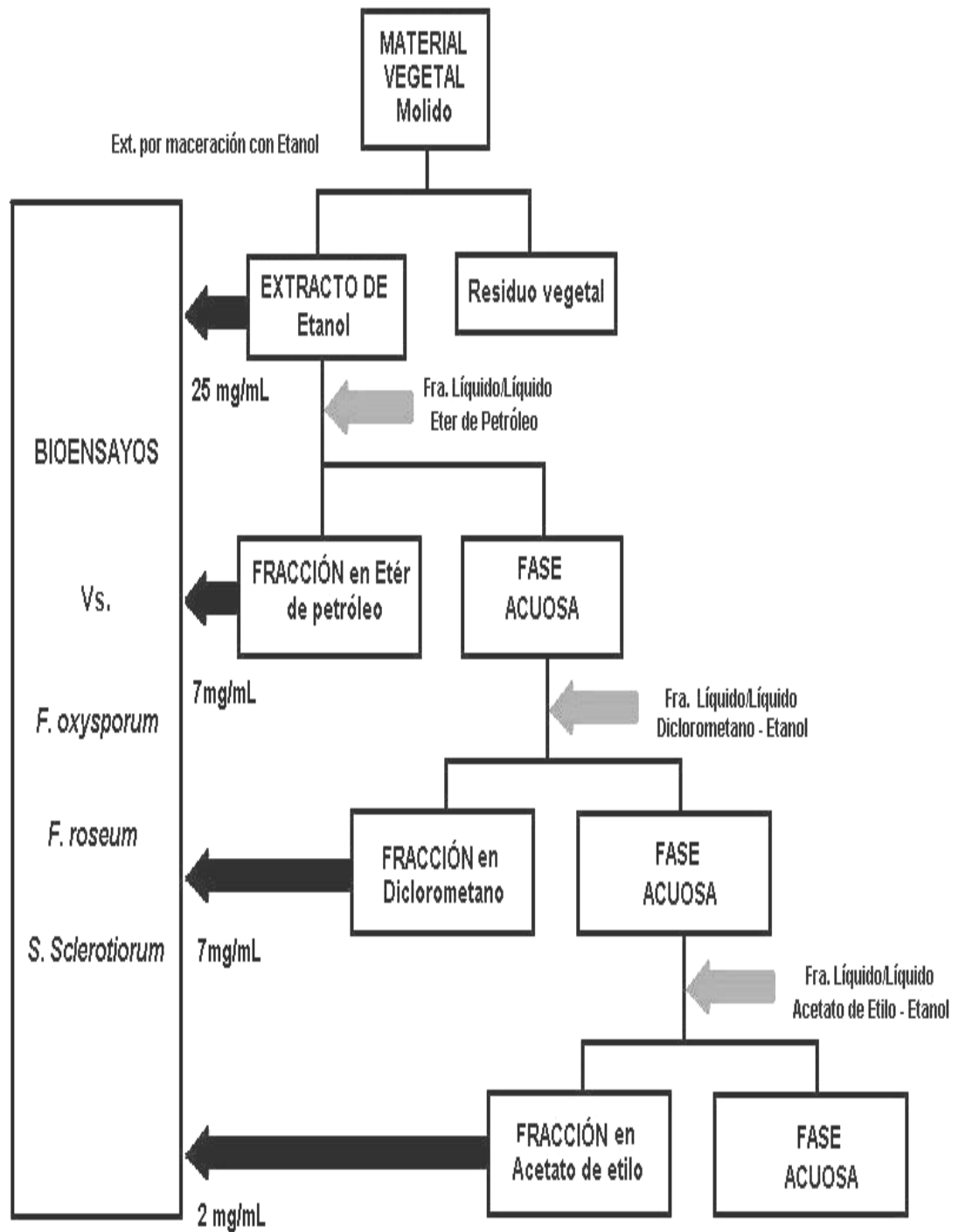


Figura 5.3. Diagrama de flujo de la metodología (Investigadores, 2008).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO Y FRACCIONES

Los extractos etanólicos concentrados fueron diluidos con etanol - agua (1:2) para el proceso de fraccionamiento con solventes de diferentes polaridades: Éter de Petróleo, Diclorometano, y acetato de etilo. Las fracciones obtenidas se concentraron en un rotaevaporador con presión reducida hasta obtener el menor volumen posible y se obtuvieron las siguientes cantidades para cada fracción a partir del extracto Etanólico (Tabla 6.1)

**Tabla 6.1.** Peso en gramos de las fracciones obtenidas a partir del extracto Etanólico

<b>Solventes</b>	<b>Peso en gramos</b>
Extracto Etanólico	20,8369
Fracción Éterea	10,5006
Fracción Diclorometano	5,9652
Fracción Acetato de Etilo	0,9387

### 6.2 PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES

Las fracciones fueron sometidas a pruebas químicas preliminares siguiendo la metodología correspondiente. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 6.2. Los resultados negativos no indican la ausencia de los compuestos, ya que las pruebas colorimétricas presentan poca sensibilidad a bajas concentraciones del compuesto y pueden arrojar falsos negativos (Flechas, 2002).



**Tabla 6.2.** Pruebas químicas preliminares para el extracto etanólico y las fracciones, etérea, diclorometano y acetato de etilo.

Para reducir la incidencia y severidad de enfermedades fitopatológicas, se han utilizado estrategias de control, como el uso de germoplasma resistente, el control biológico y prácticas culturales (Drenth y Guest, 20004; Mendoza *et al.*, 2007). Para esto, se propone una alternativa de control biológico como es el uso de extractos vegetales, como lo reportan algunas investigaciones donde revelan un efecto positivo sobre el control de hongos fitopatógenos; confirmándose en este estudio con la evaluación de la acción fungicida del árbol de Neem (*Azadirachta indica*).

Para la valoración de la actividad antifúngica de cada tratamiento, se empleó DMSO 1% y Tween 80 como disolventes. El extracto etanólico, las fracciones de diclorometano y de acetato de etilo, se disolvieron con DMSO 1%. Mientras que la fracción etérea se disolvió con Tween 80, por ser de carácter apolar.

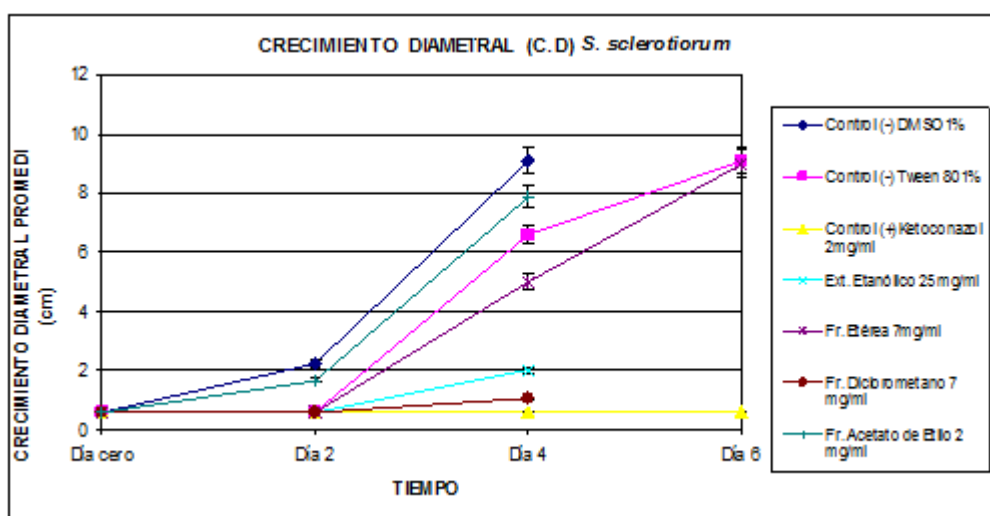
### **6.3.1 CRECIMIENTO DIAMETRAL DE HONGOS FITOPATÓGENOS**

En los ensayos microbiológicos contra los hongos fitopatógenos se observa que el medio de cultivo empleado para realizar los ensayos biológicos (PDA ®) es un medio apto para valorar el aspecto morfológico y coloración de la colonia, por su alto contenido de carbohidratos que condiciona un mayor crecimiento.

#### **6.3.1.1. *Sclerotinia sclerotiorum***

**Tabla 6.3.** Crecimiento diametral promedio (cm) de *S. sclerotiorum* durante seis días de evaluación. (N.A.) No Aplica.

CRECIMIENTO DIAMETRAL (cm)				
<i>S.sclerotiorum</i>	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6
Control (-) DMSO 1%	0.60	2.25	9.10	N.A.
Control (-) Tween 80 1%	0.60	0.60	6.58	9.10
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	0.60	0.60	0.60	0.60
Ext. Etanólico 25 mg/mL	0.60	0.60	2.00	N.A.
Fr. Etérea 7mg/mL	0.60	0.60	5.00	9.00
Fr. Diclorometano 7 mg/mL	0.60	0.60	1.06	N.A.
Fr. Acetato de Etilo 2 mg/mL	0.60	1.65	7.88	N.A.



**Figura 6.1.** Crecimiento diametral (CD) promedio (cm) de *S. sclerotiorum*.

La tabla 6.3 y la figura 6.1 resumen los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* del crecimiento en PDA® del hongo *S. sclerotiorum* en seis días de evaluación. En el control negativo de DMSO 1%, *S. sclerotiorum* alcanza su crecimiento máximo en el día cuarto, por lo tanto el extracto etanólico y las fracciones de diclorometano y acetato de etilo, se evaluaron hasta este día, mientras que en el control negativo de Tween 80 1%, *S. sclerotiorum* presentó su crecimiento máximo al día seis de la evaluación, lo que puede conducir a la afirmación de algunos autores como Álvarez y colaboradores en el 2005, que el DMSO 1% no tiene efecto negativo en el crecimiento de microorganismos, confirmándose en este estudio sobre *S.sclerotiorum* específicamente, al crecer más rápido en el control negativo con

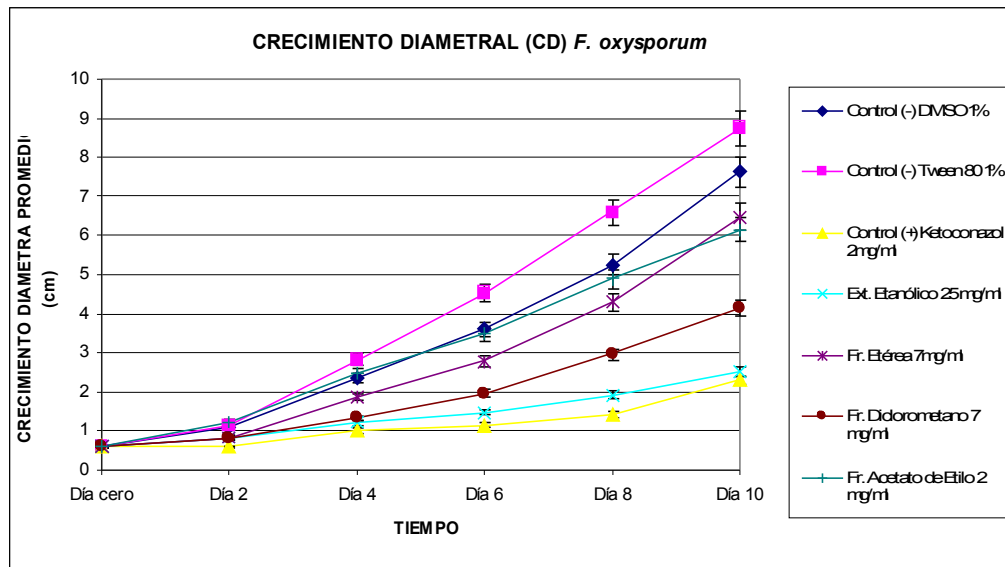
DMSO 1% que en el control con Tween 80 1% en el que no se ha reportado inhibición sobre el crecimiento de ningún hongo hasta el momento.

En cuanto al comportamiento de *S. sclerotiorum* frente al control positivo con Ketoconazol, se observó la determinante acción fungicida de este antibiótico, al no permitir el crecimiento del hongo en lo mínimo. Este antimicótico afecta la actividad de la enzima citocromo P450, necesaria para la demetilación del 14- $\alpha$ - metilesterol a ergosterol (Hersil, 2002). Causó un daño determinante en la membrana celular de *S. sclerotiorum* al evitar la síntesis del ergosterol del hongo, demostrando que a una concentración de 2mg/mL, es suficiente para ejercer una inhibición del 100%.

### 6.3.1.2. *Fusarium oxysporum*

**Tabla 6.4.** Crecimiento diametral promedio (cm) de *F.oxysporum* durante diez días de evaluación.

CRECIMIENTO DIAMETRAL (cm)						
<i>F. oxysporum</i>	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Control (-) DMSO 1%	0.60	1.08	2.35	3.60	5.25	7.63
Control (-) Tween 80 1%	0.60	1.15	2.82	4.53	6.60	8.75
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	0.60	0.60	1.00	1.15	1.43	2.30
Ext. Etanólico 25 mg/mL	0.60	0.80	1.20	1.48	1.92	2.53
Fr. Etérea 7mg/mL	0.60	0.80	1.87	2.77	4.30	6.48
Fr. Diclorometano 7 mg/mL	0.60	0.80	1.33	1.97	2.95	4.15
Fr. Acetato de Etilo 2 mg/mL	0.60	1.22	2.47	3.48	4.87	6.15



**Figura 6.2.** Crecimiento diametral (CD) promedio (cm) de *F. oxysporum*

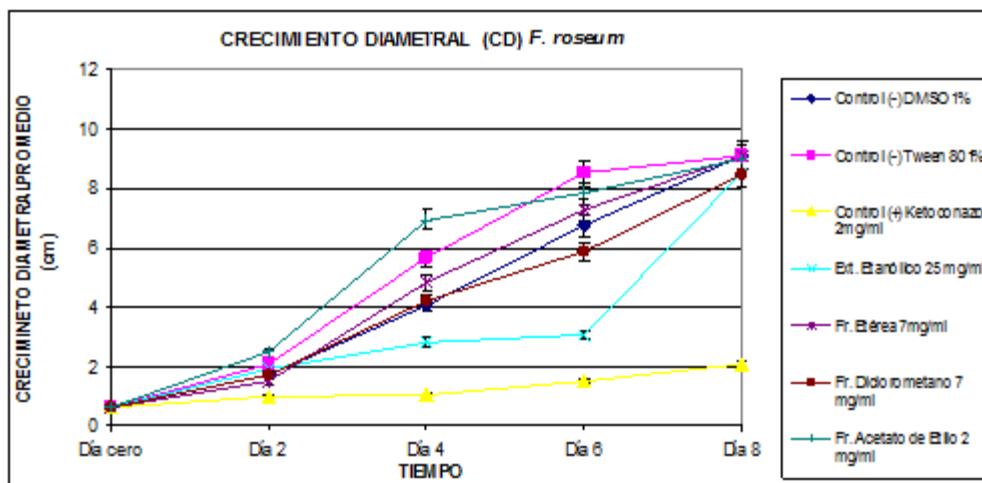
En la tabla 6.4 y figura 6.2 se evidencian los resultados obtenidos en la evaluación del crecimiento en Agar PDA® del hongo *F. oxysporum* en diez días de evaluación. El crecimiento de este hongo fue más lento en comparación con los demás hongos evaluados. Además se pudo evidenciar un crecimiento estable para cada día, es decir su comportamiento fue exponencial. Por otro lado, en esta tendencia se puede demostrar que en el control negativo de DMSO 1%, *F. oxysporum* crece menos que en el control negativo con Tween 80 1%, lo que puede llevar a contradecir lo afirmado por Álvarez y colaboradores en el 2005, quienes mantienen la hipótesis que el DMSO 1% no tiene efecto negativo en el crecimiento de microorganismos, evidenciándose que aunque esté en una concentración de 1% posiblemente presente una acción fungitóxica sobre *F. oxysporum*.

A diferencia en lo observado en *S. sclerotiorum*, el ketoconazol no tiene una inhibición del 100% sobre *F. oxysporum*, aunque sigue siendo efectivo sobre la inhibición del crecimiento.

### 6.3.1.3. *Fusarium roseum*

**Tabla 6.5.** Crecimiento diametral promedio (cm) de *F.roseum* durante ocho días de evaluación.

CRECIMIENTO DIAMETRAL (cm)					
<i>F. roseum</i>	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
Control (-) DMSO 1%	0.60	1.73	4.03	6.73	9.10
Control (-) Tween 80 1%	0.60	2.08	5.65	8.50	9.10
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	0.60	0.98	1.05	1.53	2.08
Ext. Etanólico 25 mg/mL	0.60	1.92	2.80	3.05	8.50
Fr. Etérea 7mg/mL	0.60	1.50	4.83	7.27	9.08
Fr. Diclorometano 7 mg/mL	0.60	1.72	4.22	5.85	8.47
Fr. Acetato de Etilo 2 mg/mL	0.60	2.47	6.92	7.82	9.00



**Figura 6.3.** Crecimiento diametral (CD) promedio (cm) de *F.roseum*

La tabla 6.5 y figura 6.3 señalan los resultados obtenidos en la evaluación del crecimiento en Agar PDA® del hongo *F. roseum* durante ocho días de evaluación. Se demostró, que aunque en la mayoría de tratamientos evaluados *F. roseum* presenta un crecimiento exponencial, en el extracto etanólico se evidenció al sexto día, que la inhibición es mayor que para el día octavo; dicho en otras palabras, se presentó un crecimiento fuerte del día 6 al día 8; confirmándose en las medidas realizadas por triplicado (Anexo 3).

En cuanto a los controles negativos para los dos solventes empleados, DMSO 1% y Tween 80 1%, no se vio ninguna influencia de estos frente al crecimiento del hongo. Por otro lado, aunque los tratamientos evaluados no ejercieron una inhibición importante sobre este hongo, el ketoconazol posiblemente inhibió la síntesis del ergosterol de la membrana celular (Hersil, 2002) de *F. roseum*, confirmando su efecto antimicótico aún sobre el hongo más resistente a los ensayos biológicos de este estudio.

