

Estudio fitofarmacológico del manejo del “Oídio” (*Oidium* sp.), “Trips” (*Frankliniella occidentalis*) y “Pulgones” (*Myzus* sp.), en rosas de exportación con la utilización de extractos vegetales. Nevado Ecuador S.A.

Mónica Neira¹ y Ramiro Velastegui²

1/ Ing. Bioq., Carrera de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.

2/ Ing. Agr., MSc, PhD, Profesor Carrera de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.

Campus Huachi, Av. Los Chasquis y Rio Payamino. Telf: 593-2400989, Fax 593-2400998. E mails: neira.monica.c@gmail.com / rvelasteguis@yahoo.com

RESUMEN.

Para el control de oídio, trips y pulgones se realizó un estudio tipo “screening” probando 16 especies vegetales distintas con tres metodologías de preparación de extracto cada una, y un extracto de ajo realizado con la metodología de Henry Doubleday Research Association (2000), reformulada parcialmente por Velastegui (2009). Con excepción del ajo, cada una de las plantas fueron sometidas a tres metodologías para la elaboración de los extractos: maceración, decocción e infusión. Los extractos madre se realizaron en proporción 1:3 p/v (planta completa/agua). Los extractos que presentaron los porcentajes de efectividad más altos para el control de oídio fueron decocción de eneldo, macerado de penco y decocción de menta. Para pulgones los extractos que presentaron los porcentajes de mortalidad de Abbott más elevados fueron extracto de ajo y decocción de hierba mora. En trips los dos mejores tratamientos fueron decocción de hierba mora y macerado de menta. A partir de estos resultados se validaron las dosis, concentraciones de aplicación y partes de la planta que presentaron los mejores resultados de efectividad y mortalidad. Para oídio, eneldo y penco presentaron elevados resultados de efectividad y el extracto por maceración de la raíz de penco mostró prominentes resultados de control alcanzando hasta un 100 % de efectividad a una concentración final del 50% v/v a partir del extracto madre, con aplicaciones del extracto cada 7 días. En pulgones el extracto de ajo y la decocción de hojas y tallos de hierba mora, aplicándolos a concentraciones iguales al 25% v/v cada 3 días en el caso de la hierba mora, e inferiores al 25% en el caso del ajo, como lo recomienda la bibliografía. En trips el extracto por decocción de hojas y fruto de hierba mora al 25% v/v con aplicaciones cada 3 días, y el extracto por maceración de hojas y tallos de menta a una concentración del 25% v/v presentaron los resultados más destacados. Finalmente el estudio fitoquímico de las plantas con mejores efectos de control sobre los sujetos de estudio, estableció que dichas plantas presentan en su composición principalmente saponinas, flavonoides, alcaloides, taninos y aceites vegetales.

Palabras clave: extracto vegetal, oídio, trips, pulgones, efectividad, porcentaje de mortalidad.

ABSTRACT

To control of *Oidium*, thrips and aphids is made a research kind “Screening”, is tested 16 different plants species with three methods of preparation of vegetables extracts each one, and a garlic extract, which was made with the Henry Doubleday Research Association (2000) methodoly, partially reformulated for Velastegui (2009). With exception of garlic extract each one of the plants were subjected to three methods for preparation of extracts: maceration, decoction and infusion. Stem extracts were made in proportion 1:3 w/v (whole plant/water).

The extracts that showed the highest effective rates for control of *Oidium* were decoction of dill, mint decoction and "penco" macerated. For aphids the extracts that showed the highest Abbott's mortality rates were the garlic extract and nightshade decoction. For thrips the two better treatments were mint macerated and nightshade decoction. From these results was validated the dose, merger application and plant parts that showed the best results of effectiveness and mortality. For *Oidium*, dill and "penco" results showed high effectiveness and the root extract maceration from "penco", results showed prominent reaching up to 100% effective at a final concentration of 50% v / v from the stem extract, with applications extract every 7 days. To aphids, garlic extract and decoction of leaves and stems of nightshade, and applied at concentrations equal to 25% v/v every 3 days in the case of nightshade, and less than 25% in the case of garlic, as recommended by the literature. In thrips, extract of decoction of leaves and fruit of nightshade 25% v/v with applications every 3 days, and the extract from macerated mint leaves and stems to a concentration of 25% v/v showed the most important results. Finally the phytochemical study of plants with better control effects on the subjects of study, established that these plants have in their composition mainly saponins, flavonoids, alkaloids, tannins and vegetable oils

Keywords: Vegetable extract, oidium, thrips, aphids, effectiveness, Abbott's mortality rates

INTRODUCCIÓN.

Las rosas se encuentran entre los cultivos ornamentales más importantes desde el punto de vista económico, desde que se iniciaron los cultivos con miras a la exportación, el crecimiento del sector ha sido permanente. Según datos de la Asociación Nacional de Productores y Exportadores de Flores (Expoflores) (Diario Hoy, 2003) los cultivos se iniciaron en la provincia de Pichincha, que es la que registra la mayor superficie cultivada, seguida por Cotopaxi, Azuay, Imbabura, Guayas, Cañar, Carchi y Loja. Sin embargo las rosas son plantas muy susceptibles al ataque de plagas como trips, ácaros y pulgones y de enfermedades como oídio, mildiú vellosa, botrytis, etc. por lo cual las fumigaciones con químicos se vuelven imperativas y de manera frecuente. Según Harari (2003), "el factor de riesgo prevalente en la producción florícola, aunque por cierto no el único, es el uso intensivo de plaguicidas. Alrededor de 30 plaguicidas, además de los fertilizantes, se utilizan en cada plantación en diversas combinaciones, dosis y frecuencias a lo largo del ciclo productivo. Si bien se utilizan de acuerdo a las necesidades o presencia de plagas y enfermedades, hay empresas que tienen programas de fumigación permanentes, llamados preventivos, que se cumplen rigurosamente". Esta recurrente exposición a plaguicidas de origen químico a más de ocasionar ciertas afecciones a la salud de los trabajadores, ocasiona contaminación ambiental en los sectores aledaños a las florícolas. Por otro lado, el mercado internacional día con día se vuelve más exigente respecto a la calidad del producto final ya que no solamente se exigen flores durables y en perfectas condiciones, libres de hongos y cualquier tipo de plaga sino también se demanda la implementación de políticas amigables con el ambiente que den lugar a la obtención de "flores limpias" con la menor utilización de agroquímicos.