### **6.3.2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN**

Para la interpretación de los resultados obtenidos, se consideraron activos los extractos que presentaron un porcentaje de crecimiento menor o igual a 80 y un porcentaje de inhibición mayor o igual a 20 (Márquez et al., 2007).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa SPSS versión Trial y las gráficas de porcentaje de inhibición se realizaron mediante el programa GraphPad Prism versión 4.0.

Se puede deducir del presente estudio que debido a los numerosos principios activos que se pueden encontrar en la planta *A. indica*, (Wafaa et al., 2007) es probable que de esta planta puedan aislarse moléculas novedosas y eficaces para ser usadas como fungicidas realizando estudios *in vivo*, después de la purificación para cada fracción obtenida de este estudio, con el mayor interés en las fracciones etanólica y de diclorometano, al presentar un mayor efecto inhibitorio contra los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum*. Por lo tanto, al encontrarse infinidad de compuestos en estas fracciones, se vuelve interesante a partir de lo resultado en la presente investigación, continuar con la identificación del o de los metabolitos secundarios responsables de esta inhibición.

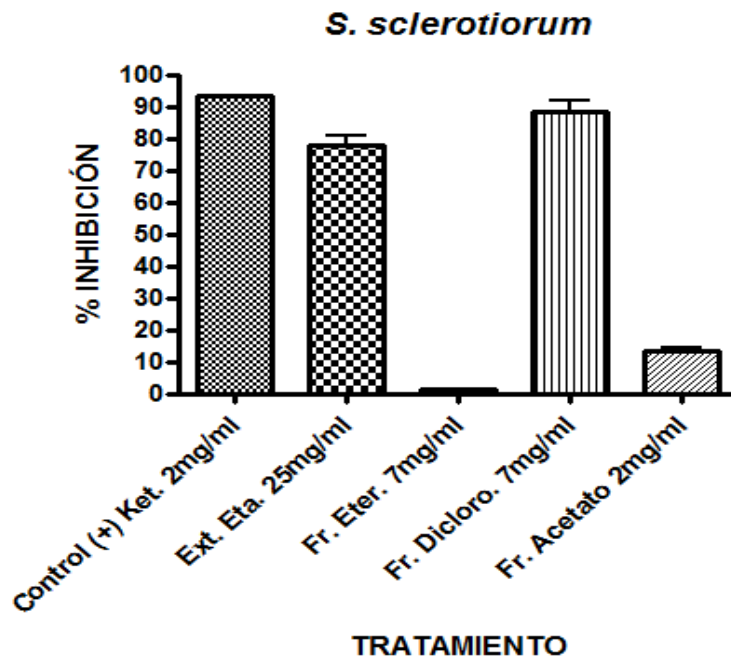
Autores como Hirose et al. 2001, demuestran la acción del aceite de las semillas de Neem en algunos hongos, en cuanto a reducción en la germinación, crecimiento vegetativo y conidiogénesis, por la acción de ácidos orgánicos presentes en esta.

SaiRam y colaboradores en 2000 reportaron actividad antifúngica de crecimiento y reproducción del aceite de semillas de Neem contra bacterias gram positivas y hongos deuteromycetos. Aunque en este trabajo, no se conoce específicamente que metabolito actúa, en los extractos ensayados de la planta *A. indica*, se obtuvo reducción de estas acciones propias del desarrollo fúngico de los hongos fitopatógenos evaluados.

### 6.3.2.1. *Sclerotinia sclerotiorum*

**Tabla 6.6.** Parámetros de medición para *S.sclerotiorum*. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
<i>S.sclerotiorum</i>	CD	%C	%IN
Control (-) DMSO 1%	9.10	100	0
Control (-) Tween 80 1%	9.10	100	0
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	0.60	6.59	93.41
Ext. Etanólico 25 mg/mL	2.00	21.98	78.02
Fr. Etérea 7mg/mL	9.00	98.90	1.10
Fr. Diclorometano 7 mg/mL	1.06	11.65	88.35
Fr. Acetato de Etilo 2 mg/mL	7.88	86.63	13.37



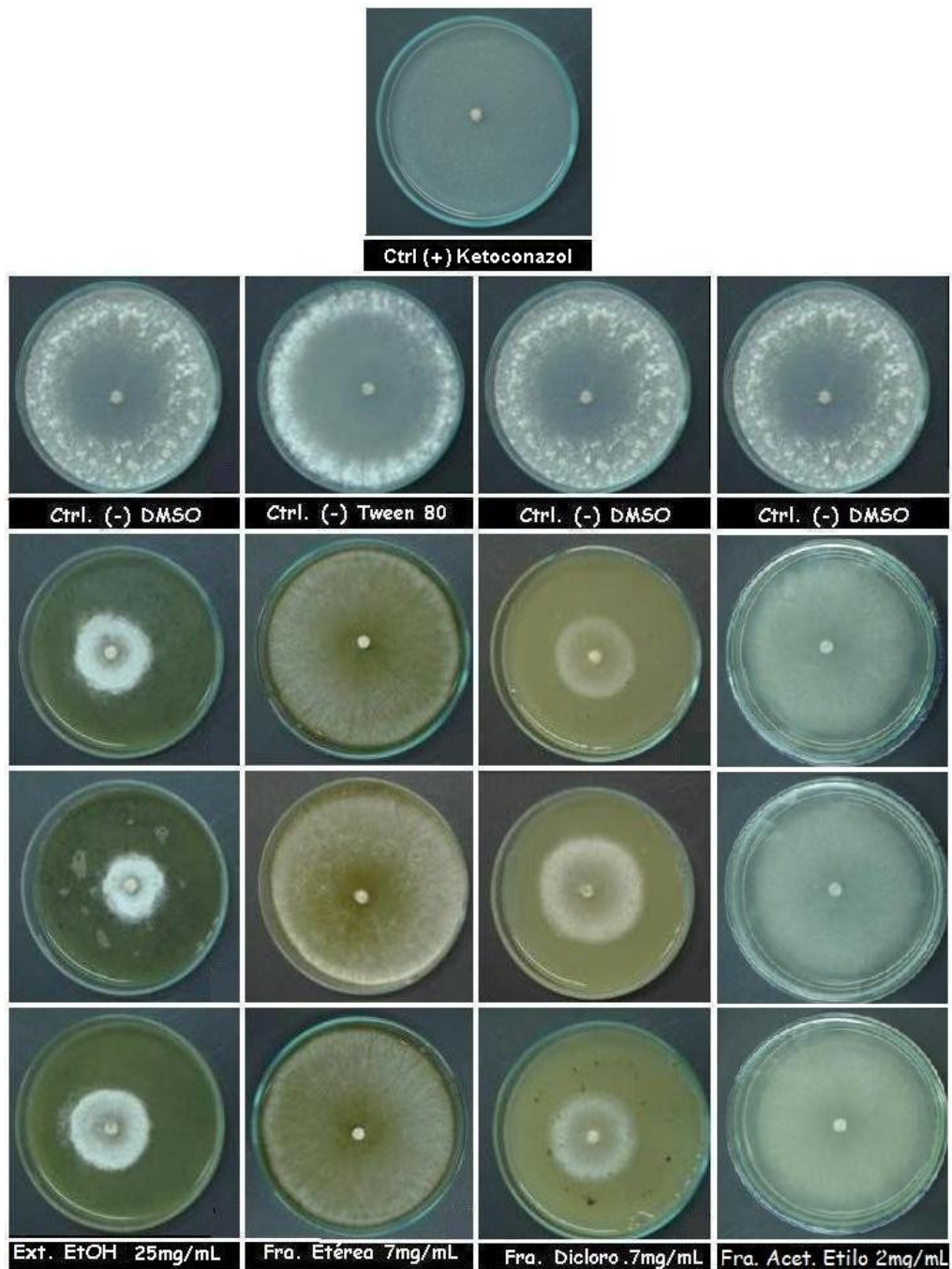
**Figura 6.4.** Porcentaje de inhibición para *S.sclerotiorum*

*S. sclerotiorum* mostró mayor susceptibilidad al extracto etanólico y a la fracción de diclorometano de la parte foliar de la planta de Neem, donde se obtuvo una inhibición del 78.02% y 88.35% respectivamente, los cuales redujeron significativamente el crecimiento micelial (Tabla 6.6 y gráfica 6.4). Como lo confirma Mello y colaboradores en el 2005 el aceite extraído de semillas de Neem presenta un efecto inhibitorio en el crecimiento de *S.sclerotiorum*, corroborándose en este caso con el follaje de la planta. Mientras que la fracción etérea y de acetato de etilo presentaron una inhibición del 1.1% y 13.37% respectivamente, con efecto bajo en balance con las fracciones anteriores; sin embargo la actividad fungicida de la fracción de acetato no es comparable con las demás por su baja concentración, para esto es necesario evaluar su efecto a una concentración igual a las demás fracciones.

Adicionalmente, la disminución de esclerocios, se realizó por inspección visual, comparando los controles con cada uno de los tratamientos (figura 6.5). Este aspecto es importante, si se considera que éstas son las estructuras de resistencia del hongo que le permiten sobrevivir bajo condiciones adversas (Silveria *et al.*,



2005). Adjunto a esto, a parte de la inhibición de crecimiento micelial, la disminución en la producción de esclerocios con el tratamiento de extractos foliares de Neem es similar a lo obtenido por Lakshmanan *et al.* (1990), Mello *et al.* (2005) y Alcalá *et al.* (2005) en estudios realizados con aceite de semillas de Neem. Esto permite afirmar que la viabilidad de *S. sclerotiorum* se ve disminuía tanto en crecimiento micelial, germinación y producción de esclerocios (figura 6.5).



**Figura 6.5.** Comportamiento de *S. sclerotiorum* en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.01mL/mL), Ext. EtOH (25mg/mL), Fra. Etérea (7mg/mL), Fra. Dicloro. (7mg/mL) y Fra. Acetato de Etilo (2mg/mL)

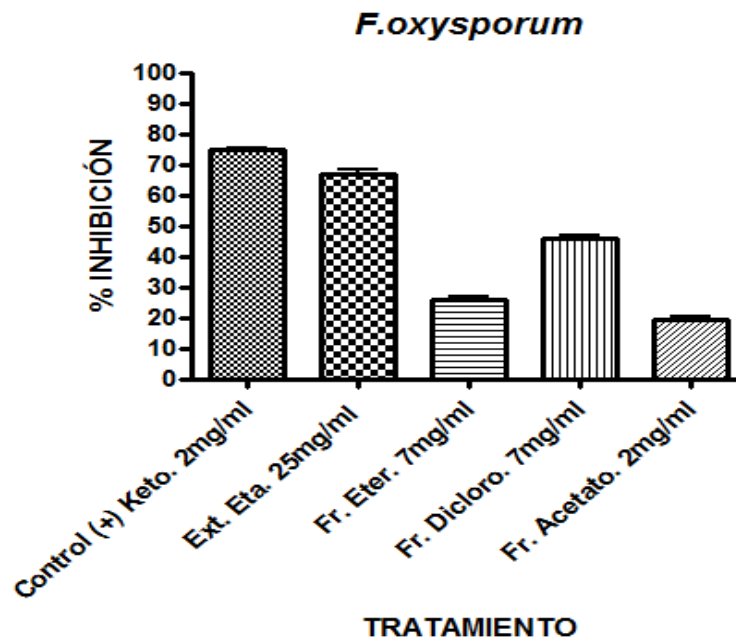
*S. sclerotiorum* en Agar PDA presentó un crecimiento rápido produciendo un micelio blanco abundante, desarrollando esclerocios en los controles negativos, con una

superficie ligeramente punteada, que a menudo exuda gotas de líquido en atmósferas saturadas, igual a lo reportado por Mello *et al.*, 2005. Mientras que en las fracciones, no se presentó desarrollo de esclerocios; incluso en las fracciones etérea y de acetato de etilo, que fueron las que no inhibieron en más de un 20% a *S.sclerotiorum* (Figura 6.5).

### 6.3.2.2. *Fusarium oxysporum*

**Tabla 6.7.** Parámetros de medición para *F.oxysporum*. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

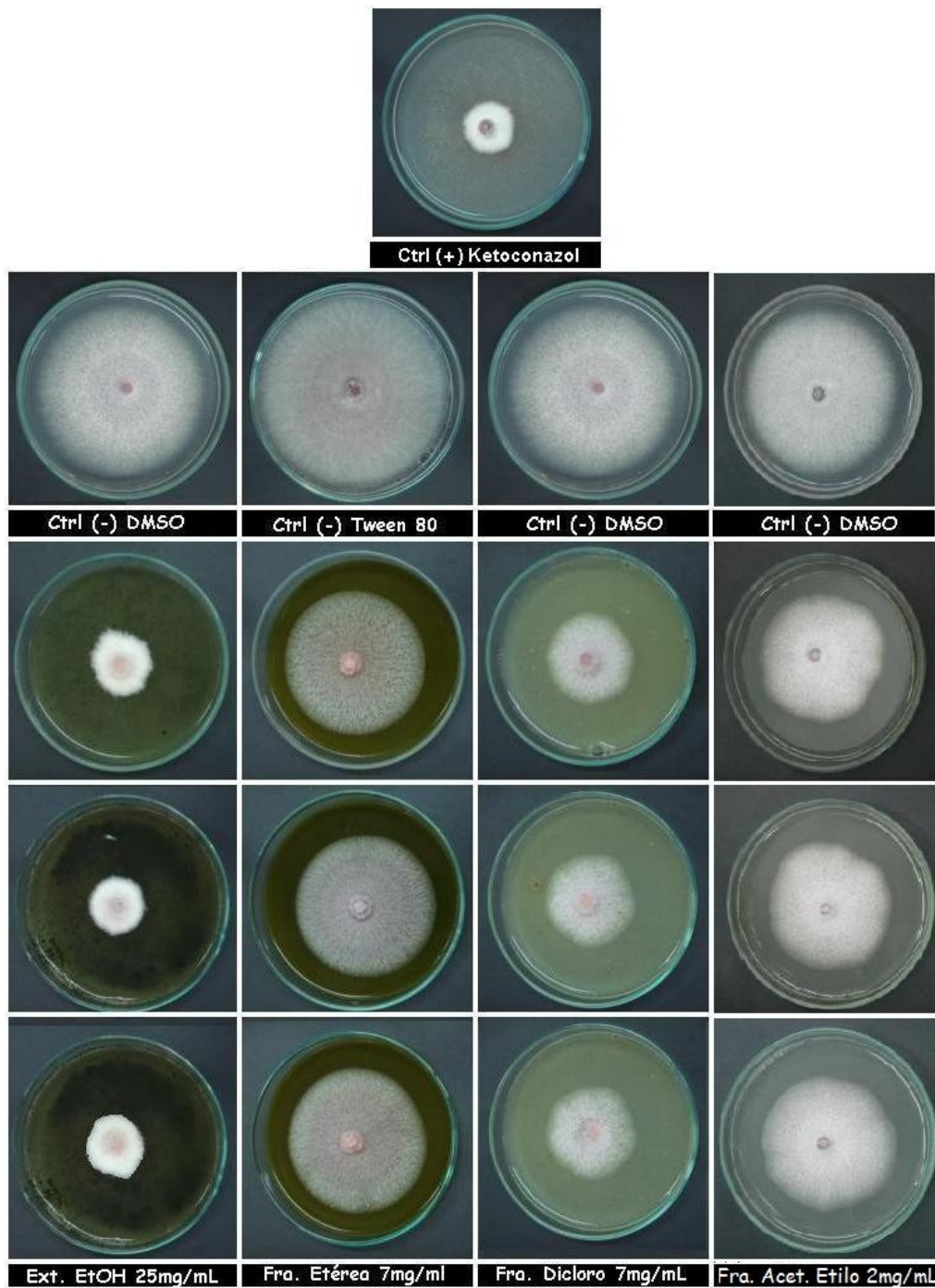
PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
<i>F.oxysporum</i>	CD	%C	%IN
Control (-) DMSO 1%	7.63	100	0
Control (-) Tween 80 1%	8.75	100	0
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	2.30	25.27	74.73
Ext. Etanólico 25 mg/mL	2.53	33.20	66.80
Fr. Etérea 7mg/mL	6.48	74.10	25.90
Fr. Diclorometano 7 mg/mL	4.15	54.39	45.61
Fr. Acetato de Etilo 2 mg/mL	6.15	80.60	19.40



**Figura 6.6.** Porcentaje de inhibición para *F.oxysporum*.

La aplicación *in vitro* del extracto etanólico y diclorometano, causó la inhibición de *F. oxysporum*, en un 66.80% y 45.61% respectivamente. Aunque la inhibición de la fracción etérea resultó en un 25.90%, también se aceptó su actividad antifúngica. En consideración con la fracción de acetato de etilo, a pesar de encontrarse en una concentración de 2mg/mL, casi alcanza el 20% de inhibición, llegando a inhibir en un 19.40% (Tabla 6.7 y Figura 6.6).

*F.oxysporum*, se consideró el hongo más susceptible de este estudio, al verse afectado su crecimiento por la mayoría de tratamientos ensayados. Zeringue y Bhatnagar en 1994, reportaron que la thionimona, un compuesto sulfurado aislado de semillas de Neem, presenta un alto porcentaje de inhibición sobre *F. oxysporum*, compuesto que posiblemente se encuentre en hojas. Otros autores como Govindachari y Masilamani, comprobaron en 1999 la actividad antifúngica del extracto de hexano de hojas de *A. indica* contra *F. oxysporum*, por diterpenos, triperpenos, polifenólicos y compuestos sulfurados.