Cada año se pierde más del 20% de la producción mundial a causa de enfermedades, malezas y plagas, y se gastan aproximadamente 54 billones de dólares en el control de ellas (Lewiz y Papavizas, 1991). Y ante la creciente preocupación por el incremento de la contaminación a nivel mundial debido en gran parte al inadecuado manejo de los procesos productivos se vuelve imperativa la búsqueda de soluciones amigables con el medio ambiente, mediante las cuales se minimice el negativo impacto ambiental y se incremente la calidad del producto final. Una de las alternativas más viables en el caso de los procesos productivos agrícolas como la floricultura, es la agricultura orgánica, la cual busca el desarrollo de una agricultura eficiente y sustentable, priorizando la perpetuación de una población sana y la conservación de los fundamentos de la vida, mediante la aplicación de técnicas amigables con el medio ambiente, donde los peligrosos agroquímicos sintéticos contaminantes sean descartados definitivamente para el control de plagas y enfermedades. Una de estas alternativas es el control de plagas y enfermedades mediante el empleo de extractos vegetales. Ya que en la naturaleza existe una gama muy amplia de plantas que producen una diversidad de metabolitos secundarios con características que les permiten actuar como antagonistas de patógenos bióticos y de plagas. Una forma de aprovechar dicho antagonismo es mediante la

preparación de extractos o infusiones a partir de sus tejidos (Zavaleta-Mejía, 1999). Los extractos vegetales son productos a base de sustancias metabolizadas por las plantas que pueden: fortificar a la planta, repeler o suprimir al patógeno. Su eficacia depende de muchos factores, no todos ellos controlados totalmente; es por ello que los resultados pueden ser variables, en función del estado del cultivo, las condiciones de extracción, la calidad de la planta de la cual se extrae la sustancia, etc. Muchas pueden favorecer los mecanismos de defensa de las plantas, reforzando la pared celular, o con sustancias inhibitoras de los patógenos, sobre todo en condiciones de estrés (falta de agua o nutrientes, ataques fuertes de insectos, etc.) (Roselló, 2001). Pueden ser *repelentes* como el ajo y la cebolla, que exhalan sustancias que no gustan a las plagas, mejorantes como la cola de caballo o las ortigas que confiere fortaleza a la planta frente al ataque de hongos o insectos, o venenosas como el tanacetum, el ajeno, la cuasia, el neem, etc. Los que tienen efecto insecticida de amplio espectro (nicotina, rotenona, piretrina), suelen ser de plazo de seguridad bastante corto (se biodegradan entre 1 y 3 semanas, bajo la luz solar y el aire), no dejando ningún residuo peligroso; su toxicidad es muy baja para mamíferos. Tienen un efecto de choque en momentos de fuerte ataque, actuando contra el sistema nervioso del insecto y como repelente, pero no es conveniente utilizarlas con mucha asiduidad y localizar el tratamiento, ya que pueden ser perjudiciales para algunos insectos depredadores, o ser peligrosos para el ser humano (son biocidas) (Roselló, 2001; Velasteguí, 2005).

El objetivo principal del estudio es la determinación de la actividad fungicida e insecticida de extractos vegetales acuosos de 16 especies de plantas, la estandarización y validación de las dosis y concentraciones de los extractos más promisorios para el control de oídio, trips y pulgones, y la determinación de su composición fitoquímica.

MÉTODOLOGÍA

Estudio Exploratorio tipo “Screening”

a) Elaboración de extractos. Se emplearon 16 especies vegetales distintas: Penco (*Agave Americano*), Ajo (*Allium sativum*), sábila (*Aloe vera*), marco (*Ambrosia peruviana*), eneldo (*Anethum graveolens*), chilca (*Baccharis sp.*), borraja (*Borrago officinalis L*), nabo (*Brassica napus*), eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis Dehn*), Cola de caballo (*Equisetum arvense*), Manzanilla (*Matricaria chamomila*), hierbabuena (*Mentha sativa*), menta (*Mentha rotundifolia*), guarango (*Prosopis pallida*), hierba mora (*Solanum nigrum L.*) y ortiga (*Urtica dioica*). En el caso de la cola de caballo, menta, ortiga, eneldo, nabo, borraja, hierbabuena, manzanilla y sábila se utilizó la planta completa (raíz, tallo, hojas) para elaborar cada extracto vegetal. Mientras que con el eucalipto, la chilca, el guarango y el marco se emplearon únicamente las hojas, debido al tamaño de la planta y en el caso del ajo se utilizó solamente los bulbos. Con excepción del ajo, cada una de las plantas fueron sometidas a tres metodologías para la realización de los extractos: maceración, decocción e infusión.

Infusión. Se utilizó material vegetal fresco de cada planta en proporción 1:3 (P/V), se lo colocó en un recipiente resistente al calor sobre el cual se vertió el agua hirviendo (este intervalo en el que se trasvasa el agua hirviendo permite alcanzar una temperatura de aproximadamente 80°C, la cual es la indicada para realizar la infusión ya que evita la desaparición de los componentes volátiles), se tapó y se dejó reposar de 40 a 45 minutos, finalmente se filtró el extracto y se lo almacenó colocándolo en frascos de vidrio color ámbar.

Maceración. Se colocó el material vegetal previamente triturado (licuadora industrial) en proporción 1:3 (P/V) en contacto con agua en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante 3 días, hasta que la planta liberó completamente sus componentes activos. Posteriormente la mezcla se filtró, y el material insoluble fue lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclaron para

concentrar el extracto.

Decocción. El material vegetal se puso en agua en proporción de 1:3 (P/V), luego se sometió a decocción a fuego lento (80 ± 3 °C) durante 20 minutos, se tapó y se dejó enfriar.

Extracto de Ajo. Se humedecieron 100 gramos de dientes de ajo finamente picados, con 30 ml de aceite comestible vegetal de girasol por 24 horas. Se añadieron lentamente 2 litros de agua que contenía 15 ml de jabón potásico. Se mezcló, coló y guardó en un recipiente de vidrio color ámbar (Henry Doubleday, 2000).

Todos los extractos vegetales se filtraron y se guardaron, en recipientes de vidrio color ámbar.

Para cada uno de los tres ensayos tipo screening se empleó un diseño experimental de Bloques Completamente al Azar (DBCA) en un arreglo factorial 3X15 con 5 réplicas para los ensayos en oídio y pulgones, y tres réplicas en el ensayo para trips. El factor A fue la metodología de preparación de extractos y contó con tres niveles; el factor B fueron las especies vegetales de los extractos, este factor contó con 15 niveles. Por tanto cada ensayo constó de 45 tratamientos y cada tratamiento contó con 5 replicas en el caso de los ensayos para oído y pulgones y 3 para el de trips. El extracto de ajo se analizó por separada debido a su metodología y se lo comparo con los mejores tratamientos escogidos por el diseño, mediante una prueba de t-student.

Ensayo para control de oídio. Para la aplicación de los extractos vegetales se seleccionó la variedad de rosas "Sweet Moments" debido a su susceptibilidad al patógeno estudiado (oídio) y como testigos del experimento se marcaron 5 plantas infectadas con oídio, a las cuales no se les aplicó ningún extracto, sino únicamente agua con "Disfol" (dispersante, no posee ninguna actividad biocida). Seguidamente se seleccionaron y marcaron al azar para cada tratamiento 5 plantas de rosa con hojas infectadas con manchas de oídio, en las cuales se evaluó el color de las mismas y el relieve de las fructificaciones del patógeno. Se escogieron las plantas con mayor número de manchas color "blanco nieve" (esporulando) en cada hoja. Las plantas se marcaron con etiquetas de acuerdo al tratamiento planteado en el diseño experimental del ensayo. Los extractos se mezclaron con Disfol (1ml/L) y se aplicaron con ayuda de atomizadores manuales, rociando completamente el follaje de las plantas marcadas; se evaluó el % de efectividad empleando una lupa de bolsillo (10X) tres días después de la aplicación, se realizaron un total de tres aplicaciones de los extractos y tres evaluaciones. Para lo cual se estableció una escala arbitraria de porcentajes de efectividad del producto, tomando en cuenta nuevamente el relieve de las fructificaciones del patógeno y el cambio de color de las manchas de oídio.

Ensayos para control de pulgones y trips. Se seleccionó la variedad de rosas "Hearts" para la aplicación de los extractos vegetales y como testigos del experimento se marcaron 5 plantas con una población igual o mayor a 10 individuos en el caso del ensayo para pulgones y 3 tallos con una población igual o superior a 5 individuos en el ensayo para trips, a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento, sino únicamente agua con "Disfol" (dispersante). Inmediatamente se seleccionaron y marcaron al azar para cada tratamiento el mismo número de tallos y con igual número de individuos que los testigos, las plantas se marcaron con etiquetas de acuerdo al tratamiento planteado en el diseño experimental del ensayo. Se aplicaron a cada planta marcada aproximadamente 10 ml de extracto utilizando atomizadores manuales, y se les colocó un capuchón para evitar la pérdida de la muestra por migración de los individuos. La evaluación se realizó trascurridos tres días después de cada aplicación contando el número de individuos vivos y el número de individuos muertos por cada tratamiento, realizando un total de tres aplicaciones y tres evaluaciones. Y se obtuvo el % de mortalidad por extracto empleando la fórmula de Abbott (Ecuación 1).

$$M = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} \quad (\text{Fórmula de Abbott}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Donde:

M = Mortalidad.

m_e = mortalidad en el extracto.

m_b = mortalidad en el testigo.

Evaluación de la eficacia de los Extractos sobre las fructificaciones de oídio. Se recolectaron en campo muestras de esporas de oídio y se las suspendió en agua destilada hasta que la suspensión tomó un color blanquecino. Posteriormente se colocó 1 ml de esta suspensión junto con 1 ml de cada extracto en preparaciones microscópicas (placas porta y cubre objetos). Finalmente se colocaron las muestras al microscopio compuesto y se observaron a 100 y 400X, para comparar aquéllos de los testigos con los que recibieron las aplicaciones de extractos vegetales.

Estandarización y validación de las concentraciones y las dosis más efectivas. Se seleccionaron para cada uno de los tres ensayos los 2 mejores tratamientos que presentaron porcentajes de efectividad y mortalidad iguales o superiores al 60%. Y con estos al igual que en la primera parte, se realizaron tres ensayos, uno para cada sujeto de estudio. Se empleó un diseño experimental de Bloques Completamente al Azar (DBCA) en un arreglo factorial 3X3X3, cada factor contó con tres niveles, por lo que finalmente se contó con 27 tratamientos, cada tratamiento tuvo 3 replicas.

Empleando las mismas metodologías (Infusión, decocción y maceración) que se detallan anteriormente, se realizaron los extractos vegetales de las plantas seleccionadas pero esta vez los extractos se prepararon de cada parte de la planta por separado: raíz, hojas o semillas. Estos extractos se diluyeron con agua y se aplicaron a distintas concentraciones y con diferente periodicidad de aplicación de acuerdo al diseño experimental, con lo que se determinó la parte de la planta que presentó más eficacia sobre oídio, pulgones y trips así como las dosis y concentraciones más adecuadas de aplicación. Cada especie vegetal seleccionada fue separada en sus partes es decir: raíz, tallo, hojas, flores y frutos (de existir). Se realizó el extracto con cada una de ellas, empleando las metodologías que mostraron mejores resultados en la primera parte del estudio, así:

Ensayo para control de oídio.

- Decocción de eneldo: raíz, tallos, hojas, flores y frutos.
- Macerado de penco: raíz y hojas.
- Decocción de menta: raíz, tallos y hojas.

Ensayos para control de pulgones

- Ajo: bulbos.
- Decocción de hierba mora: raíz, tallos, hojas, flores y frutos.

Ensayos para control de trips

- Decocción de hierba mora: raíz, tallos, hojas, flores y frutos.
- Macerado de menta: raíz, tallos y hojas.

La aplicación y la evaluación de los extractos se llevaron a cabo como se detalla anteriormente en la primera parte de la metodología. Pero en el caso de la evaluación se valoró también el efecto residual de los extractos sobre los patógenos 7 días después de la última aplicación de los productos.

La información obtenida experimentalmente mediante el proceso de investigación fue procesada y analizada en base a un estudio estadístico empleando los programas STATGRAPHICS PLUS y MSTAT.

Composición fitoquímica de los extractos seleccionados. Se realizaron los análisis fitoquímicos semicuantitativos para determinar la composición de las 4 especies de las que se obtuvieron los extractos más promisorios para el control de oídio, trips y pulgones. Estas especies fueron: Ajo (*Allium sativum*), Penco (*Agave Americano*), Eneldo (*Anethum graveolens*) y Hierba Mora (*Solanum nigrum L.*). Los análisis se realizaron de cada parte de la planta, es decir: raíz, tallos, hojas, flores y/o frutos. Estos análisis se realizaron en los laboratorios de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito.