**Figura 6.7.** Comportamiento de *F. oxysporum* en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.01mL/mL), Ext. EtOH (25mg/mL), Fra. Etérea (7mg/mL), Fra. Dicloro. (7mg/mL) y Fra. Acetato de Etilo (2mg/mL)

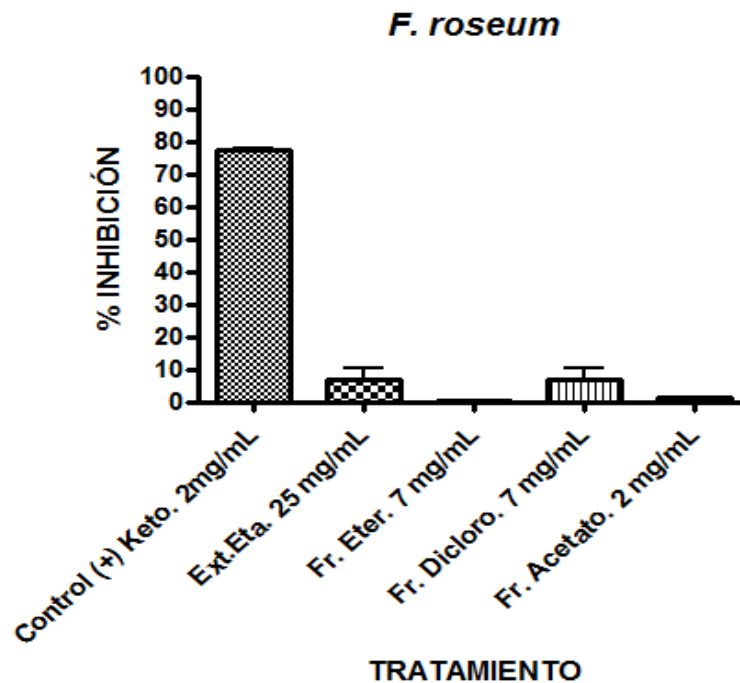
*F.oxysporum* en Agar PDA presentó un crecimiento lento, con micelio algodonoso, color rosáceo en el centro y blanco alrededor, características similares a las

reportadas por Agrios, 1998. El crecimiento de *F.oxysporum* en los tratamientos presentó las mismas características que en los controles negativos (Figura 6.7).

### 6.3.2.2. *Fusarium roseum*

**Tabla 6.8.** Parámetros de medición para *F.roseum*. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
<i>F.roseum</i>	CD	%C	%IN
Control (-) DMSO 1%	9.10	100	0
Control (-) Tween 80 1%	9.10	100	0
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	2.08	22.80	77.20
Ext. Etanólico 25 mg/mL	8.50	93.41	6.59
Fr. Etérea 7mg/mL	9.08	99.82	0.18
Fr. Diclorometano 7 mg/mL	8.47	93.04	6.96
Fr. Acetato de Etilo 2 mg/mL	9.00	98.90	1.10

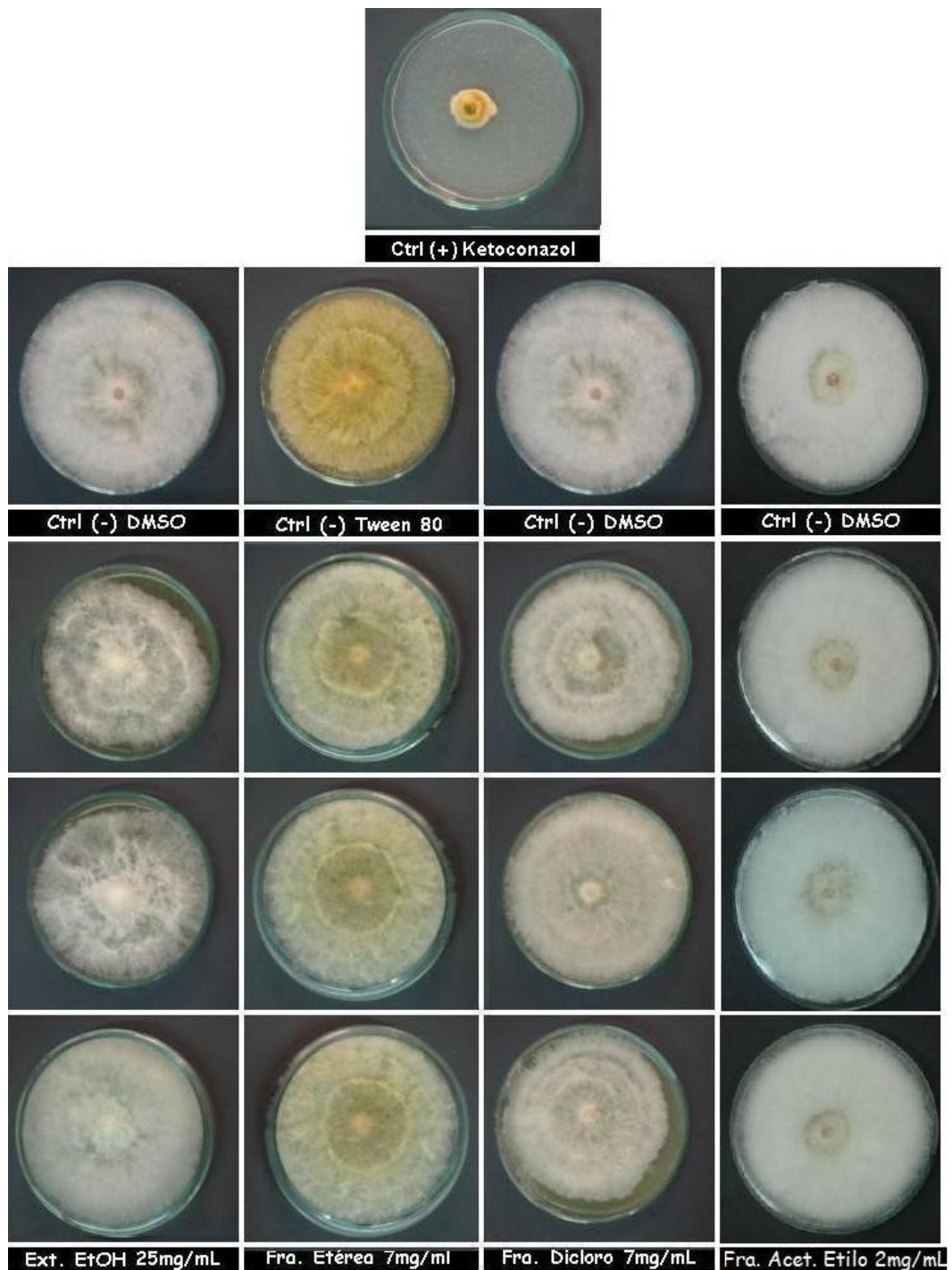


**Figura 6.8.** Porcentaje de inhibición para *F.roseum*

La tabla 6.8 y figura 6.8 resumen los resultados de porcentaje de inhibición de los tratamientos sobre *F. roseum*, donde se demuestra que ninguno de estos tuvo una acción fungicida sobre este hongo. El extracto etanólico presentó un 6.59%, la fracción etérea un 0.18%, la de diclorometano un 6.96% y la de acetato de etilo un 1.10% de inhibición, señalando a *F. roseum* como el hongo más resistente a los tratamientos evaluados.

Aunque el efecto de los tratamientos contra *F. roseum* no fueron activos en más de un 20%, se pudo evidenciar que el extracto etanólico y la fracción de diclorometano siguen demostrando ser las que presentan algún efecto inhibitorio como en los demás hongos evaluados.





**Figura 6.9.** Comportamiento de *F. roseum* en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.01mL/mL), Ext. EtOH (25mg/mL), Fra. Etérea (7mg/mL), Fra. Dicloro. (7mg/mL) y Fra. Acetato de Etilo (2mg/mL)



Concordante con lo reportado por Smith 2002, *F. roseum* en Agar PDA presentó un crecimiento rápido, con colonias vellosas, algodonosas, inicialmente blancas, luego se tornan en el centro rosanaranja intenso, con una zona marginal rosa pálido y bordes blancos. Reverso de color naranja. En todos los tratamientos menos en la fracción de acetato de etilo, se evidenció por inspección visual una disminución drástica del micelio aéreo, en lo que posiblemente los compuestos activos presentes en la parte foliar del Neem inhiben la producción de micelio aéreo de *F. roseum*, aunque no afectan en mayor parte su crecimiento (Figura 6.9).

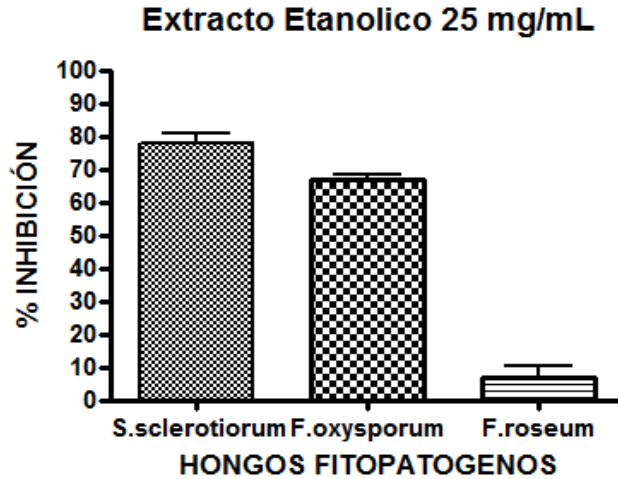
### 6.3.3 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN SEGÚN TRATAMIENTO

En 1994 Zeringuer y Bhatnagar reportaron el efecto antifúngico sobre el género *Aspergillus* y la inhibición de producción de aflatoxinas, de compuestos aislados de las hojas de *A. indica*, encontrando principalmente compuestos activos como alcoholes, hidrocarburos, cetonas, aldehídos y compuestos complejos como la azadiractina. En 2001 Zeringuer *et al.* concluyeron que los compuestos volátiles presentes en extractos acuosos de esta planta, son los encargados de esta actividad, demostrando que dentro de los compuestos presentes en las hojas de Neem, muchos son activos con acción antimicrobiana, lo que se confirmó en esta investigación sobre *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum* principalmente.

#### 6.3.3.1. Extracto Etanólico 25mg/mL

**Tabla 6.9.** Parámetros de medición de *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* y *F.roseum* para el Extracto Etanólico a una concentración de 25 mg/mL. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
Ext. Etanólico 25 mg/mL	CD	%C	%IN
<i>S. Sclerotiorum</i>	2.00	21.98	78.02
<i>F. oxysporum</i>	2.53	33.20	66.80
<i>F. roseum</i>	8.50	93.41	6.59



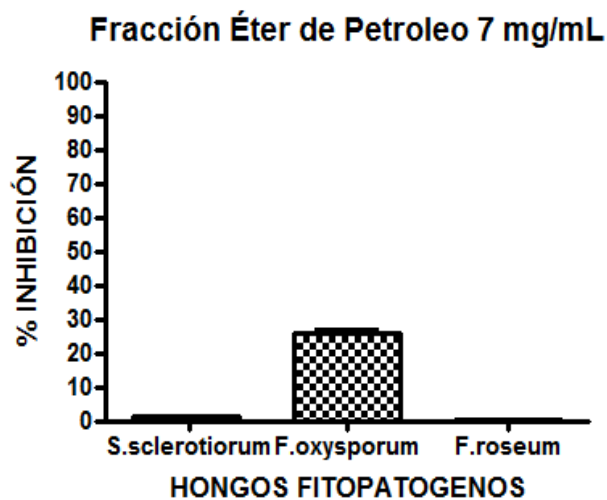
**Figura 6.10.** Porcentaje de inhibición del Extracto Etanólico para *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* y *F.roseum*

En la tabla 6.9 y figura 6.10. se resume la actividad del extracto etanólico a 25mg/mL, donde se presentó una inhibición del 78.02%, 66.80% y 6.59%, para *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *F. roseum* respectivamente. Este extracto demostró actividad antifúngica, posiblemente por la acción de varios de los compuestos presentes en las hojas y su efecto se puede deber al sinergismo de terpenoides y compuestos fenólicos, los cuales presentan acción sobre *S.sclerotiorum* y *F.oxysporum* a nivel de pared celular (Murphy, 1999).

### 6.3.3.2. Fracción Etérea 7mg/mL

**Tabla 6.10.** Parámetros de medición de *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* y *F.roseum* para la Fracción Éter de Petróleo a una concentración de 7 mg/mL. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
Fra. Etérea 7 mg/mL	CD	%C	%IN
<i>S. Sclerotiorum</i>	9.00	98.9	1.10
<i>F. oxysporum</i>	6.48	74.10	25.90
<i>F. roseum</i>	9.08	99.82	0.18



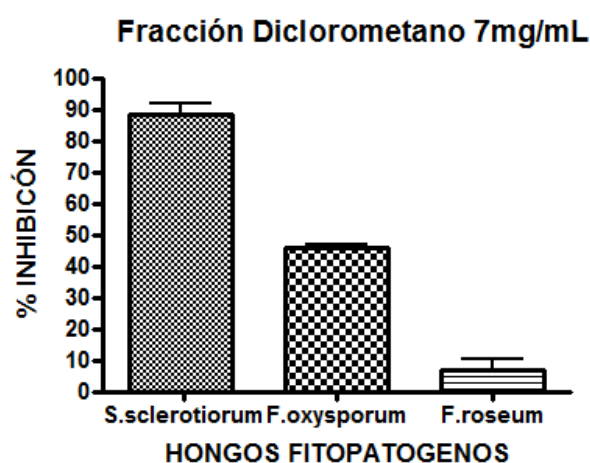
**Figura 6.11.** Porcentaje de inhibición de la Fracción Éter de Petróleo para *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *F. roseum*

La fracción etérea presentó los menores porcentajes de inhibición para los hongos evaluados, en comparación al extracto etanólico y a la fracción de diclorometano, porcentajes del 1.1%, 25.90% y 0.18% para *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *F. roseum* respectivamente (Tabla 6.10. y Figura 6.11.). Esto puede ser a que el éter de petróleo extrae los compuestos menos polares presentes en el extracto total. Locke *et al.* 1993, reportó que son los compuestos polares presentes en aceite de Neem como terpenos, los que tiene mayor actividad antifúngica, por lo tanto no es de esperarse estos compuestos en la fracción etérea; a esto se le atribuye que se presentara la menor actividad antifúngica, a pesar de encontrarse a igual concentración que la fracción de diclorometano.

### 6.3.3.3. Fracción Diclorometano 7mg/mL.

**Tabla 6.11.** Parámetros de medición de *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* y *F.roseum* para la Fracción Diclorometano a una concentración de 7 mg/mL. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
Fr. Diclorometano 7 mg/mL	CD	%C	%IN
<i>S. Sclerotiorum</i>	1.06	11.65	88.35
<i>F. oxysporum</i>	4.15	54.39	45.61
<i>F. roseum</i>	8.47	93.04	6.96



**Figura 6.12.** Porcentaje de inhibición de la Fracción Diclorometano para *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* y *F.roseum*

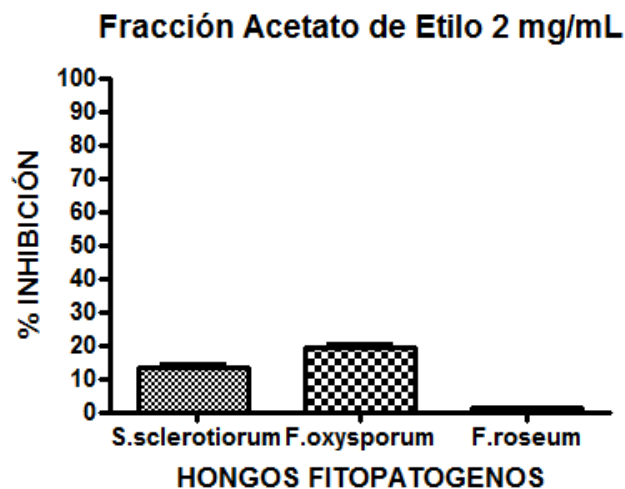
La fracción de diclorometano a 7mg/mL, presentó una inhibición del 88.35%, 45.61% y 6.96% para *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *F. roseum* respectivamente (Tabla 6.11. y Figura 6.12.), observándose un comportamiento de inhibición de crecimiento similar al del extracto etanólico a 25 mg/mL, aunque en mayor proporción y manejando una concentración menor respecto al extracto total. Esto puede ser debido al fraccionamiento seriado con diferentes solventes, donde el diclorometano extrajo los metabolitos según la polaridad, y estos presentaron mayor actividad antifúngica, aumentando así, la acción sinérgica de los mismos. Lo que puede decir que posiblemente el extracto etanólico, por ser una mezcla de múltiples

compuestos, muchos de estos se comporten como limitantes para esta acción y que a pesar que la fracción de diclorometano es una mezcla aun compleja, se disminuye la interferencia de estos compuestos; lo que ayuda a presentar una inhibición más directa sobre *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum*.

#### 6.3.3.4. Fracción Acetato de Etilo 2mg/mL

**Tabla 6.12.** Parámetros de medición de *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* y *F.roseum* para la Fracción Acetato de Etilo a una concentración de 2 mg/mL. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
Fr. Acetato de Etilo 2 mg/mL	CD	%C	%IN
<i>S. Sclerotiorum</i>	7.88	86.63	13.37
<i>F. oxysporum</i>	6.15	80.60	19.40
<i>F. roseum</i>	9.00	98.90	1.10



**Figura 6.13.** Porcentaje de inhibición de la Fracción Acetato de Etilo para *S.sclerotiorum*, *F.oxysporum* y *F. roseum*

La tabla 6.12. y la figura 6.13. muestran el comportamiento de la fracción de acetato de etilo contra los hongos fitopatógenos evaluados, con porcentajes de inhibición por debajo del 20%; esta fracción se encuentra limitada al ser la última en la serie de fraccionamientos, donde los solventes anteriores han arrastrado la mayor

cantidad de compuestos del extracto total. Esto es corroborado a partir del peso obtenido al final de los fraccionamientos, ya que para la fracción de acetato de etilo se obtuvo una cantidad menor a un gramo y por ello, se hizo necesario reducir la concentración utilizada en las pruebas en comparación a las fracciones de éter de petróleo y diclorometano. Por lo tanto, para hacer una comparación entre fracciones es necesario igualar la concentración a 7 mg/mL, ya que a una concentración de 2 mg/mL no es suficiente para obtener actividad antifúngica.