Análisis económico de los tratamientos investigados

Se realizó un análisis económico de comparación de los costos de los extractos, sus concentraciones y dosis, incluyendo la implementación de lo necesario para obtenerlos, versus los costos de los tratamientos de carácter orgánico comercial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Valores de pH de los extractos Vegetales. Los valores de pH de los 46 extractos vegetales elaborados fluctúan entre 4 y 8, encontrándose dentro de los límites adecuados para su aplicación en producción vegetal ya que las soluciones con pH menor a 4 o mayor a 9 no deben emplearse, porque son muy ácidas o muy alcalinas, respectivamente (Barbado, 2005).

Estudio Exploratorio tipo "Screening"

a) Ensayo para control de oídio. Los % de efectividad de los extractos fluctúan entre un 76 y un 14%, el primero correspondiente a los tratamientos a1b3 (decocción de eneldo) y a2b12 (macerado de penco), y el segundo a0b11 (Infusión de guarango). El análisis de varianza se mostró que tanto el Factor A (Metodología de Preparación de extracto) como el Factor B (Especie Vegetal) presentan diferencia significativa, al igual que la interacción entre ambos factores. Lo cual indica que tanto la metodología como la especie vegetal interactúan para presentar un efecto combinado que influye significativamente en la variable respuesta (% de efectividad). De acuerdo a esta prueba las mejores combinaciones fueron los tratamientos a1b3 (Decocción de eneldo), a2b12 (macerado de penco) con una media de 76% de efectividad, y a1b1 (decocción de menta) con una media del 60 %. En el caso de la decocción de eneldo (*Anethum graveolens*), según los análisis fitoquímicos contiene una cantidad medianamente abundante de taninos, los cuales poseen acción fungicida puesto que los

taninos de las plantas también funcionan como defensas contra los microorganismos tales como bacterias y hongos (Martínez, 2010). Mientras el extracto macerado de penco contiene una cantidad abundante de saponinas, las cuales le confieren potencial antimicrobiano que permite un control efectivo de oídio llegando a promedios de efectividad del 76%. El macerado de menta que obtuvo un porcentaje de efectividad del 60%, contiene dentro de su composición una gran cantidad de aceites esenciales, ya que las hojas y flores de la menta pueden estar conformadas por estos hasta en 4% de su peso total. Su componente principal es el mentol (30 a 55%), conteniendo además acetato de mentilo (10 a 20%), mentona (9 a 31%), pulegona, felandreno, limoneno, pineno y otras esencias (Ávila y Toledo, 2007). Según estudios realizados se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados “terpenoides”. Los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos (Griffin, 1979). El mentol por ejemplo es un agente antifúngico y antimicrobiano que interactúa a nivel celular con el Ca^{2+} citosólico, probablemente por una liberación de calcio almacenado intracelularmente y bloqueando el canal de calcio (Mucciaarelli et al, 2001).

Evaluación de la eficacia de los Extractos sobre las fructificaciones de oídio. Se seleccionaron los extractos que presentaron porcentajes de efectividad superiores o iguales al 60%, para evaluar su eficacia sobre las fructificaciones del patógeno (oídio), poniendo los extractos seleccionados en contacto con esporas de este último durante 24 horas. Oidium en estado conidial produce esporas hialinas en forma de barril, unicelulares, en cadena (Castaño, 2005). Y sus esporas después de haber sido sometidas al efecto del extracto de penco sufren disgregación (pared y membrana celular), debido probablemente a la acción de las saponinas presentes en el extracto. El efecto fungitóxico de las saponinas esteroidales ha sido estudiado ampliamente por diversos investigadores y se ha confirmado que se deriva de una interacción entre éstas y los constituyentes de la membrana de los hongos como: esteroides, proteínas y fosfolípidos. Esta interacción conlleva a la destrucción de la membrana celular y al incremento en la permeabilidad de la misma y la captación de iones, provocando la muerte de las células (Gruiz, 1996). En los otros dos extractos se observó un efecto similar pero en menor grado, ya que las células no se disgregan en su totalidad. Cabe señalar que tanto el Eneldo como la Menta, en su composición contienen cuantiosas cantidades de aceites esenciales, los mismos que en su estructura pueden contener terpenos y flavonoides entre otros, los cuales les confieren el efecto fungitóxico que se cree es uno de los factores más influyentes en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, es decir, su condición hidrófoba, pues esto les permite irrumpir en las membranas biológicas, causando efectos de desestabilización en su permeabilidad, lo que genera muerte celular (Griffin, 2000).

b) Ensayos para control de pulgones

Se emplearon 46 extractos vegetales y se evaluó el Porcentaje de Mortalidad de Abbott (Eq 1). Se seleccionó la variedad “Hearts” debido a su susceptibilidad a pulgones. Los resultados de % de mortalidad de Abbott, muestra como mayor % de mortalidad un 56% obtenido por el Extracto de Ajo y como menor 1 %, correspondiente al tratamiento a2b12 (decocción de penco). Los relativamente bajos porcentajes de mortalidad de Abbott, presentados en este ensayo se deben principalmente a que los sujetos de estudio (pulgones) son insectos migratorios y al percibir condiciones poco favorables para su desarrollo migran hacia otras plantas, sin embargo este efecto fue reducido con la colocación de capuchones en el área evaluada con extractos.

El análisis de varianza realizado para los 15 extractos vegetales, con excepción del Ajo, señala que tanto los factores A y B al igual que la interacción entre estos presentan diferencia estadísticamente

significativa. Para la interacción AB la prueba de Tukey al 0.05% demuestra como mejor resultado el tratamiento a1b13 (decocción de hierba mora) con una media de 44.42%. Y a partir de la Prueba de Tukey se escogieron los 5 mejores promedios los cuales corresponden a los tratamientos a1b13 (decocción de hierba mora), a2b13 (macerado de hierba mora) con un % de mortalidad del 43.97%, a1b5 (decocción de marco) con un 34.7%, a1b10 (decocción de hierba buena) con un 32.06% y a0b2 (infusión de ortiga) con un 30.65% para realizar la prueba comparativa “t-student” con el extracto de ajo ya que este no se encontraba dentro del diseño experimental estadístico, para de esta manera determinar los mejores tratamientos.