Para terminar la discusión de esta prueba antifúngica, a partir del extracto foliar de la planta *A. indica*, se pudo analizar que a pesar que muchos estudios se han realizado para evaluar la actividad biológica de metabolitos secundarios. El resultado de estos ha demostrado que la probabilidad de encontrar compuestos altamente activos muestra una baja frecuencia. Normalmente se estima una probabilidad de 0.01% (Mendoza *et al.*, 2007). De acuerdo con estas estimaciones, los resultados obtenidos en esta investigación demuestran una alta actividad antifúngica sobre los hongos fitopatógenos evaluados. Aunque las evaluaciones se realizaron con una parte muy específica de la planta, sobre un número pequeño de organismos con los cuales interactuó, la probabilidad de encontrar compuestos biológicamente activos fue alta.

Por otra parte, la variación de los resultados obtenidos en esta investigación dependieron principalmente del tipo de patógeno y sus posibles mecanismos de resistencia (Mello *et al.*, 2005) ante los agentes inhibitorios que pueda presentar esta planta, también la efectividad de los extractos vegetales ha sido explicada por la variabilidad de metabolitos secundarios presentes en cada una de las fracciones (Rodríguez y Sanabria, 2005), de aquí que los resultados obtenidos ante cada hongo fitopatógeno difieran tanto.

Así mismo se consideró que las concentraciones empleadas en la presente evaluación son altas en comparación con otros estudios realizados en diferentes plantas; sin embargo, las concentraciones en las que se presentó esta inhibición se consideraron óptimas al tener en cuenta que se trabajó con extractos crudos que contienen infinidad de compuestos incluyendo algunos metabolitos o impurezas que

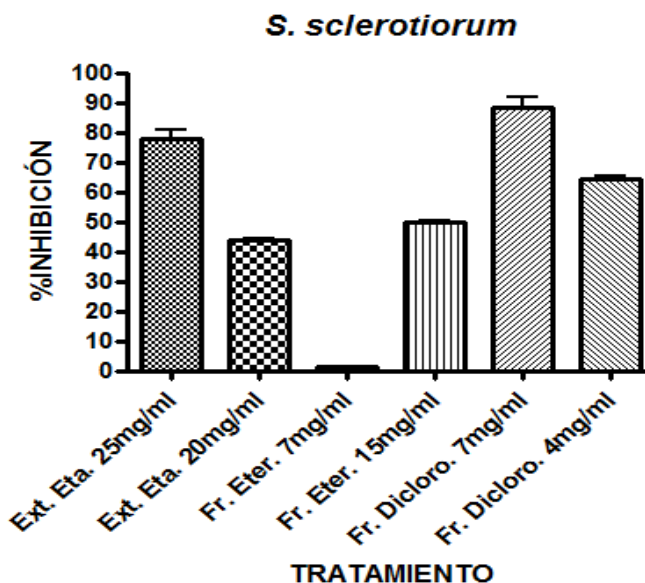
no presenten actividad fungicida; a diferencia de compuestos o fracciones más puras realizados en otros ensayos.

### 6.3.4 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN SEGUNDA PRUEBA

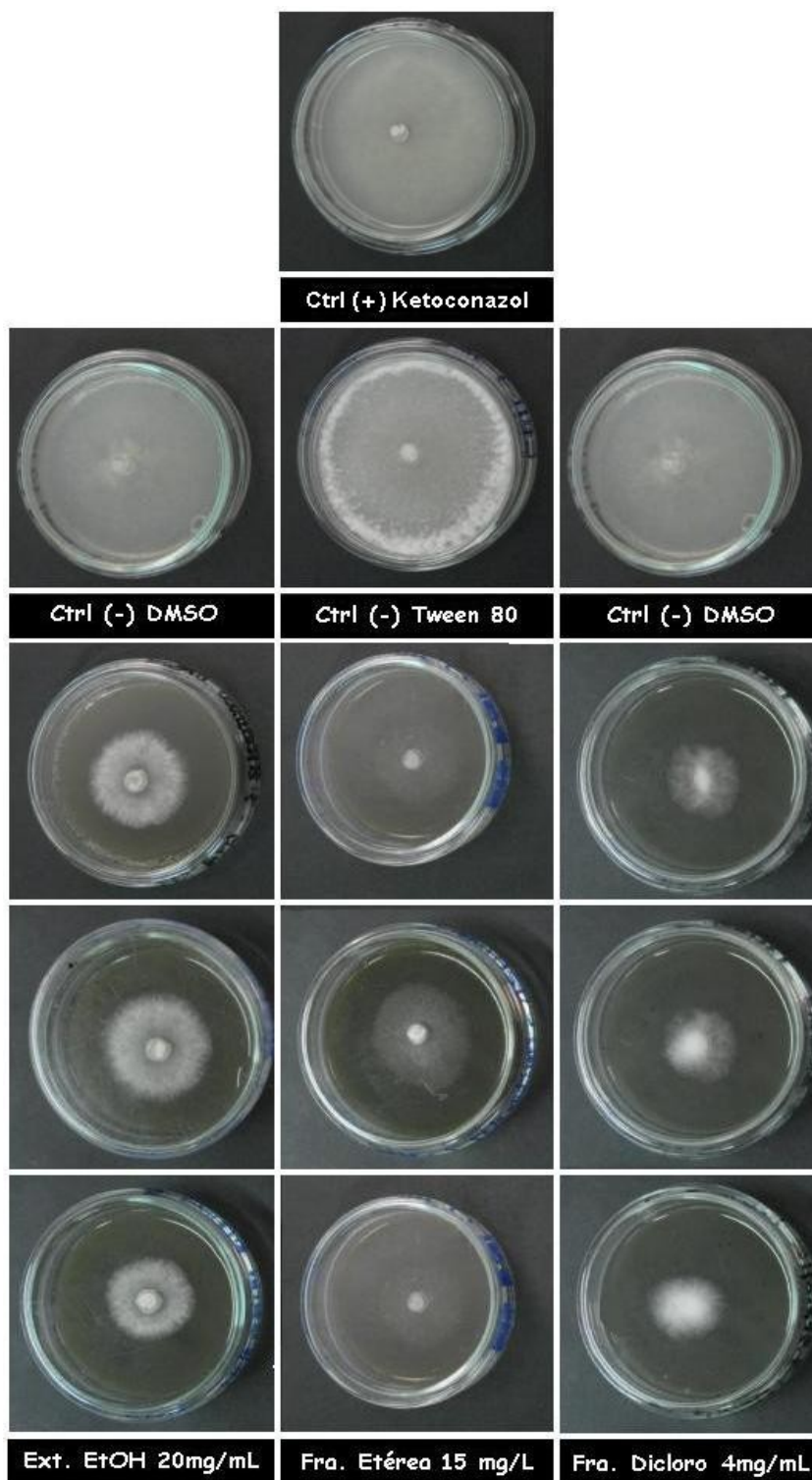
Esta segunda prueba se realizó con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el primer ensayo, cambiando las concentraciones; corroborando si a mayor o a menor concentración, la acción antifúngica *in vitro*, reflejada en el porcentaje de inhibición, fuera mayor o menor respectivamente.

**Tabla 6.13.** Parámetros de medición para *S.sclerotiorum*, segunda prueba a diferentes concentraciones. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
<i>S .sclerotiorum</i>	CD	%C	%IN
Control (-) DMSO 1%	5.00	100	0
Control (-) Tween 80 1%	5.00	100	0
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	0.50	10.00	90.00
Ext. Etanólico 20mg/mL	2.80	56.00	44.00
Fr. Etérea 15mg/mL	2.52	50.33	49.67
Fr. Diclorometano 4mg/mL	1.78	35.67	64.33



**Figura 6.14.** Comparación del Porcentaje de inhibición de *S.sclerotiorum* a dos concentraciones diferentes para cada tratamiento

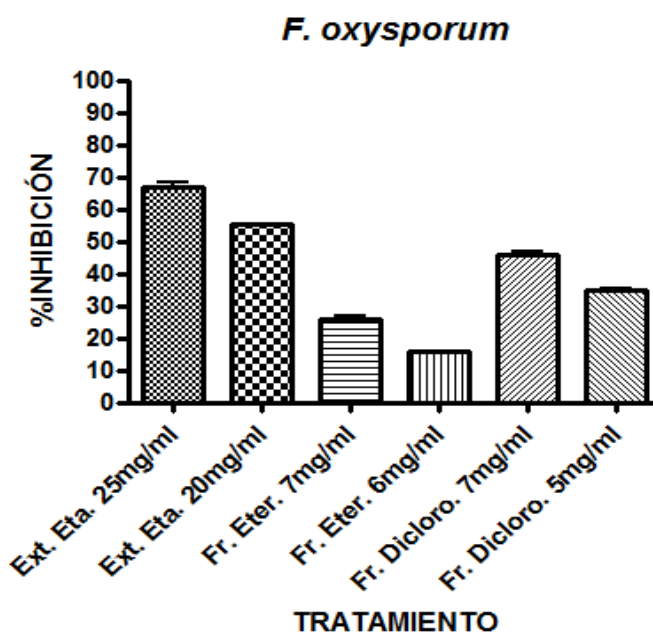




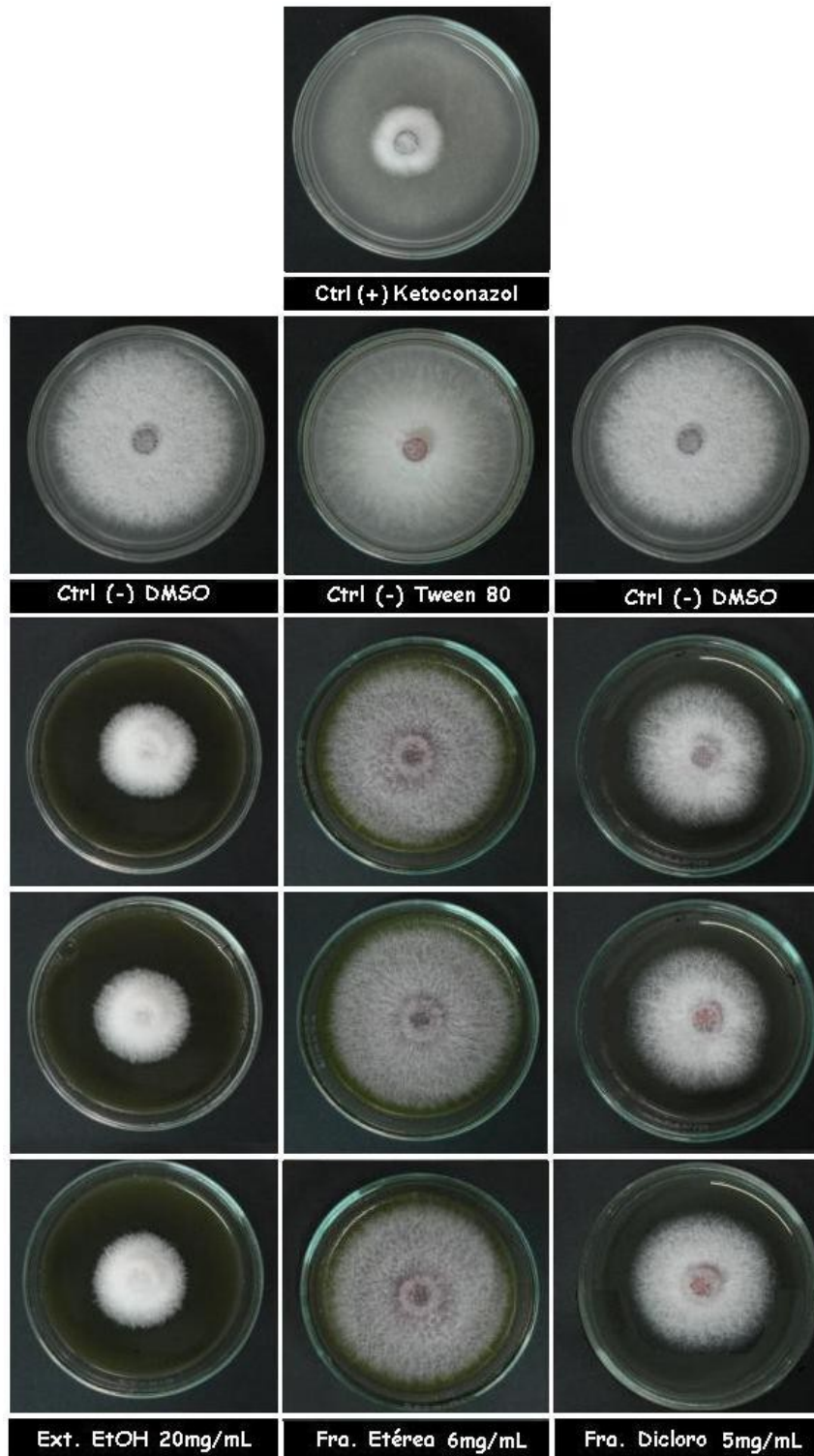
**Figura 6.15.** Comportamiento de *S.sclerotiorum* en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.01mL/mL), Ext. EtOH (20mg/mL), Fra. Etérea (15mg/mL), y Fra. Dicloro. (4mg/mL)

**Tabla 6.14.** Parámetros de medición para *F. oxysporum*, segunda prueba a diferentes concentraciones. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
<i>F. oxysporum</i>	CD	%C	%IN
Control (-) DMSO 1%	4.95	100	0
Control (-) Tween 80 1%	5.00	100	0
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	1.43	28.60	71.40
Ext. Etanólico 20mg/mL	2.22	44.78	55.22
Fr. Etérea 6mg/mL	4.22	84.33	15.67
Fr. Diclorometano 5mg/mL	3.23	65.32	34.68



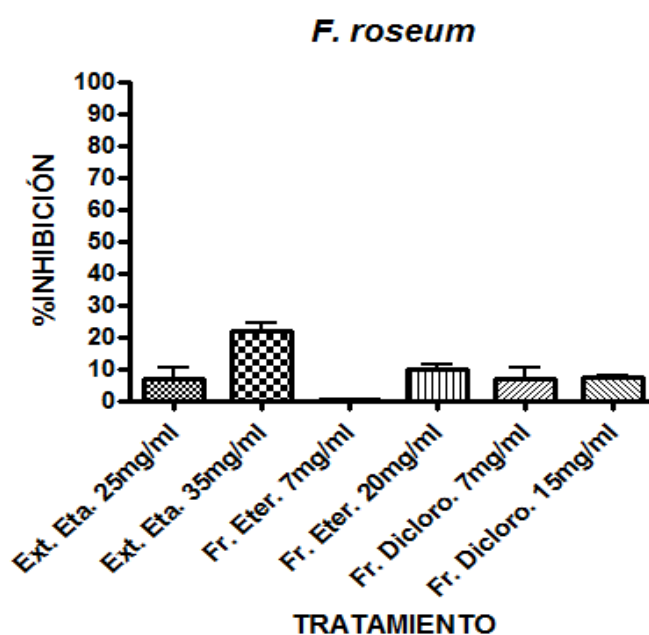
**Figura 6.16.** Comparación del Porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* a dos concentraciones diferentes para cada tratamiento



**Figura 6.17.** Comportamiento de *F.oxysporum* en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.01mL/mL), Ext. EtOH (20mg/mL), Fra. Etérea (6mg/mL), y Fra. Dicloro. (5mg/mL)

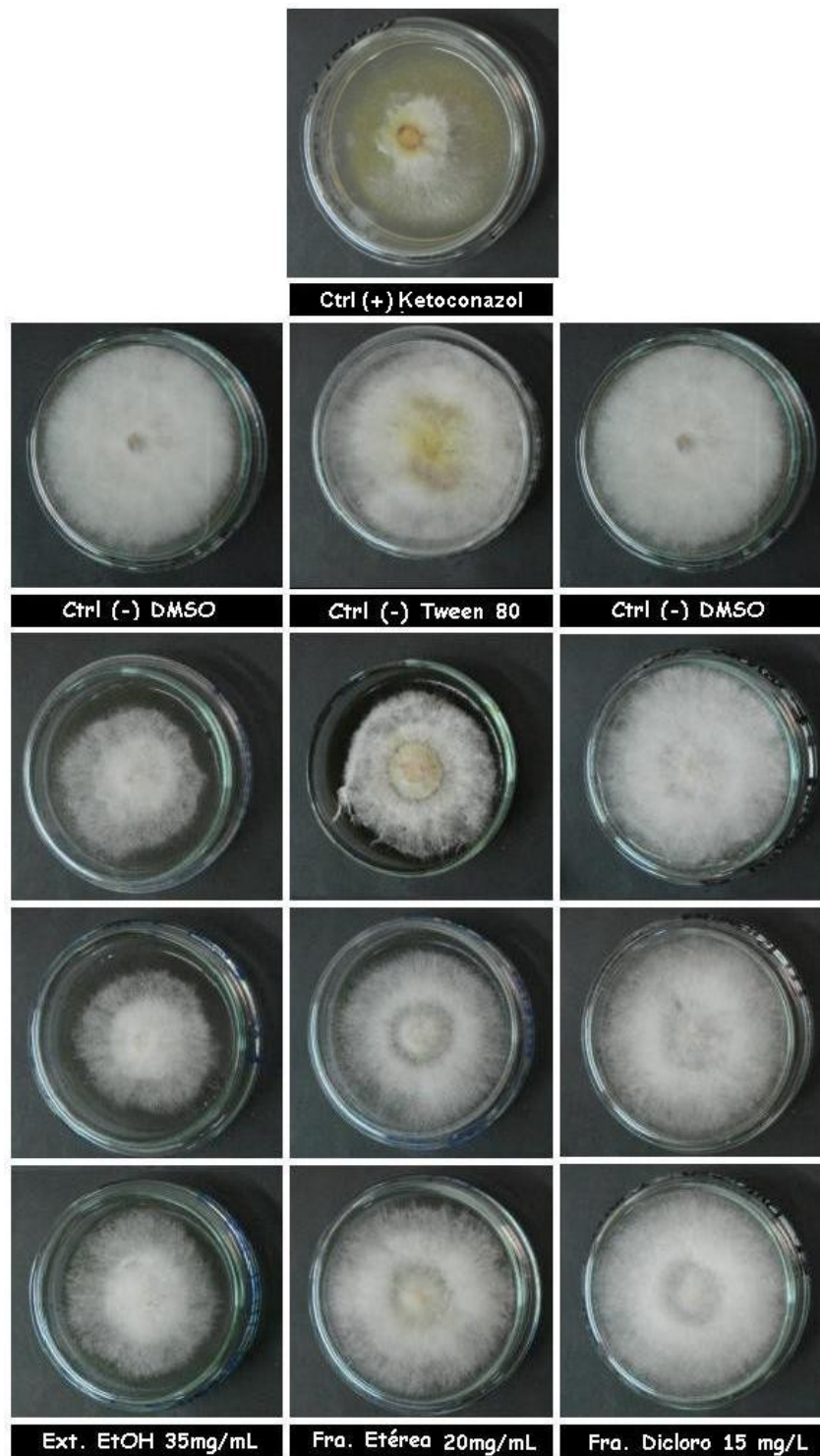
**Tabla 6.15.** Parámetros de medición para *F. roseum*, segunda prueba a diferentes concentraciones. (CD) Crecimiento Diametral, (%C) Porcentaje de Crecimiento, (%IN) Porcentaje de Inhibición.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN			
<i>F. roseum</i>	CD	%C	%IN
Control (-) DMSO 1%	5.00	100	0
Control (-) Tween 80 1%	5.00	100	0
Control (+) Ketoconazol 2mg/mL	1.90	38.00	62.00
Ext. Etanólico 35mg/mL	3.90	78.00	22.00
Fr. Etérea 20mg/mL	4.50	90.00	10.00
Fr. Diclorometano 15mg/mL	4.63	92.67	7.33



**Figura 6.18.** Comparación del Porcentaje de inhibición de *F. roseum* a dos concentraciones diferentes para cada tratamiento

Los resultados adoptados en la segunda prueba *in vitro* sobre *F. roseum*, al aumentar la concentración de 25mg/mL a 35mg/mL en el extracto etanólico, se logró obtener un porcentaje de inhibición de 22.0 (Tabla 6.15, Figura 6.18) alcanzando el mínimo permitido para considerarse activo. Esto hace que este ensayo, exija emplear mayor cantidad de fracciones y por ende más cantidad de material vegetal, para obtener alguna inhibición, disminuyendo el rendimiento de la extracción.



**Figura 6.19.** Comportamiento de *F. roseum* en Ketoconazol (2mg/mL), DMSO y Tween 80 (0.01mL/mL), Ext. EtOH (35mg/mL), Fra. Etérea (20mg/mL), y Fra. Dicloro. (15mg/mL)

En todos los tratamientos con cada uno de los hongos, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum*, resultó equivalente según la concentración; lo que le aporta mayor reproducibilidad a los resultados obtenidos en esta investigación.

Además de la inhibición micelial, la reducción en la germinación y en las estructuras de resistencia, diferente para cada hongo evaluado, se obtuvo el mismo resultado para esta prueba confirmatoria, como en lo obtenido en la primera prueba.

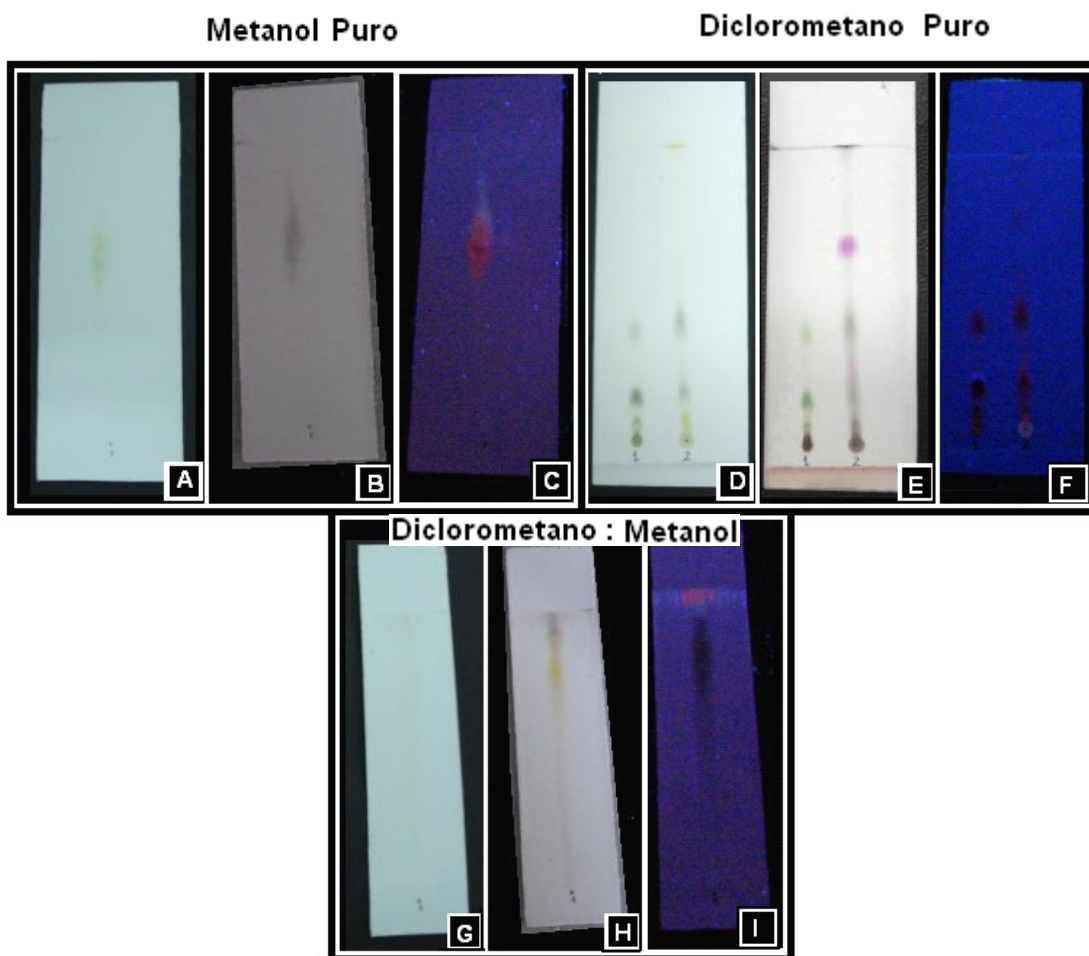
## 6.4 CROMATOGRAFÍAS

### 6.4.1 Cromatografía en capa delgada

La composición química del extracto etanólico al igual que de las fracciones posteriores, se elucidó por medio de una cromatografía en capa delgada (Kliner y Golab, 1975). Se utilizaron placas de sílica gel 60 F254 (Adesanya *et al.*, 1986). Usando como fase móvil diferentes combinaciones de solventes (tabla 6.16). Para revelar las cromatoplasas se utilizó luz ultravioleta (254nm y 366nm) y vainillina.

**Tabla 6.16.** Solventes y proporciones empleadas como fase móvil para el extracto y las fracciones.

TRATAMIENTO	FÁSE MÓVIL	PROPORCIÓN
Ext. Etanólico	Metanol	Puro
Fra. Éter de petróleo	Diclorometano	Puro
Fra. Diclorometano	Diclorometano	Puro
Fra. Acetato de etilo	Diclorometano: Metanol	9:1



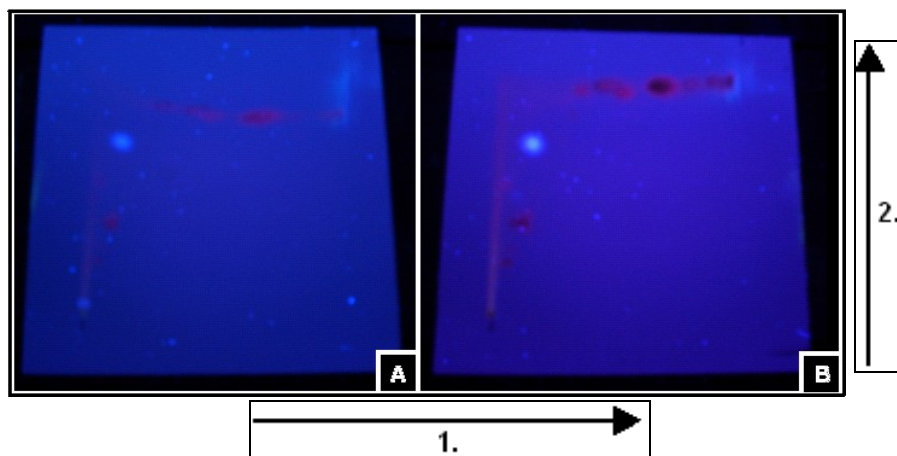
**Figura 6.20.** Cromatografías en capa delgada A) Ext. Etanólico. B) Ext. Etanólico revelado con vainillina. C) Ext. Etanólico bajo luz UV. D) Fra. Diclorometano y Éter de petróleo. E). Fra. Diclorometano y Éter de petróleo revelado con vainillina. F) Fra. Diclorometano y Éter de petróleo bajo luz UV. G) Fra. Acetato de Etilo H) Fra. Acetato de Etilo revelado con Vainillina I) Fra. Acetato de Etilo bajo luz UV

#### 6.4.2 Cromatografía Bidimensional

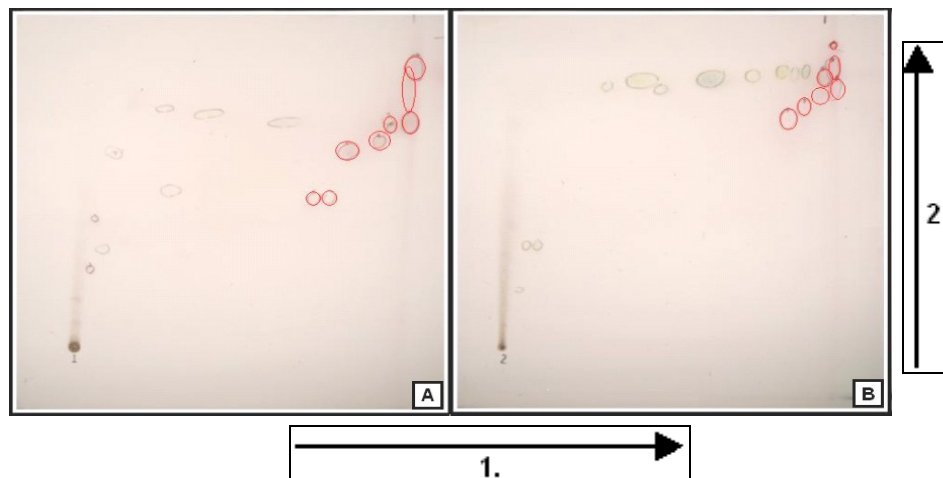
Las cromatografías bidimensionales para los extractos con mayor actividad antifúngica (Extracto Etanólico y Fracción de diclorometano) fueron reveladas con el reactivo de Liebermann–Burchard (Figura 6.21 y 6.22). Las manchas rojas reveladas pueden corresponder a la presencia de compuestos terpénicos. Desde 1977 Chaurasi *et al.*, reporto que alrededor del 60% de compuestos terpénicos derivados de aceites esenciales son biológicamente activos frente a hongos mientras que un 30% tiene acción antibacteriana (Murphy, 1999). El mecanismo de acción de los terpenos fue descrita por Mendoza *et al.*, (1997), los cuales causan



lisis celular por las ruptura de compuestos lipofílicos de la membrana de los organismos celulares (Murphy, 1999). Además estos compuestos atacan la membrana citoplasmática de los hongos destruyendo la capacidad selectiva y permitiendo el escape de componentes intracelulares según lo reportado por Biswas *et al.*, (2002) la nimbina, gedunina y azadiractina son terpenos aislados de la planta de Neem con acciones antifúngicas y antibacterianas, ensayos confirmados por Allan *et al* 1994; Kuruvilla *et al.* 1999; Veersham *et al.* 1999 y Raval *et al.*, 2003. Govindachari y Masilamani en 1999, reportaron la presencia de diterpenos, tripernos, polifenos y compuestos sulfurados en extractos foliares de hexano de Neem.



**Figura 6.21.** Cromatografía bidimensional bajo luz UV. A) Extracto Etanólico, B) Fracción Diclorometano. 1<sup>ra</sup> fase móvil Diclorometanometano : metanol 9.5:0.5. 2<sup>da</sup> fase móvil Éter de Petróleo : Acetato de Etilo 7:3



**Figura 6.22.** Cromatografía bidimensional 1<sup>ra</sup> fase móvil Diclorometanometano : metanol 9.5:0.5. 2<sup>da</sup> fase móvil Éter de Petróleo : Acetato de Etilo 7:3 revelada con Liebermann – Burchard, los círculos señalan manchas rojas, que corresponden a posibles terpenos o esteroides. A) Extracto Etanólico, B) Fracción Diclorometano

## 6.5. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los dos ensayos realizados, se analizaron estadísticamente con el programa SPSS versión Trial, mediante una tabla Anova con un 95% de confianza. Para esto fue necesario dividir en 27 grupos correspondientes a cada prueba, cada hongo fitopatógeno y cada tratamiento (Anexo 7), realizar pruebas de normalidad y comparativas entra grupos (Anexo 7 a Anexo 10).

**Tabla 6.16.** Tabla Anova para los tratamientos evaluados.

	Suma de Cuadrados	df	Media de Cuadrados	F	Sig.
Entre Grupos	68287.779	26	2626.453	322.320	.000
dentro Grupos	391.133	48	8.149		
Total	68678.911	74			

Con la tabla 6.16, se pudo concretar que existieron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre al menos dos de los tratamientos evaluados contra *S.sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *F. roseum*, en las dos pruebas realizadas a las concentraciones correspondientes. Para determinar cuál de los tratamientos tuvo un comportamiento similar a otro, se realizó una comparación múltiple entre tratamientos con un análisis Tukey (Anexo 10)



## 7. CONCLUSIONES

- El extracto foliar de la planta de Neem (*Azadirachta indica*) presentó actividad antifúngica *in vitro* contra *Sclerotinia sclerotiorum* a concentraciones de 25mg/mL del extracto Etanólico y a 7mg/mL de la fracción de Diclorometano con porcentajes de inhibición de 78.02 y 88.35 respectivamente.
- El extracto foliar de la planta de Neem (*Azadirachta indica*) mostró actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* con porcentajes de inhibición del 66.80, 25.90 y 45.61 para los tratamientos con Extracto Etanólico a 25mg/mL, fracción Éter de petróleo a 7mg/mL y fracción de Diclorometano a 7mg/mL
- La fracción de Éter de Petróleo mostro ser la menos efectiva para *S.sclerotiorum* y *F. roseum* ya que se obtuvieron porcentajes de inhibición de 1.1 y 0.18 a una concentración de 7mg/L
- El extracto etanólico y la fracción de diclorometano fueron los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de inhibición, debido a la posible presencia de compuestos terpénicos con acción fungicida como ha sido reportado en publicaciones anteriores, los cuales fueron detectados por cromatografía de capa delgada.
- *Fusarium roseum* fue el hongo fitopatógeno que presentó mayor resistencia a la acción del extracto y de las fracciones foliares del árbol *Azadirachta indica*.
- Los resultados de la presente investigación fueron reproducibles y los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) que se corroboraron a partir de la segunda prueba realizada a diferentes concentraciones.

## 8. RECOMENDACIONES

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada uno de los tratamientos evaluados.
- Aislar e identificar el metabolito o los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica obtenida.
- Realizar una prueba específica de recuento de esclerocios para *Sclerotinia sclerotiorum* y determinar así, el porcentaje de inhibición de estas estructuras ya que son mecanismos de resistencia y de mayor infección en las plantas.
- Realizar pruebas *in vivo* de cada uno de los tratamientos, empleando como control positivo un agente utilizado actualmente a nivel agroindustrial en lugar del ketoconazol.
- Realizar los ensayos biológicos de la fracción de acetato de etilo a una concentración igual a las demás fracciones.