La prueba “t-student”, expuso que con una probabilidad del 0.0154 existe diferencia significativa entre los 5 mejores promedios escogidos por el diseño experimental y el extracto de ajo (*Allium sativum*), estableciendo de esta manera al Extracto de ajo con un promedio de mortalidad de Abbott de 56.95%, como el mejor tratamiento para control de pulgones seguido de la decocción de hierba mora. El modo de acción del extracto de ajo es repelente, por una acción sistémica del ajo ya que este es absorbido por la planta y su sistema radicular, entonces el olor de ajo cambia el olor natural que produce cada planta, engañando así a los insectos (Carballo & Guaharay, 2004). El extracto de ajo perturba el establecimiento del pulgón sobre su planta hospedante e impide la alimentación del insecto que puede llegar a morir, puesto que puede presentar efectos tóxicos (Regnault-Roger, et al., 2004). En efecto, aunque los compuestos azufrados son los más abundantes y mejor conocidos entre los compuestos secundarios, también sintetizan otros como las saponinas, cuyo potencial fitosanitario no se puede ignorar. Los pulgones son sensibles a los efectos insecticidas de los extractos de Ajo ya que estos se manifiestan tóxicos para este tipo de insectos (Regnault-Roger, et al., 2004).

El tratamiento siguiente en efectividad es a1b13 (decocción de hierba mora), el efecto insecticida de la Hierba Mora (*Solanum nigrum*) puede atribuirse a que diversas plantas de la familia de las solanáceas, especialmente las del género *Solanum*, como la Hierba Mora (*Solanum nigrum* L.), son conocidas como fuentes de sustancias estructuralmente muy relacionadas con las saponinas esteroides y con los alcaloides esteroidales. Estos últimos presentan diversas actividades biológicas que incluyen su acción antimicrobiana y antimalárica entre otras (Martínez, 2002). En la hierba mora (*Solanum nigrum* L.) los principales componentes activos son los alcaloides como solasonina, solasonina, glucoalcaloides y alcalinas (Cáceres, et al., 2006). Los frutos inmaduros de esta planta, contienen glucósidos esteroidales que pueden ser solasonina, solamargina, diosfenina y solasonina; la ampliamente reportada toxicidad de *S. nigrum* ha sido atribuida al alcaloide solanina presente principalmente en frutos inmaduros (Edmonds & Chweya, 1997). Según el estudio fitoquímico los taninos y flavonoides (compuestos fenólicos) dieron positivos lo que le confiere a la hierba mora cierta resistencia a ataques de patógenos y la hace un potente agente antimicrobiano natural (Martínez, et al., 2003).

c) Ensayos para control de trips

La variedad escogida para este ensayo fue “Hearts”, por ser la variedad en la que se encontró una mayor población de individuos. Al igual que en los casos anteriores se probaron 46 extractos vegetales, evaluándose su efectividad mediante el porcentaje de mortalidad calculado con la fórmula de Abbott (Eq 1). Los valores de % de mortalidad fluctúan entre un 84.13 % en el caso del tratamiento a1b13 (decocción de hierba mora) y un 0% en los tratamientos a0b13 (infusión de hierba mora) y a1b1 (decocción de menta). El análisis de varianza, muestra diferencia significativa, tanto en el Factor B como en la interacción AB, lo cual indica que la metodología de preparación de extractos influye significativamente en la variable respuesta, y que la especie vegetal por sí sola no presenta diferencia estadísticamente significativa. Según la prueba de Tukey al 0.05% de la Interacción el

mejor tratamiento con una media del 84.13% es el a1b13 (decocción de hierba mora), seguido por el tratamiento a2b1 (macerado de menta) con una media de % de mortalidad del 71.43%. La efectividad del tratamiento a1b13 (decocción de hierba mora) puede atribuírsele a su composición fitoquímica dentro de la cual se encuentran compuestos químicos tales como: alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides y terpenos.

El macerado de menta, presenta el subsiguiente mejor porcentaje de mortalidad de Abbott para control de trips con una media de 71% , ya que al colocar la menta en contacto con un solvente frío (agua) y almacenándolo por un tiempo prolongado se consigue que sus componentes se difundan en el solvente, generando así una solución saturada de las sustancias presentes en la planta, componentes como los aceites esenciales, de los que la menta (*M. rotundifolia*) posee considerables cantidades y monoterpenoides como la mentona que induce una variedad de repuestas de los insectos, varios monoterpenos son repelentes para insectos y afectan su crecimiento y desarrollo, además pueden resultar tóxicos para estos (El-Meniawi, *et al.*, 2006). Reportes indican que los extractos de *M. rotundifolia* con diclorometano, tiene importantes efectos letales en el control de insectos como *Tribolium castaneum* Herbst, y que los solventes orgánicos como el diclorometano podrían ser mejores que el agua para la extracción de metabolitos con actividad biológica, como los compuestos insecticidas (Clemente, *et al.*, 2003).

Selección de los extractos vegetales más promisorios. De los extractos vegetales estudiados en los tres ensayos se seleccionaron los que presentaron los porcentajes de efectividad y mortalidad de Abbott con valores superiores al 60%, o significativamente más altos para oídio, pulgones y trips respectivamente.

Estandarización y validación de las concentraciones y las dosis más efectivas.

a) Ensayo para control de oídio

Decocción de eneldo. Para el extracto de eneldo se realizaron ensayos individuales de la Raíz, tallos y hojas, flores y frutos. Probando cada extracto a tres concentraciones y periodicidades de aplicación distintas, y con ello se determinó la parte de la planta, las dosis y concentraciones de aplicación que presentan los porcentajes de efectividad más promisorios para el control de oídio. Los resultados obtenidos posterior a las tres aplicaciones de los extractos muestra como mejor tratamiento a2b0c0 (Raíz, 75%, 1 día) que tiene un media de efectividad de 80% y como peor el tratamiento a2b1c2 (Raíz, 50%, 7 días) con un promedio de 17%.