## 9. REFERENCIAS

1. Adesanya, S., O’Nelly, M. y Roberts, M. 1986. *Structure-related Fungitoxicity of Isoflavonoids*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **29**: 95-103.
2. Agrios, G. 1998. *Fitopatología: Enfermedades de las Plantas ocasionadas por hongos*. Editorial Limusa. Pp 356-360.
3. Alexopolus, C. 1985. *Introducción a la Micología*. 289 - 579 - 580 Ediciones Omega, S.A; Barcelona. España.
4. Alcalá, D., Vargas, N. y Pire, A. 2005. *Efecto de Extractos Vegetales y Fungicidas Sintéticos sobre el Crecimiento Micelial in Vitro de Sclerotinia rofsii y Thielaviopsis basicota*. *Scielo*. **22** (4): 1 – 10.
5. Allan, E., Easwara, J., Mordue, A., Mogan, E. y Stuchbury. T. 1994. *The Production of Azadirachtin by in vitro Tissue Culture of Neem, Azadirachta indica*. *Pesti Sci*. **42**: 147-152.
6. Allen’s. 1924. *Comercial Organic Analysis*. Vol II, 5th Ed., The Blakiston Co. Ing. New York. p. 768.
7. Álvarez, M., Isaza, G. y Echeverry, H. 2005. *Efecto Antibacteriano in vitro de Austroeupatorium inulaefolium H.B.K (Salvia amarga) y Ludwingia polugonoides H.B.K. (Clavo de Laguna)*. *Biosalud*. **14**:46-55
8. Angulo, M., Gardea, A., Vélez, R., García, R., Carrillo, A., Cháidez C., Partida J. 2004. *Contenido de azadiractina A en semillas de Nim (Azadirachta indica A. Juss) colectadas en Sinaloa, México*. *Revista fitotécnica Mexicana*. **27** (004): 305-.311.
9. Arias, L.; Tautiva, L.; Piedrahíta, W., Chaves, B. 2007. *Evaluación de tres Métodos de Control del Moho Blanco (Sclerotinia sclerotium (Lib.) de Bary) en Lechuga (Lactuca sativa.)*. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. *Agronomia Colombiana* **25** (1). 131-141
10. Arshaas, M., Neaemul, S., Ahmad, I., Tabassum, R., Anbreen, B. 1996. *Toxic of neem Leaves Extract (NLX) Compared With malathion (57 E.C.) Against late 3rd Instar larvae of culex Fatigans (Wild Strain) By WHO Method*. *Tr. J. of Zoology*. **22** :(1998) 213-218
11. Ascolflores. 1995. *Simposio Internacional, “El Manejo integrado de Plagas y Enfermedades en Floricultura”*. Bogotá D.C. pp 5-18.
12. Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R., Bandyopadhyay, U. 2002. *Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (Azadirachta indica)*. *Current science*. **82** (11): 1336-1345.

13. Capataz, J., Orozco, F., Vergara, R., Hoyos, R. 2007. Efecto *Antialimentario* de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J.E Smith en condiciones de laboratorio. Revista Fac. Nal. Medellín. **60** (1): 3715 – 3715.
14. Carter, C., Hull, C., Luthra, N. y Walter, J. 1992. *Storage Stable Azadirachtin Formulation*. New York. United States Patent. US 5.124.349.
15. Celis, A., Mendoza, C., Pachón M., Cardona, J., Delgado, W. y Cuca, L. 2008. *Extractos Vegetales Utilizados como Biocontroladores con Énfasis en la Familia Piperaceae. Una Revisión*. Agronomía Colombiana. **26** (1): 97-106.
16. Chaurasia, S. y Vyas, K. 1977. *In vitro Effect of Some Volatile Oil Against Phytophthora parasítica var. piperina*. J. Res. Indian Med. Yoga Homeopath. 24-26.
17. Cowan, M. 1999. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clin. Microbiol. Rev. **10**:564-582
18. Cundom, M.; S. Mazza de Gaid; M. Mazzanti de Castañon y S. Gutiérrez. 2000. *Actividad antagónica in vitro de aislamientos de Trichoderma spp. sobre esclerocios de Sclerotinia sclerotiorum*. Universidad Nacional del Nordeste, Ciudad Argentina.
19. Damaria, S., Sridhar, S., Raman, K. y Chandrasekaran, M. 2004. *Storage Stable Pesticide Formulations Containing Azadirachtin*. Bangalore. India. United States Patent. US 6.811.780 B1
20. Domínguez, X. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Limusa, Mexico, p. 141.
21. Drenth, A.; Guest, D.I. 2004. *Principles of Phytophthora disease management. In Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Monograph, 114. Canberra, 154-160.
22. Flechas, H. 2002. *Actividad Antifúngica de raíces de Ageratina fastigiata (H.B.K) King & Robinson*. Pontificia Universidad Javeriana.
23. Flores, Y., Mujica, Y., y Rondón. 2006. *Evaluación in Vitro de Tres Controladores del Hongo Scelrotium Rolfsii*. Memoria de la Fundación la Salle de Ciencias Naturales. **166**:141-149
24. García, J. 2001. *Efecto del Dimetilsulfóxido en la Respuesta Quimioluminiscente y el Consumo de Oxígeno de Neutrófilos Humanos Activados*. Revista Costarricense de Ciencias Médicas. **22** (1-2): 17-32.

25. Gil, P. 2002. *Productos Naturales*. Universidad Pública de Navarra. España.
26. Gimeno, A. 2003. *Fusarimicotoxicosis Comparativa entre Pollos, Gallinas, Ceros, Vacas Lecheras y Conejos*. Laboratorio de Investigación Veterinaria. Lisboa Portugal.
27. Goswami, R. y Kistler, C. 2004. *Heading for Disaster: Fusarium graminearum on Cereal Crops*. *Molecular Plant Pathology*. **5** (6): 515-525.
28. Govindarachi, T., Suresh, G., Masilamani, S. 1999. *Antifungal Activity of Azadirachta indica leaf hexane extract*. *Centre for Agrochemical Research. SPIC Science Foundation*. **70** (4) : 417 – 420.
29. Govindachari, T., Suresh, G., Gopalakrishnan, G., Banumathy, B., Masilamani. 1998. *Identification of Antifungal from the Seed Oil of Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*. **26**:2.
30. Hagler, W., Mirocha, C., Pathre, S. y Behrens, J. 1979. Identification of the Natural Occurring Isomer of Zearalenol Produced by *Fusarium roseum* "Gibbosum" in Rice Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. **37** (5): 849-853.
31. Han, K., Park, J. y Choi, Y. 2001. *Stub Dieback of Carnation Caused by Fusarium graminearum*. *The Plant Pathology Journal*. **17** (2): 101-105.
32. Hernández, A., y Bautista, S. 2007. *Prospectiva de Extractos Vegetales para Controlar Enfermedades Postcosecha Hortofrutícola*. *Revista Fitotecnica Mexicana*. **30** (002): 119-123.
33. Hernández L. y Rodríguez, M. 2001. *Actividad Antimicrobiana de Plantas que crecen en Cuba*. *Revista Cubana Plant Med.* (2): 44-47.
34. Hirose, E., Neves, P., Zequi, J., Martins, L., Peralta, C. y Moino, A. 2001. *Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. And Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok*. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*. **44** (4): 419-423.
35. Johnson, S., Morgan, E., Peiris, C. 1996. *Development of the Major Triterpenoids and Oil in the Fruit and Seeds of Neem (Azadirachta indica)*. *Annals of Botany*. **78**: 383-388.
36. Kamande, G. Baah, J., Cheng, J., McAllister, T. y Shelford, J. 2000. *Effects of Tween 60 and Tween 80 on Protease Activity, Thiol Group Reactivity, Protein Adsorption, and Cellulose Degradation by Rumen Microbial Enzymes*. *Journal of Dairy Science*. **83** (3): 536-542.

37. Kliner, R., Golab, T. 1975. *Simple techniques in developing thin – layer bioautographs*.
38. Kotsonis, F., Smalley, E., Ellison, R. y Gale, C. 1975. *Feed Refusal Factors in Pure Cultures of Fusarium roseum “graminearum”*. Applied and Environmental Microbiology. **30** (3): 362-368.
39. Kuruvilla, T., Komaraiah, P. y Ramakrishna, S. 1999. *Enhanced Secretion of Azadirachtin by Permeabilized Margosa (Azadirachta indica) cells*. Indian Journal. Exp. Biol. **37**: 89-91.
40. Lakshmanan, P., Mohan, S., Jeyarajan, R. 1990. *Antifungal properties of some plant extracts against Thanatephorus cucumeris, the causal agent of collar rot disease of Phaseolus aureus*. Madras Agricultural Journal. **77**:1-4
41. Landa, B., Navas, J., Hervás, A. y Jiménez R. 2001. *Influence of Temperature and Inoculum Density of Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris on Suppression of Fusarium Wilt of Chickpea by Rhizosphere Bacteria*. Biological Control. Phytopathology. **91** (8): 807-816.
42. Llanos, L. 2000. *Fusariosis Gibberella zea (anamorfa Fusarium graminearum)*. Junin Buenos Aires Argentina.
43. Locke, J., Sring, S., Walter, J. y Larew, H. 1994. *Hydrophobic Extracted Neem Oil-A Novel Fungicide Use*. New York. United States Patent. (5.368.856).
44. Locke, J., Walter, J., y Larew, H. 1993. *Fungicide Compositions Derived from Neem Oil and Neem Wax Fractions*. United States Patent. (94,287).
45. Marcano, D., Vargas, N. y Pire, A. 2005. *Efecto de Extractos Vegetales y Fungicidas Sintéticos Sobre el Crecimiento Micelial in vitro de Sclerotium rolfsii y Thielaviopsis basicota*. Revista de la facultad de Agronomía. **22** (4): 315-324.
46. Márquez, L., De la Rosa, C., Mercado, A. 2007. *Actividad antifúngica del extracto en etanol de las hojas frescas de Pedalanthus tithymaloides L Poit (ULTIMORRAL)*. Scientia et Técnica. **13** (33): 155 – 159.
47. Mello, A., Afonseca, S. y Amorim, L. 2005. *Alternative Products in the “in vitro” Inhibition of Sclerotinia sclerotiorum*. Sci. Agric. **62** (2): 179 – 183.
48. Mendoza, C., Moreno, M. y Elango, W. 2007. *Evaluación del Efecto de Extractos Vegetales sobre el Crecimiento in vitro de Phytophthora palmivora Bult. y Collectotrichum gloeosporioides (Penz.)*. Tierra Tropical. **3** (1): 81 – 89.

49. Mónaco, C., Rollán, M. y Nico, A. 1998. *Efecto de Micoparásitos la capacidad reproductiva de Sclerotinia sclerotiorum*. Rev. Iberoam Micol. **15**:81-84
50. Moros, A., Fontalvo, J., Niño, L., Sánchez, J., Delgado, A., Villalobos, R. y Montiel, M. 2003. *Crecimiento de Macrophomina phaseolina y Fusarium oxysporum en Medios de Cultivo de Harina de Semillas de Frijol Vigna unguiculata (L.) Walp., frijol chino Vigna radiata L. y quinchoncho Cajanus cajan (L.) Millsp.* Ciencia. **11** (1): 14-21.
51. Mueller, D., Dorrance, A., Derksen R., Ozkan, E., Kurle, J., Grau, C., Gaska, J., Hartman, G., Bradley, C. y Pedersen, W. 2002. *Efficacy of Fungicides on Sclerotinia sclerotiorum and Their Potencial for Control of Sclerotinia Stem Rot on Soybean*. Plant Disease. **86** (1): 26-31.
52. Muñoz, S. 2001. *El aceite de neem Azadirachata indica A. Juss, y su relación con el control de la roya de la hoja de trigo Var. Baviacora*. Instituto Tecnológico Agropecuario.
53. Murphy, M. 1999. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clinical Microbiology Reviews. **12** (4): 564 – 582.
54. Nelson, P., Dignani., M. y Anaissie, E. 1994. *Taxonomy, Biología, and Clinical Aspects of Fusarium Species*. Clinical Microbiology Reviews. **7** (4): 479-504.
55. Pedrozo, J. 1999. *Introducción al Estudio de los Productos Naturales*. Cuadernillo N° 3 Metodos de Uso Común en Fitoquímica. GIFUJ.
56. Parrotta, J., Chaturvedi, A. 1995. *Azadirachta indica A. Juss. Margosa, neem Meliaceae Familia de la caoba*. 65-72.
57. Pennypacker, B. y Risius, M. 1999. *Environmental Sensity of Soybean Cultivars response to Sclerotinia sclerotium*. Phytopatology. **89**:618-622
58. Pereira, R. 1995. *Estudio químico de Espeletopsis Pleiochasia Cuatr y Actividad antifúngica de sus extractos*. Pontificia Universidad Javeriana.
59. Purdy, L. 1999. *Sclerotinia sclerotiorum: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact*. Phytopathology. **69** (8): 875-880.
60. Ramos, C., González, V., Soto, M., Engleman, E., Rodríguez, D. 2004. *Variación en contenido de azadiractina en frutos de Margosa durante su desarrollo*. Revista Fitotecnica Mexicana. **27** (1): 81-85.

61. Ramos, R. 2002. *Aceite de Neem un Insecticida Ecologico Para la Agricultura*. <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/Neem/neem01.htm>
62. Raval, K., Hellwing, S., Prakash, G., Ramos, A., Srivastava, A. y Buchs, J. 2003. *Necessity of a Two – Stage Process for the Productions of Azadirachtin – Related Limonoids in Suspension Cultures of Azadirachta indica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **96** (1): 16-22.
63. Reichard, S., Sulc, R., Rhodes, L. y Loux, M. 1997. *Effects of Herbicides on Sclerotinia Crown and Stem Rot of Alfalfa*. *Plant Disease*. **81** (7): 787-790.
64. Roland, M. y Blouin, J. 1995. *Co-Extraction of Azadirachta and Neem Oil*. New York. United States Patent. (5.397.571).
65. Robles, J. 1992. *Terpenoides y Flavonoides de Ageratina Fastigiata (H.B.K) King & Robinson (Compositae – Asteraceae) y su actividad Antimicrobiana*. Pontificia Universidad Javeriana.
66. Ruiz, L., Troncoso, R., Sánchez, A., Aguilar, V., Guerrero, C. y Garza, S. *Tratamiento Postcosecha Contra Fusarium roseum en Melon Reticulado (Cucumis melo L.)*. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha* 6(2):110-116
67. Salazar, E., Pariacote. 2004 *Control parasitario en caprinos usando extracto acuoso de semillas de Nim (Azadirachta indica A Juss)*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, (INIA). Estación Falcón, Venezuela. **12** (1) 82 - 85.
68. Sanabria, A. 1983. *Análisis Fitoquímico Preliminar*. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
69. SaiRam, M., Ilavazhagan, G., Sharma, S., Dhanraj, S., Suresh, B., Parida, M., Jana, A., Devendra, K. y Selvamurthy. 2000. *Antimicrobial Activity of a New Vaginal Contraceptive NIM-76 from Neem Oil (Adirachta indica)*. *Journal of Ethnopharmacology*. **71**: 377-382.
70. Sarasola, A. 1975. *Fitopatología. Hemisferio Sur*. Buenos Aires (Argentina) **1** : 346
71. Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. 2003. *La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. **21** (003): 355 – 363.
72. Smith, I. 2002. *Manual de Enfermedades de las Plantas*. Ediciones Mundiprensa. Madrid. España.



73. Summerell, B., Salleh, B. y Lesle, J. 2003. *A Utilitarian Approach to Fusarium Identification*. The American Phytopathological Society Plant Disease. **87** (2): 117-128.
74. Sun, P. Y Yang, X. 2000. *Light, Temperature, and Moisture Effects on Apothecium Production of Sclerotinia sclerotiorum*. The American Phytopathological Society. Plant Disease. **84**: 1287-1293.
75. Stahl, E. 1969. *Thin – Layer Chromatography*. 2nd. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, N.Y., p. 1969.
76. Tillman, R. y Bean, G. 1970. *Tentative identification and influence of sterols and dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth and survival of Fusarium roseum*. Mycologia (N.Y.) **62**: 428-436
77. Torrenegra, R. 1983. *Introducción al Análisis Moderno*. Pontificia Universidad Javeriana. Santafé de Bogotá.
78. Torrenegra, R., Pedrozo, J. 1993. *Palmitolactona de Ageratina viscosa*. Phytochemistry. **3**: 342.
79. Veershman, C., Kumar, M., Sowjanya, D., Kokate, c. y Apte, S. 1999. *Production of Azadirachtin from Callus Cultures of Azadirachta indica*. Fitoterapia. **69**: 423-424.
80. Verma, V., Gond, S., Kumar, A., Kharwar, R., Strbel, G. 2007. *The Endophytic Mycoflora of Bark, Laefand Stem Tissues of Azadirachta indica A. Juss (Neem) from Varanasi (India)*. Microbial Ecology Springer science. **54**: 119-125.
81. Wafaa, A.; Hassan, A., Nefisa, M. 2007. *Biological and Anti-microbial Activities of Aqueous Extracts from Neem Tree (Azadirachata indica A. Juss., Meliaceae)*. Jorunal of Applied Sciences Research. **3** (10): 1050-1055
82. Wall, M., Williams, J., Correll, B., Schubert, G. y Gentry, H. 1954. Steroidal Sapogenins Survey of Plants for Steroidal Sapogenins and other Constituentst. Jour. Amer. Pharm. Ass., Sci. 48:503-505
83. Williams, D. Pant, C. 2007. *Extraction method*. United States Patent. US 7.179.927 B2.
84. Zeringue, H., y Bhatnagar, D. 1994. *Effects of Neem Leaf Volatiles on Submerged Cultures of Aflatoxigenic Aspergillus parasiticus*. Applied and Enviromental Microbiology. **60** (10): 3543 – 3547.
85. Zeringue, H., Shih, B., y Bhatnagar, D. 2001. *Effects of Clarified Neem Oil on Growth and Aflatoxin B1 Formation in Submerged and Plate Cultures of Aflatoxigenic Aspergillus spp.* Phytoparasitica. **29** (4): 1- 6.

## **Direcciones Electrónicas**

1. AUPEC. FIGUEROA, Adalberto, Ciencia al Día, 1997, consulta en línea.  
<<http://aupec.univalle.edu.co/informes/mayo97/boletin37/neem.html>>  
[Consulta: 03 de Marzo de 2008]
2. Hersil S.A. 2002. Prospecto propuesto: ketoconazol.  
<<http://www.hersil.com.pe/Cont2/insertos/Ketoconazol.pdf>> [Consulta: 19 de  
Febrero de 2008]



## ANEXOS

### ANEXO 1.

Resultados mediciones Primera Prueba, bioensayos *in vitro* contra *Sclerotinia sclerotiorum* durante 6 días de evaluación. (DMSO) Dimetilsulfóxido, (PROM.) Promedio, (D.E) Desviación Estándar, (%) Porcentaje, (N.A.) No Aplica, (Control +) Control Positivo, (Control -) Control Negativo.

#### ***Sclerotinia sclerotium***

Control (-) DMSO 1%						
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio
1	1,7	1,7	1,7	9,1	9,1	9,1
2	2,8	2,8	2,8	9,1	9,1	9,1
<b>PROM.</b>		<b>2,25</b>		<b>PROM.</b>		<b>9,1</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,64</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>

Control (-) Tween 80 1%									
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio
1	0,6	0,6	0,6	6,5	6,5	6,5	9,1	9,1	9,1
2	0,6	0,6	0,6	6,7	6,6	6,65	9,1	9,1	9,1
<b>PROM.</b>		<b>0,6</b>		<b>PROM.</b>		<b>6,58</b>	<b>PROM.</b>		<b>9,1</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,10</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>

Control (+) Ketoconazol 2mg/ml											
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	6,59	93,41
2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	6,59	93,41
<b>PROM.</b>		<b>0,6</b>		<b>PROM.</b>		<b>0,6</b>	<b>PROM.</b>		<b>0,6</b>	<b>6,59</b>	<b>93,41</b>

D.E.	0,00	D.E.	0,00	D.E.	0,00	N.A.	N.A.
------	------	------	------	------	------	------	------

Extracto Etanólico 25mg/ml								
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,6	0,6	0,6	2,3	2,4	2,35	25,82	74,18
2	0,6	0,6	0,6	1,2	1,8	1,5	16,48	83,52
3	0,6	0,6	0,6	2,2	2,1	2,15	23,63	76,37
<b>PROM.</b>	<b>0,6</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,0</b>		<b>2,0</b>	<b>21,98</b>	<b>78,02</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,44</b>			N.A.	N.A.

Fracción Etérea 7mg/ml											
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,6	0,6	0,6	5	4,9	4,95	9	9	9	98,90	1,10
2	0,6	0,6	0,6	4,5	4,5	4,5	9	9	9	98,90	1,10
3	0,6	0,6	0,6	5,5	5,5	5,5	9	9	9	98,90	1,10
<b>PROM.</b>	<b>0,6</b>		<b>PROM.</b>	<b>5,0</b>		<b>5,0</b>	<b>PROM.</b>		<b>9,0</b>	<b>98,90</b>	<b>1,10</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,45</b>			<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>	N.A.	N.A.

Fracción Diclorometano 7mg/ml								
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	6,59	93,41
2	0,6	0,6	0,6	1,8	1,7	1,7	18,68	81,32
3	0,6	0,6	0,6	0,9	0,9	0,9	9,89	90,11
<b>PROM.</b>	<b>0,6</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,06</b>		<b>1,06</b>	<b>11,65</b>	<b>88,35</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,53</b>			N.A.	N.A.

Fracción Acetato de Etilo 2mg/ml								
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	1,7	1,8	1,75	7,8	8	7,9	86,81	13,19

2	1,6	1,6	1,6	7,8	7,7	7,75	85,16	14,84
3	1,6	1,6	1,6	8	8	8	87,91	12,09
<b>PROM.</b>		<b>1,65</b>		<b>PROM.</b>		<b>7,88</b>	<b>86,63</b>	<b>13,37</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,13</b>	N.A.	N.A.

## ANEXO 2.

Resultados mediciones Primera Prueba, bioensayos *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* durante 10 días de evaluación.

(DMSO) Dimetilsulfóxido, (PROM.) Promedio, (D.E) Desviación Estándar, (%) Porcentaje, (N.A.) No Aplica, (Control +) Control Positivo, (Control -) Control Negativo.

### *Fusarium oxysporum*

<b>Control (-) DMSO 1%</b>															
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>Día 8</b>		Promedio	<b>Día 10</b>		Promedio
1	1,1	1,1	1,1	2,4	2,3	2,35	3,6	3,7	3,65	5,5	5,5	5,5	7,8	7,8	7,8
2	1	1,1	1,05	2,4	2,3	2,35	3,5	3,6	3,55	5	5	5	7,4	7,5	7,45
<b>PROM.</b>		<b>1,08</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,35</b>	<b>PROM.</b>		<b>3,60</b>	<b>PROM.</b>		<b>5,25</b>	<b>PROM.</b>		<b>7,63</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,06</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,29</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,21</b>

<b>Control (-) Tween 80 1%</b>															
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>Día 8</b>		Promedio	<b>Día 10</b>		Promedio
1	1,1	1,1	1,1	2,7	2,8	2,75	4,5	4,5	4,5	6,8	6,5	6,65	8,9	8,8	8,85
2	1,2	1,2	1,2	2,8	3	2,9	4,6	4,5	4,55	6,6	6,5	6,55	8,7	8,6	8,65
<b>PROM.</b>		<b>1,15</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,82</b>	<b>PROM.</b>		<b>4,53</b>	<b>PROM.</b>		<b>6,60</b>	<b>PROM.</b>		<b>8,75</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,06</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,13</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,05</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,14</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,13</b>

<b>Control (+) Ketoconazol 2mg/ml</b>																	
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>Día 8</b>		Promedio	<b>Día 10</b>		Promedio	<b>% Crecimiento</b>	<b>% Inhibición</b>

1	0,6	0,6	0,6	1	1	1	1,3	1,1	1,2	1,3	1,23	1,25	2,3	2,4	2,35	25,82	74,18						
2	0,6	0,6	0,6	1	1	1	1,1	1,1	1,1	1,6	1,6	1,6	2,2	2,3	2,25	24,73	75,27						
<b>PROM.</b>		<b>0,6</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,0</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,15</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,43</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,30</b>		<b>25,27</b>		<b>74,73</b>	
<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,20</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>		N.A.		N.A.	

#### Extracto Etanólico 25mg/ml

	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición						
1	0,8	0,8	0,8	1,2	1,3	1,25	1,5	1,4	1,45	1,9	2	1,95	2,7	2,6	2,65	34,73	65,27						
2	0,8	0,8	0,8	1,3	1,1	1,2	1,5	1,5	1,5	1,9	1,9	1,9	2,3	2,3	2,3	30,14	69,86						
3	0,8	0,8	0,8	1,2	1,1	1,15	1,5	1,5	1,5	1,9	1,9	1,9	2,6	2,7	2,65	34,73	65,27						
<b>PROM.</b>		<b>0,8</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,20</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,48</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,92</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,53</b>		<b>33,20</b>		<b>66,80</b>	
<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,09</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,04</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,04</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,19</b>		N.A.		N.A.	

#### Fracción Etérea 7mg/ml

	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición						
1	0,8	0,8	0,8	1,9	2	1,95	2,8	2,8	2,8	4,3	4,3	4,3	6,5	6,5	6,5	74,29	25,71						
2	0,8	0,8	0,8	1,8	1,8	1,8	2,7	2,6	2,65	4,2	4,2	4,2	6,3	6,4	6,35	72,57	27,43						
3	0,8	0,8	0,8	1,8	1,9	1,85	2,9	2,8	2,85	4,4	4,4	4,4	6,6	6,6	6,6	75,43	24,57						
<b>PROM.</b>		<b>0,8</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,87</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,77</b>		<b>PROM.</b>		<b>4,30</b>		<b>PROM.</b>		<b>6,48</b>		<b>74,10</b>		<b>25,90</b>	
<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,09</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,12</b>		N.A.		N.A.	

#### Fracción Diclorometano 7mg/ml

	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición						
1	0,8	0,8	0,8	1,4	1,3	1,35	2	1,8	1,9	2,9	2,8	2,85	4	4	4	52,42	47,58						
2	0,8	0,8	0,8	1,4	1,3	1,35	2	2	2	3	3	3	4,2	4,2	4,2	55,05	44,95						
3	0,8	0,8	0,8	1,3	1,3	1,3	2	2	2	3	3	3	4,2	4,3	4,25	55,70	44,30						
<b>PROM.</b>		<b>0,8</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,33</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,97</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,95</b>		<b>PROM.</b>		<b>4,15</b>		<b>54,39</b>		<b>45,61</b>	
<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>		<b>4,76</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,12</b>		N.A.		N.A.	

<b>Fracción Acetato de Etilo 2 mg/ml</b>																		
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>Día 8</b>		Promedio	<b>Día 10</b>		Promedio	<b>% Crecimiento</b>	<b>% Inhibición</b>	
<b>1</b>	1,3	1,3	1,3	2,5	2,4	2,45	3,5	3,2	3,35	4,9	5	4,95	6,1	6,4	6,25	81,91	18,09	
<b>2</b>	1,2	1,2	1,2	2,4	2,5	2,45	3,8	3,4	3,6	5,1	4,7	4,9	6,1	6,2	6,15	80,60	19,40	
<b>3</b>	1,2	1,1	1,15	2,5	2,5	2,5	3,5	3,5	3,5	4,8	4,7	4,75	6	6,1	6,05	79,29	20,71	
<b>PROM.</b>	<b>1,22</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,47</b>		<b>PROM.</b>	<b>3,48</b>		<b>PROM.</b>	<b>4,87</b>		<b>PROM.</b>	<b>6,15</b>		<b>80,60</b>	<b>19,40</b>		
<b>D.E.</b>	<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,19</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,16</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,14</b>		N.A.	N.A.		

### ANEXO 3.

Resultados mediciones Primera Prueba, bioensayos *in vitro* contra *Fusarium roseum* durante 8 días de evaluación. (DMSO) Dimetilsulfóxido, (PROM.) Promedio, (D.E) Desviación Estándar, (%) Porcentaje, (N.A.) No Aplica, (Control +) Control Positivo, (Control -) Control Negativo.

#### *Fusarium roseum*

<b>Control (-) DMSO 1%</b>												
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>Día 8</b>		Promedio
<b>1</b>	1,7	1,6	1,65	4	3,8	3,9	6,7	6,5	6,6	9,1	9,1	9,1
<b>2</b>	1,8	1,8	1,8	4,1	4,2	4,15	6,8	6,9	6,85	9,1	9,1	9,1
<b>PROM.</b>	<b>1,73</b>		<b>PROM.</b>	<b>4,03</b>		<b>PROM.</b>	<b>6,73</b>		<b>PROM.</b>	<b>9,1</b>		<b>9,1</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,17</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,17</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>0,00</b>

<b>Control (-) Tween 80 1%</b>												
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>Día 8</b>		Promedio
<b>1</b>	2,2	1,9	2,05	5,5	5,7	5,6	8,4	8,5	8,45	9,1	9,1	9,1
<b>2</b>	2,2	2	2,1	5,8	5,6	5,7	8,6	8,5	8,55	9,1	9,1	9,1
<b>PROM.</b>	<b>2,08</b>		<b>PROM.</b>	<b>5,65</b>		<b>PROM.</b>	<b>8,50</b>		<b>PROM.</b>	<b>9,1</b>		<b>9,1</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,15</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,13</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>0,00</b>



<b>Control (+) Ketoconazol 2mg/ml</b>																			
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición					
1	1	1	1	1,1	1,1	1,1	1,6	1,5	1,55	2,1	2,2	2,15	23,63	76,37					
2	1	0,9	0,95	1	1	1	1,6	1,4	1,5	1,9	2,1	2	21,98	78,02					
<b>PROM.</b>		<b>0,98</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,05</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,53</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,08</b>		<b>22,80</b>		<b>77,20</b>	
<b>D.E.</b>		<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,06</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,13</b>		N.A.		N.A.	

<b>Extracto Etanólico 25mg/ml</b>																			
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición					
1	2	1,9	1,95	2,8	2,7	2,75	2,9	3	2,95	8	7,8	7,9	86,81	13,19					
2	2	2	2	2,9	2,7	2,8	2,9	3,2	3,05	8,5	8,5	8,5	93,41	6,59					
3	1,7	1,9	1,8	2,9	2,8	2,85	3,3	3	3,15	9,1	9,1	9,1	100,00	0,00					
<b>PROM.</b>		<b>1,92</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,80</b>		<b>PROM.</b>		<b>3,05</b>		<b>PROM.</b>		<b>8,50</b>		<b>93,41</b>		<b>6,59</b>	
<b>D.E.</b>		<b>0,12</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,09</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,16</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,54</b>		N.A.		N.A.	

<b>Fracción Etérea 7mg/ml</b>																			
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición					
1	1,5	1,5	1,5	5,1	5,2	5,15	7,3	7,5	7,4	9	9,1	9,05	99,45	0,55					
2	1,5	1,5	1,5	4,8	4,9	4,85	7,2	6,8	7	9,1	9,1	9,1	100,00	0,00					
3	1,5	1,5	1,5	4,5	4,5	4,5	7,5	7,3	7,4	9,1	9,1	9,1	100,00	0,00					
<b>PROM.</b>		<b>1,50</b>		<b>PROM.</b>		<b>4,83</b>		<b>PROM.</b>		<b>7,27</b>		<b>PROM.</b>		<b>9,08</b>		<b>99,82</b>		<b>0,18</b>	
<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,29</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,26</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,04</b>		N.A.		N.A.	

<b>Fracción Diclorometano 7mg/ml</b>														
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	1,8	1,7	1,75	3,8	4	3,9	5,6	5,4	5,5	8,3	8,3	8,3	91,21	8,79
2	1,7	1,5	1,6	4,8	4,9	4,85	6,5	6	6,25	9,1	9,1	9,1	100,00	0,00

3	1,8	1,8	1,8	3,8	4	3,9	5,6	6	5,8	8	8	8	87,91	12,09
<b>PROM.</b>			<b>1,72</b>	<b>PROM.</b>		<b>4,22</b>	<b>PROM.</b>		<b>5,85</b>	<b>PROM.</b>		<b>8,47</b>	<b>93,04</b>	<b>6,96</b>
<b>D.E.</b>			<b>0,12</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,50</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,40</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,51</b>	N.A.	N.A.

<b>Fracción Acetato de Etilo 2mg/ml</b>														
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>Día 8</b>		Promedio	<b>% Crecimiento</b>	<b>% Inhibición</b>
<b>1</b>	2,3	2,3	2,3	6,6	6,7	6,65	8,2	7,6	7,9	9	9	9	98,90	1,10
<b>2</b>	2,6	2,7	2,65	7,2	7,3	7,25	8	7,5	7,75	9	9	9	98,90	1,10
<b>3</b>	2,4	2,5	2,45	6,9	6,8	6,85	7,8	7,8	7,8	9	9	9	98,90	1,10
<b>PROM.</b>			<b>2,47</b>	<b>PROM.</b>		<b>6,92</b>	<b>PROM.</b>		<b>7,82</b>	<b>PROM.</b>		<b>9,0</b>	<b>98,90</b>	<b>1,10</b>
<b>D.E.</b>			<b>0,16</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,28</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,26</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,00</b>	N.A.	N.A.

#### **ANEXO 4.**

Resultados mediciones Segunda Prueba, bioensayos *in vitro* contra *Sclerotinia sclerotiorum* durante 6 días de evaluación. (DMSO) Dimetilsulfóxido, (PROM.) Promedio, (D.E) Desviación Estándar, (%) Porcentaje, (N.A.) No Aplica, (Control +) Control Positivo, (Control -) Control Negativo.

#### ***Sclerotinia sclerotiorum***

<b>Control (-) DMSO 1%</b>						
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio
<b>1</b>	1,7	1,8	1,75	5	5	5
<b>2</b>	2,2	2	2,1	5	5	5

<b>PROM.</b>	<b>1,93</b>	<b>PROM.</b>	<b>5,0</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,22</b>	<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>

<b>Control (-) Tween 80 1%</b>									
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio
<b>1</b>	1,3	1,4	1,35	3,5	3,2	3,35	5	5	5
<b>2</b>	1,7	1,7	1,7	3,8	3,3	3,55	5	5	5
<b>PROM.</b>	<b>1,53</b>		<b>PROM.</b>	<b>3,5</b>		<b>PROM.</b>	<b>5,0</b>		<b>5,0</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,21</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,26</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>0,00</b>

<b>Control (+) Ketoconazol 2mg/ml</b>											
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>% Crecimiento</b>	<b>% Inhibición</b>
<b>1</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	10,00	90,00
<b>2</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	10,00	90,00
<b>PROM.</b>	<b>0,5</b>		<b>PROM.</b>	<b>0,5</b>		<b>PROM.</b>	<b>0,5</b>		<b>0,5</b>	<b>10,00</b>	<b>90,00</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>0,00</b>	N.A.	N.A.

<b>Extracto Etanólico 20mg/ml</b>								
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>% Crecimiento</b>	<b>% Inhibición</b>
<b>1</b>	0,5	0,5	0,5	2,8	2,8	2,8	56,00	44,00
<b>2</b>	0,5	0,5	0,5	2,8	2,9	2,85	57,00	43,00
<b>3</b>	0,5	0,5	0,5	2,7	2,8	2,75	55,00	45,00
<b>PROM.</b>	<b>0,5</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,80</b>		<b>2,80</b>	<b>56,00</b>	<b>44,00</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,06</b>		<b>0,06</b>	N.A	N.A

<b>Fracción Etérea 15mg/ml</b>											
	<b>Día 2</b>		Promedio	<b>Día 4</b>		Promedio	<b>Día 6</b>		Promedio	<b>% Crecimiento</b>	<b>% Inhibición</b>
<b>1</b>	0,5	0,5	0,5	1,6	1,5	1,55	2,5	2,6	2,55	51,00	49,00
<b>2</b>	0,5	0,5	0,5	1,6	1,5	1,55	2,4	2,5	2,45	49,00	51,00

3	0,5	0,5	0,5	1,3	1,3	1,3	2,5	2,6	2,55	51,00	49,00
<b>PROM.</b>	<b>0,5</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,43</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,52</b>	<b>50,33</b>	<b>49,67</b>	
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,14</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>	N.A.	N.A.	