A partir del análisis de varianza y la prueba de Tukey al 0.5%, para el factor B se señala que el mejor nivel es el b0 (75% de concentración) con una media de 49%. Y para el factor C la prueba de Tukey señala a la aplicación diaria como mejor nivel del Factor evaluado con una media del 53%. Determinándose así que se puede realizar el extracto empleando toda la planta de eneldo y pese a que los mejores niveles de los factores son b0c0 (75%, 1 día), por efecto de costos se escogerán los niveles b1c1 (50%, 3 días) debido a que una aplicación concentrada diaria del producto no es factible y los porcentajes de efectividad obtenidos con los niveles b1c1 son aceptables. Para determinar el efecto residual o perdurable del extracto de eneldo se realizaron evaluaciones diarias hasta 7 días después de la última aplicación, calificando el estado del patógeno según una escala arbitraria y el análisis de varianza señaló que ni la concentración ni la parte de la planta de la que se realice el extracto influyen significativamente de forma individual en el tiempo de rebrote del patógeno, y la mejor combinación para lograr un efecto prologando de control es la a2c0 (Raíz, 1 día). No obstante con ninguno de los tratamientos se logra una desaparición total del patógeno ya que existe un rebrote antes de haber transcurrido los 7 días de la última aplicación.

Decocción de menta. Los porcentajes de efectividad de las tres evaluaciones muestran cómo en la mayor parte de los tratamientos se van incrementando los porcentajes de efectividad conforme se van incrementando el número de aplicaciones del producto, los porcentajes de efectividad de este extracto son relativamente bajos en comparación a los porcentajes de efectividad de los otros dos tipos de extractos probados. Los análisis de varianza de las 3 evaluaciones indican que el porcentaje de efectividad no es influenciado por la concentración a la que los extractos se apliquen pero si depende tanto de la parte de la planta de la que se lo obtenga como de la periodicidad de aplicación del mismo. La prueba de Tukey señala como mejores tratamientos a a0c0 (Hojas y tallo, 1 día) con un promedio del porcentaje de efectividad del 60%, y b0c0 (75%, 1 día) con una media del 60 %. Los porcentajes de efectividad del extracto son relativamente bajos tomando en cuenta que las concentraciones y periodicidades de aplicación a las que se está empleando son las más altas y esto no resulta práctico para aplicaciones en campo a gran escala. Las evaluaciones del efecto residual del extracto muestran que no existe un efecto residual hasta los 7 días en ninguno de los tratamientos, ya que se observan valores altos de rebrote del patógeno lo cual indica que con ninguna de las combinaciones se consiguió la muerte total del hongo.

Macerado de penco. Los resultados del porcentaje de efectividad exponen que la mayor parte de los tratamientos presentan efecto desde la primera aplicación, algunos tratamientos alcanzan el máximo porcentaje de efectividad desde la segunda aplicación manteniéndose de esa manera hasta la tercera aplicación e inclusive hasta las evaluaciones posteriores a la última aplicación en las cuales no se observa un rebrote del patógeno. Los ANOVAs del ensayo señalan en la última evaluación que los factores A (Parte de Planta), B (concentración del extracto) y C (periodicidad de aplicación) presentan individualmente diferencia estadísticamente significativa, al igual que en todas sus interacciones dobles. La prueba de Tukey al 0.05% del Factor A señala como mejor nivel al a1 (Raíz) con una media del 88% lo cual indica un porcentaje de efectividad bastante promisorio para el control de oídio, debido probablemente a la composición fitoquímica de la raíz de penco la cual, según el Estudio fitoquímico, contiene una medianamente abundante cantidad de saponinas con actividad biológica fungicida, capaz de controlar el desarrollo del patógeno estudiado (oídio). Para el Factor B (concentración del extracto) se presentan como mejores niveles de concentración los niveles b0 (75%) y b1 (50%), con una media del porcentaje de efectividad del 75 y 69 % respectivamente. Para el Factor C (Periodicidad de Aplicación) se designa como mejor nivel al c0 (1 día) con una media de 75%, sin embargo los otros dos niveles también presentaron promedios aceptables de control de 60 y 57 % para el nivel c1 (3 días) y c2 (7 días) sin existir diferencia estadísticamente significativa entre estos dos últimos.

La prueba de Tukey para la interacción AB, para la primera interacción se presenta a la combinación a1b0 (raíz, 75%) como la más sobresaliente ya que presenta un porcentaje de efectividad del 100% el cual indica un control total de oídio, este efecto se presentó desde la segunda aplicación del extracto y se mantuvo hasta la tercera en las evaluaciones y las evaluaciones posteriores. Los tratamientos que le siguen en efectividad son el a1b1 (raíz, 50%) con 99% y a1b2 (raíz, 25%) con 63% que también producen efectos de control y son porcentajes elevados aceptables, lo cual indica que siempre que se use la raíz de penco para obtener el extracto se pueden obtener aceptables porcentajes de efectividad de control de oídio incluso aplicando a las concentraciones más bajas probadas. Para la interacción AC se muestra que las mejores combinaciones son a1c1 (raíz, 3 días), a1c0 (raíz, 1 día) y a1c2 (raíz, 7 días) con medias de 96, 88 y 79% respectivamente. Para la interacción BC, se señala como mejores combinaciones a b0c0 (75%, 1 día) con un promedio de 86.67% de efectividad, b1c0 (50%, 1 día) con una media de 80%, b0c2 (75%, 7 días) con un porcentaje de efectividad del 76.67 % y b1c2 (50%, 7 días) con una media del 68.33%. En la evaluación del efecto perdurable del extracto de penco antes del rebrote del patógeno (de existir), se

observó que en 5 de los 18 tratamientos probados no existe rebrote alguno del patógeno. Estos resultados indican que mientras el extracto provenga de la raíz de penco se pueden hacer aplicaciones al 50% de concentración, cada siete días y se obtendrá un buen efecto residual y elevados porcentajes de efectividad de control de oídio. Este extracto fue el que mayores porcentajes de efectividad y valores de efecto residual obtuvo de los tres extractos probados para control de oídio, puesto que se presentaron porcentajes de efectividad hasta del 100% y no se observó rebrote alguno del patógeno hasta 7 días después de la última aplicación, debido a que la acción del extracto fue fungicida y no fungistática, es decir las estructuras del hongo fueron completamente inhabilitadas por acción de los componentes del extracto presumiblemente por la saponinas debido a ello no existió rebrote alguno de patógeno varios días después de la última aplicación.