Fracción Diclorometano 4mg/ml								
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,8	0,9	0,85	1,8	1,9	1,85	37,00	63,00
2	0,7	0,7	0,7	1,8	1,8	1,8	36,00	64,00
3	0,8	0,7	0,75	1,6	1,8	1,7	34,00	66,00
<b>PROM.</b>	<b>0,77</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,78</b>		<b>35,67</b>	<b>64,33</b>	
<b>D.E.</b>	<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,10</b>		N.A.	N.A.	

#### ANEXO 5.

Resultados mediciones Segunda Prueba, bioensayos *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* durante 10 días de evaluación. (DMSO) Dimetilsulfóxido, (PROM.) Promedio, (D.E) Desviación Estándar, (%) Porcentaje, (N.A.) No Aplica, (Control +) Control Positivo, (Control -) Control Negativo.

#### *Fusarium oxysporum*

Control (-) DMSO 1%															
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio
1	1	1	1	1,5	1,6	1,55	2,2	2,3	2,25	4,2	4,1	4,15	4,9	4,9	4,9
2	0,9	0,9	0,9	1,5	1,5	1,5	2,2	2,2	2,2	3,9	4	3,95	5	5	5
<b>PROM.</b>	<b>0,95</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,53</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,23</b>		<b>PROM.</b>	<b>4,05</b>		<b>PROM.</b>	<b>4,95</b>		
<b>D.E.</b>	<b>0,06</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,13</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,06</b>		

#### Control (-) Tween 80 1%

	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio
1	0,6	0,6	0,6	1,5	1,5	1,5	2,2	2,4	2,3	4	4	4	5	5	5
2	0,6	0,6	0,6	1,3	1,4	1,35	2,2	2,3	2,25	4	4	4	5	5	5
<b>PROM.</b>	<b>0,60</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,43</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,28</b>		<b>PROM.</b>	<b>4,0</b>		<b>PROM.</b>	<b>5,0</b>		<b>PROM.</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>

<b>Control (+) Ketoconazol 2mg/ml</b>																	
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	0,9	1,2	1,2	1,2	1,5	1,5	1,5	30,00	70,00
2	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	0,9	1,1	1,1	1,1	1,3	1,4	1,35	27,00	73,00
<b>PROM.</b>	<b>0,50</b>		<b>PROM.</b>	<b>0,70</b>		<b>PROM.</b>	<b>0,90</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,15</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,43</b>		<b>PROM.</b>	<b>28,50</b>	<b>71,50</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,06</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>	N.A.	N.A.

<b>Extracto Etanólico 20mg/ml</b>																	
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,7	0,7	0,7	1	1	1	1	1	1	1,7	1,8	1,75	2,3	2,2	2,25	45,45	54,55
2	0,7	0,7	0,7	1	0,9	0,95	1	1	1	1,8	1,8	1,8	2,2	2,2	2,2	44,44	55,56
3	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	0,9	1	1	1	1,8	1,8	1,8	2,2	2,2	2,2	44,44	55,56
<b>PROM.</b>	<b>0,70</b>		<b>PROM.</b>	<b>0,95</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,00</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,78</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,22</b>		<b>PROM.</b>	<b>44,78</b>	<b>55,22</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,04</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,04</b>		<b>D.E.</b>	N.A.	N.A.

<b>Fracción Etérea 6mg/ml</b>																	
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,7	0,7	0,7	1,5	1,5	1,5	2	2	2	3,6	3,6	3,6	4,2	4,2	4,2	84,00	16,00
2	0,7	0,7	0,7	1,4	1,4	1,4	2	2	2	3,7	3,6	3,65	4,2	4,2	4,2	84,00	16,00
3	0,8	0,8	0,8	1,4	1,3	1,35	2,1	2	2,05	3,7	3,6	3,65	4,2	4,3	4,25	85,00	15,00
<b>PROM.</b>	<b>0,73</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,42</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,02</b>		<b>PROM.</b>	<b>3,63</b>		<b>PROM.</b>	<b>4,22</b>		<b>PROM.</b>	<b>84,33</b>	<b>15,67</b>

D.E.	0,05	D.E.	0,08	D.E.	0,04	D.E.	0,05	D.E.	0,04	N.A.	N.A.
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

<b>Fracción Diclorometano 5mg/ml</b>																	
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	Día 8		Promedio	Día 10		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición
1	0,7	0,7	0,7	1	1	1	1,5	1,5	1,5	2,6	2,7	2,65	3,3	3,1	3,2	64,65	35,35
2	0,6	0,7	0,65	1	1	1	1,5	1,5	1,5	2,7	2,6	2,65	3,2	3,2	3,2	64,65	35,35
3	0,6	0,6	0,6	1	1	1	1,4	1,4	1,4	2,8	2,7	2,75	3,3	3,3	3,3	66,67	33,33
<b>PROM.</b>	<b>0,65</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,0</b>		<b>PROM.</b>	<b>1,47</b>		<b>PROM.</b>	<b>2,68</b>		<b>PROM.</b>	<b>3,23</b>		<b>65,32</b>	<b>34,68</b>	
<b>D.E.</b>	<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,05</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,08</b>		<b>N.A.</b>	<b>N.A.</b>	

#### ANEXO 6.

Resultados mediciones Segunda Prueba, bioensayos *in vitro* contra *Fusarium roseum* durante 6 días de evaluación. (DMSO) Dimetilsulfóxido, (PROM.) Promedio, (D.E) Desviación Estándar, (%) Porcentaje, (N.A.) No Aplica, (Control +) Control Positivo, (Control -) Control Negativo.

### *Fusarium roseum*

<b>Control (-) DMSO 1%</b>									
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio
1	1,9	1,9	1,9	3,4	3,2	3,3	5	5	5
2	2	1,8	1,9	3,2	3,5	3,35	5	5	5
<b>PROM.</b>	<b>1,90</b>		<b>PROM.</b>	<b>3,33</b>		<b>PROM.</b>	<b>5,0</b>		<b>5,0</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,08</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,15</b>		<b>D.E.</b>	<b>0,00</b>		<b>0,00</b>

<b>Control (-) Tween 80 1%</b>									
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio
1	1,6	1,5	1,55	3,2	3,3	3,25	5	5	5
2	2	2	2	3,4	3,6	3,5	5	5	5
<b>PROM.</b>	<b>1,78</b>		<b>PROM.</b>	<b>3,38</b>		<b>PROM.</b>	<b>5,0</b>		<b>5,0</b>

D.E.	0,26	D.E.	0,17	D.E.	0,00
------	------	------	------	------	------

<b>Control (+) Ketoconazol 2mg/ml</b>													
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición		
1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,9	1,8	1,85	37,00	63,00		
2	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	2	1,9	1,95	39,00	61,00		
<b>PROM.</b>		<b>1,55</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,60</b>		<b>PROM.</b>		<b>1,9</b>		<b>38,00</b>	<b>62,00</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,06</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,12</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>		N.A.	N.A.

<b>Extracto Etanólico 35mg/ml</b>													
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición		
1	1,3	1,4	1,35	2,2	2,2	2,2	4	4	4	80,00	20,00		
2	1,3	1,2	1,25	2,1	2	2,15	3,7	3,6	3,65	73,00	27,00		
3	1,5	1,4	1,45	2,8	2,6	2,7	4,2	3,9	4,05	81,00	19,00		
<b>PROM.</b>		<b>1,35</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,35</b>		<b>PROM.</b>		<b>3,90</b>		<b>78,00</b>	<b>22,00</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,31</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,22</b>		N.A.	N.A.

<b>Fracción Etérea 20mg/ml</b>													
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición		
1	1,5	1,5	1,5	2,7	2,6	2,65	4,4	4,4	4,4	88,00	12,00		
2	1,5	1,4	1,45	2,9	2,8	2,85	4,5	4,5	4,5	90,00	10,00		
3	1,3	1,3	1,3	3,1	3,1	3,1	4,6	4,6	4,6	92,00	8,00		
<b>PROM.</b>		<b>1,42</b>		<b>PROM.</b>		<b>2,87</b>		<b>PROM.</b>		<b>4,50</b>		<b>90,00</b>	<b>10,00</b>
<b>D.E.</b>		<b>0,10</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,21</b>		<b>D.E.</b>		<b>0,09</b>		N.A.	N.A.

<b>Fracción Diclorometano 15mg/ml</b>												
	Día 2		Promedio	Día 4		Promedio	Día 6		Promedio	% Crecimiento	% Inhibición	
1	1,6	1,7	1,65	2,3	2,2	2,25	4,6	4,6	4,6	92,00	8,00	
2	1,7	1,6	1,65	2,4	2,3	2,35	4,7	4,6	4,65	93,00	7,00	

3	1,7	1,8	1,75	2,2	2,2	2,2	4,6	4,7	4,65	93,00	7,00
	<b>PROM.</b>		<b>1,68</b>	<b>PROM.</b>		<b>2,27</b>	<b>PROM.</b>		<b>4,63</b>	<b>92,67</b>	<b>7,33</b>
	<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,08</b>	<b>D.E.</b>		<b>0,05</b>	N.A.	N.A.

### ANEXO 7.

Estimación de grupos para análisis estadístico. (Ctrl (+) Keto) Control positivo Ketoconazol, (Ext. EtOH) Extracto Etanólico, (Fra. Etérea) Fracción Etérea, (Fra. Dicloro) Fracción Diclorometano, (Fra. Acetato) Fracción Acetato de Etilo.

Grupos	Fitopatógeno	1ª Prueba	Concentración
1	<i>S. sclerotiorum</i>	Ctrl (+) Keto.	2 mg/mL
2	<i>S. sclerotiorum</i>	Ext. EtOH	25mg/mL
3	<i>S. sclerotiorum</i>	Fra. Etérea	7mg/mL
4	<i>S. sclerotiorum</i>	Fra. Dicloro.	7mg/mL
5	<i>S. sclerotiorum</i>	Fra. Acetato.	2 mg/mL
6	<i>F. oxysporum</i>	Ctrl (+) Keto.	2 mg/mL
7	<i>F. oxysporum</i>	Ext. EtOH	25mg/mL
8	<i>F. oxysporum</i>	Fra. Etérea.	7mg/mL
9	<i>F. oxysporum</i>	Fra. Dicloro.	7mg/mL
10	<i>F. oxysporum</i>	Fra. Acetato	3 mg/mL
11	<i>F. roseum</i>	Ctrl (+) Keto.	2 mg/mL
12	<i>F. roseum</i>	Ext. EtOH	25mg/mL
13	<i>F. roseum</i>	Fra. Etérea	7mg/mL
14	<i>F. roseum</i>	Fra. Dicloro.	7mg/mL
15	<i>F. roseum</i>	Fra. Acetato.	4 mg/mL



Grupos	Fitopatógeno	2ª Prueba	Concentración
16	<i>S. sclerotiorum</i>	Ctrl (+) Keto.	2 mg/mL
17	<i>S. sclerotiorum</i>	Ext. EtOH	20mg/mL
18	<i>S. sclerotiorum</i>	Fra. Etérea	15mg/mL
19	<i>S. sclerotiorum</i>	Fra. Dicloro.	4mg/mL
20	<i>F. oxysporum</i>	Ctrl (+) Keto.	2 mg/mL
21	<i>F. oxysporum</i>	Ext. EtOH	20mg/mL
22	<i>F. oxysporum</i>	Fra. Etérea	6mg/mL
23	<i>F. oxysporum</i>	Fra. Dicloro.	5mg/mL
24	<i>F. roseum</i>	Ctrl (+) Keto.	2 mg/mL
25	<i>F. roseum</i>	Ext. EtOH	35mg/mL
26	<i>F. roseum</i>	Fra. Etérea	20mg/mL
27	<i>F. roseum</i>	Fra. Dicloro.	15mg/mL

#### ANEXO 8.

Análisis de varianza para cada uno de los grupos determinados.

		Cases				Total	
		Valid		Missing			
		N	Percent	N	Percent	N	Percent

VAR00001	1.00	2	100.0%	0	.0%	2	100.0%
	2.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	3.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	4.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	5.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	6.00	2	100.0%	0	.0%	2	100.0%
	7.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	8.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	9.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	10.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	11.00	2	100.0%	0	.0%	2	100.0%
	12.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	13.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	14.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	15.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	16.00	2	100.0%	0	.0%	2	100.0%
	17.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	18.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	19.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	20.00	2	100.0%	0	.0%	2	100.0%
	21.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	22.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	23.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	24.00	2	100.0%	0	.0%	2	100.0%
	25.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	26.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	27.00	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%

**ANEXO 9.**

Análisis descriptivo de cada uno de los grupos determinados.

	VAR00002		Statistic
--	----------	--	-----------

VAR00001	2.00	Mean		78.02	2.820	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	65.89		
			Upper Bound	90.16		
			5% Trimmed Mean		.	
			Median		76.37	
			Variance		23.859	
			Std. Deviation		4.885	
			Minimum		74	
			Maximum		84	
			Range		9	
			Interquartile Range		.	
			Skewness		1.349	1.225
			Kurtosis		.	.
	4.00	Mean		88.28	3.608	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	72.76		
			Upper Bound	103.80		
			5% Trimmed Mean		.	
			Median		90.11	
			Variance		39.054	
			Std. Deviation		6.249	
			Minimum		81	
		Maximum		93		
		Range		12		
		Interquartile Range		.		
		Skewness		-1.205	1.225	
		Kurtosis		.	.	
5.00	Mean		13.37	.799		
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9.93			
		Upper Bound	16.81			
		5% Trimmed Mean		.		
		Median		13.19		
		Variance		1.916		
		Std. Deviation		1.384		



1.00	2.00	15.387(*)	2.606	.000	5.16	25.61
	3.00	92.310(*)	2.606	.000	82.09	102.53
	4.00	5.130	2.606	.958	-5.09	15.35
	5.00	80.037(*)	2.606	.000	69.81	90.26
	6.00	18.685(*)	2.855	.000	7.49	29.88
	7.00	26.610(*)	2.606	.000	16.39	36.83
	8.00	67.507(*)	2.606	.000	57.28	77.73
	9.00	47.800(*)	2.606	.000	37.58	58.02
	10.00	74.010(*)	2.606	.000	63.79	84.23
	11.00	16.215(*)	2.855	.000	5.02	27.41
	12.00	86.817(*)	2.606	.000	76.59	97.04
	13.00	93.227(*)	2.606	.000	83.00	103.45
	14.00	86.450(*)	2.606	.000	76.23	96.67
	15.00	92.310(*)	2.606	.000	82.09	102.53
	16.00	3.410	2.855	1.000	-7.79	14.61
	17.00	49.410(*)	2.606	.000	39.19	59.63
	18.00	43.743(*)	2.606	.000	33.52	53.97
	19.00	29.077(*)	2.606	.000	18.85	39.30
	20.00	21.910(*)	2.855	.000	10.71	33.11
	21.00	38.187(*)	2.606	.000	27.96	48.41
	22.00	77.743(*)	2.606	.000	67.52	87.97
	23.00	58.733(*)	2.606	.000	48.51	68.96
	24.00	31.410(*)	2.855	.000	20.21	42.61
	25.00	71.410(*)	2.606	.000	61.19	81.63
	26.00	83.410(*)	2.606	.000	73.19	93.63
	27.00	86.077(*)	2.606	.000	75.85	96.30
	3.00	76.923(*)	2.331	.000	67.78	86.07
	4.00	-10.257(*)	2.331	.013	-19.40	-1.11
	5.00	64.650(*)	2.331	.000	55.51	73.79
	6.00	3.298	2.606	1.000	-6.92	13.52
	7.00	11.223(*)	2.331	.004	2.08	20.37

2.00	1.00	-15.387(*)	2.606	.000	-25.61	-5.16
3.00	1.00	-92.310(*)	2.606	.000	-102.53	-82.09
4.00	1.00	-5.130	2.606	.958	-15.35	5.09
5.00	1.00	-80.037(*)	2.606	.000	-90.26	-69.81
6.00	1.00	-18.685(*)	2.855	.000	-29.88	-7.49
7.00	1.00	-26.610(*)	2.606	.000	-36.83	-16.39
8.00	1.00	-67.507(*)	2.606	.000	-77.73	-57.28
9.00	1.00	-47.800(*)	2.606	.000	-58.02	-37.58
10.00	1.00	-74.010(*)	2.606	.000	-84.23	-63.79
11.00	1.00	-16.215(*)	2.855	.000	-27.41	-5.02
12.00	1.00	-86.817(*)	2.606	.000	-97.04	-76.59
13.00	1.00	-93.227(*)	2.606	.000	-103.45	-83.00
14.00	1.00	-86.450(*)	2.606	.000	-96.67	-76.23
15.00	1.00	-92.310(*)	2.606	.000	-102.53	-82.09
16.00	1.00	-3.410	2.855	1.000	-14.61	7.79
17.00	1.00	-49.410(*)	2.606	.000	-59.63	-39.19
18.00	1.00	-43.743(*)	2.606	.000	-53.97	-33.52
19.00	1.00	-29.077(*)	2.606	.000	-39.30	-18.85
20.00	1.00	-21.910(*)	2.855	.000	-33.11	-10.71
21.00	1.00	-38.187(*)	2.606	.000	-48.41	-27.96
22.00	1.00	-77.743(*)	2.606	.000	-87.97	-67.52
23.00	1.00	-58.733(*)	2.606	.000	-68.96	-48.51
24.00	1.00	-31.410(*)	2.855	.000	-42.61	-20.21
25.00	1.00	-71.410(*)	2.606	.000	-81.63	-61.19
26.00	1.00	-83.410(*)	2.606	.000	-93.63	-73.19
27.00	1.00	-86.077(*)	2.606	.000	-96.30	-75.85

\* The mean difference is significant at the .05 level.