b) Ensayos para control de pulgones

Extracto de ajo. Se ensayaron dos factores, el Factor A (concentración del extracto) con 3 niveles: a0 (75%), a1 (50%) y a2 (25%), y el Factor B (periodicidad de aplicación) con dos niveles: b0 (1 día) y b1 (3 días). No se ensayaron niveles para la parte de la planta como en el ensayo para oídio debido a que solamente se disponía del bulbo del ajo para realizar el extracto. Los porcentajes de mortalidad de Abbott del extracto, muestran cómo se van incrementando los % de mortalidad conforme se van incrementando el número de aplicaciones, consiguiendo con la última aplicación porcentajes de mortalidad que van desde el 70 hasta el 89%. El análisis de varianza, no indica diferencia significativa alguna, ni para los factores probados, ni para la interacción, lo cual probablemente se debe en el caso del Factor A, concentración del extracto a que los niveles escogidos como concentraciones de prueba no fueron los adecuados, pudiendo ser las concentraciones probadas demasiado elevadas ya que si bien es cierto producen un efecto de control eficiente para pulgones sin presentar fitotoxicidad alguna, no presentan diferencia estadísticamente significativa en el ensayo, pues en la metodología de Henry Doubleday Research Association (2000, tomado por R. Velasteguí) que fue la empleada para realizar el extracto, se recomienda una aplicación de 15-20 ml por cada 2 litros de agua, mientras que en el presente ensayo se emplearon concentraciones de 250, 500, y 750 ml por cada litro, lo cual generó una acumulación del producto por la planta que puede generar un efecto residual más prolongado, más no un porcentaje de mortalidad superior.

Decocción de hierba mora. Según los porcentajes de mortalidad obtenidos se empiezan a observar resultados favorables a partir de la segunda aplicación del extracto, y hasta la tercera evaluación se observan elevados porcentajes de mortalidad con los cuales se llega hasta un control total de los sujetos de estudio (pulgones). En el análisis de varianza en la tercera y última evaluación se presenta diferencia significativa en los factores A y C, lo cual indica que el porcentaje de mortalidad depende directamente de la parte de la planta de la que se obtenga el extracto y de la periodicidad de aplicación del mismo, pero es independiente de la concentración a la que dicho extracto se aplique por lo que se pueden seleccionar las concentraciones de extracto más bajas. Además se presenta diferencia significativa o un efecto combinado en la interacción AC. Para el Factor A el mejor nivel es a1 (Hojas y Tallos) con un promedio de 57% de mortalidad. Lo cual probablemente se debe a los alcaloides, taninos, saponinas, triterpenos y esteroides presentes en su composición fitoquímica. Para el Factor C, el mejor nivel es c1 (3 días) con una media de 68%.

En la interacción AC se establece como mejor tratamiento el a0c1 (Hojas y tallo, 3 días), con una media de 91 %, el cual es un buen porcentaje de mortalidad, ya que tanto las hojas como el tallo incluyen las partes más voluminosas de la planta lo que facilita de adquisición de la materia prima y considerando que este tratamiento incluye el tiempo más prolongado en cuanto a periodicidad de

aplicación se refiere, abriendo la posibilidad de probar periodicidades de aplicación con una mayor intervalo de tiempo entre una y otra.

c) Ensayos para control de trips

Macerado de menta. Los resultados mostraron que se van incrementando gradualmente los porcentajes de mortalidad conforme se van incrementando el número de aplicaciones del extracto, existiendo incluso el tratamiento a0b2 (Hojas y tallo, 25%) que llegan a un control total de trips ya que alcanza un porcentaje de mortalidad de Abbott del 100%. En los análisis de varianza se puede observar que tanto el Factor A (parte de la planta) como el Factor B (Concentración) no ejercen un efecto significativo sobre el porcentaje de mortalidad, de forma individual pero presentan un efecto combinado que si afecta a la variable respuesta. La prueba de Tukey para la interacción AB determina como mejor tratamiento al a0b2 (Hojas y Tallos, 25%) con un porcentaje de control total de trips.

Decocción de hierba mora. Al igual que con los otros extractos evaluados los porcentajes de mortalidad generados por el producto van incrementándose paulatinamente conforme se incrementan el número de aplicaciones del producto, alcanzando valores de control elevados hasta del 100% por el extracto a1b0 (Flores y fruto, 75%) y del 93% por el a0b2 (Hojas y tallo, 25%). En el análisis de varianza de la tercera evaluación se evidencia diferencia significativa en el Factor A (Partes de la Planta) y B (concentración del extracto), pero no en la interacción de los mismos, lo cual indica que cada factor influye de manera independiente sobre la variables respuesta, sin que dependan los niveles del Factor A de los niveles del Factor B. Según la prueba de Tukey para el factor A el mejor nivel es el a1 correspondiente a flores y fruto con una media de 69% de mortalidad de Abbott, lo cual puede deberse a la alta cantidad de saponinas y alcaloide presentes en los frutos de la hierba mora, las cuales pueden presentar un efecto tóxico contra trips. Para el Factor B, el mejor nivel es c2 (25%) con una media del 86 % de mortalidad ejercida en trips.

Composición fitoquímica de los extractos seleccionados.

Los análisis se realizaron en los laboratorios de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito. De las plantas que presentaron los mejores resultados para control de oídio, trips y pulgones, en cada uno de los tres ensayos realizados. Cabe mencionar que el análisis fitoquímico realizado es de carácter semicuantitativo

a) Ensayo para control de oídio.

Penco (*Agave americana*). Hay estudios que han revelado en el *Agave americana*, la presencia de glucósido espirostanol, saponinas, saponinas esteroidales y derivados de tetratriacontanol (Parmar *et al*, 1991). El penco (*Agave americana*) empleado en la elaboración de extractos, posee en su composición tanto de las hojas como de la raíz, saponinas, pero en la raíz en mayor cantidad que en las hojas. Esto indica que el efecto fungicida del extracto de penco se debe a la cantidad de saponinas presentes en cada parte de la planta, debido a ello el extracto de la raíz de penco es mucho más efectivo para el control de oídio que el de las hojas, ya que posee una cantidad mayor de saponinas. Las saponinas son glicósidos que aparecen en una gran variedad de plantas, triterpenos o esteroides unidos a una o más cadenas de azúcar y el escualeno es el precursor clave en la síntesis

de estos compuestos (Jacobsen & Sherwood, 2002). Las saponinas son compuestos relacionados con la alelopatía de raíces como la raíz de *Medicago sativa* L., Fabaceae (Alfalfa), que contienen glucósidos del ácido medicagénico, el principal metabolito alelopático con efectos fitotóxicos, antifúngicos y antimicrobianos (Waller *et al.*, 1993). De ahí que se les puede atribuir a las saponinas el efecto fungicida observado con el extracto de penco, las saponinas han sido intensamente estudiadas en la búsqueda de nuevas alternativas de control de enfermedades. Las de tipo monodesmosídicas presentan una alta actividad fungicida (Osbourn, 1996; Hostettmann & Marston, 1995). Se han hecho reportes acerca de la presencia de hecogenina, chlorogenina y rocogenina en *Agave americana*. Y estudios sobre el extracto de agave señala que contiene saponinas: agavasaponina E y agavasaponina H (Wilkomirski, *et al.*, 1975). Otros compuestos como el Tetratriacontanol, tetratriacontyl hexadecanoato y un nuevo 2-tritriacontylcromina han sido aislados de *Agave americana* L., dos de estos compuestos exponen significativa actividad antibacteriana. El efecto fungitóxico de las saponinas esteroidales ha sido estudiado ampliamente por diversos investigadores, y se ha confirmado que se deriva de una interacción entre éstas y los constituyentes de la membrana de los hongos como: esteroides, proteínas y fosfolípidos. Esta interacción conlleva a la destrucción de la membrana celular y al incremento en la permeabilidad de los iones, provocando la muerte de las células (Gruijz, 1996). Además, se han encontrado publicaciones de que las saponinas esteroidales tienen capacidad de reaccionar con los esteroides de las membranas, formando complejos y eliminándolos de ellas, creando orificios, aumentando por lo tanto la permeabilidad de la membrana (Glauert, *et al.*, 1962).

Eneldo (*Anethum graveolens*). El estudio fitoquímico de la planta completa señala como principales componentes: Taninos (Mediana Cantidad), Flavonoides (Poca Cantidad), Aceites esenciales (Mediana cantidad), Triterpenos y Esteroides (Mediana Cantidad), lo cual coincide con reportes que señalan a constituyentes químicos como: la Carvonona (acetona), eugenol, miristinol (fenoles), limoneno, felandreno terpineno (terpenos) (Sellar, 2003). El efecto fungicida del eneldo puede ser atribuido a la presencia de aceites esenciales. Ya que el tipo de actividad antimicrobiana mostrada por los aceites esenciales varía desde una inhibición parcial, hasta una inhibición completa de crecimiento, acción bactericida o fungicida (Tong y Altman, 2002). El aceite esencial de las hojas de eneldo exhibe actividad anti fúngica contra hongos como *Aspergillus flavus* (Dwivedi & Dubey, 1993). Además la actividad anti fúngica del extracto de eneldo ha sido comprobada eficazmente contra otros hongos como *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum* y *Aspergillus niger*. También posee actividad antibacteriana comprobada contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados presentados aquí demuestran que el aceite esencial de eneldo puede ser considerado como una fuente antimicrobiana natural (Singh, *et al.*, 2005) y pese a no existir reportes acerca de actividad contra oídio, con los resultados obtenidos en el presente estudio queda demostrado que puede usarse eficazmente para el control del mismo.

Hasta el momento la relación entre la estructura molecular de derivados de aceites esenciales como los flavonoides con su actividad antifúngica no ha sido esclarecida del todo, se cree que algunos metabolitos pertenecientes a la porción de aceites esenciales, están directamente relacionados con sus propiedades de aceptación de electrones, definidas por los valores energéticos de sus orbitales moleculares inferiores vacíos, hecho que los convierte en mejores aceptores de electrones que donadores (Griffin, 2000). Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales han generado interés en cuanto a la determinación de la relación de su composición química y actividad. Estudios encaminados en dilucidar esta correlación han concluido que los terpenoides oxigenados son los principales contribuyentes en esta actividad, junto con los alcoholes, siendo más efectivos que los aldehídos y las cetonas (Chalcat *et al.*, 2007).

Recientes investigaciones han demostrado que el sitio de acción de los terpenoides es la membrana celular, debido a su naturaleza hidrofóbica. Algunos terpenoides irrumpen en la membrana celular en bacterias por ejemplo, alterando su fluidez al aumentar la permeabilidad, causando así un efecto bactericida. En adición a su capacidad de desintegrar la membrana, algunos terpenos como β -pireno afectan la mitocondria en levaduras, causando una disminución en la tasa de respiración, lo que conlleva a una menor producción de energía, que resulta finalmente en una disminución en su crecimiento. Este efecto en la respiración, fue atribuido a una afección en la región del citocromo B de

la cadena transportadora de electrones. De la misma forma, existen evidencias de que el limoneno y el β -pireno poseen la misma capacidad de afectar el sistema respiratorio productor de energía en la membrana de levaduras (Griffin, 2000). Los aceites esenciales también pueden interactuar con los esteroides, y en particular con el ergosterol constituyente de la membrana de hongos sensibles como *oïdium*, provocando que la membrana sea permeable al K^+ y a moléculas del tamaño de la glucosa a causa de la formación de poros. Por su interacción con los esteroides de las membranas en los microorganismos, los polienos forman poros o conductos. Y el incremento en la permeabilidad de la membrana permite la salida de diversas moléculas pequeñas.

En el caso de la menta (*Mentha rotundifolia*) debido a sus bajos rendimientos en el control de oïdio en la segunda parte del estudio no se realizó el análisis fitoquímico.

b) Ensayo para control de pulgones y trips

Ajo (*Allium sativum*). Para el ajo se realizó el análisis fitoquímico del bulbo expuesto y este indica la existencia de alcaloides (poca cantidad), saponinas (poca cantidad), aceites esenciales (mediana cantidad), triterpenos y esteroides (poca cantidad). Estos resultados coinciden con estudios que establecen que el ajo contiene compuestos con alto nivel de azufre (por ejemplo, la alicina y aliina), numerosos flavonoides / isoflavonoides (como nobiletina, quercetina, rutósido [rutina] y tangeretina), prostaglandinas, saponinas y terpenos (tales como citral, linalol geraniol, y α y β -felandreno) (Dausch, 1990; Singh, *et al.*, 2001). La capacidad del ajo para eliminar insectos está respaldado por un estudio científico de S.V Amonkar y E.L. Reves, realizado en 1969 en la Universidad de California en el que demostraron además que los elementos activos eran el disulfuro y el trisulfuro de alilo (Fulder & Blackwood, 1997). Otros reportes señalan que el agente activo básico del ajo, es la aliina, que cuando es liberada interactúa con una enzima llamada allinasa y de esta forma se genera la alicina, que es el precursor de varios productos de transformación, incluidos ajoenos, vinilditiinos, oligosulfurosos y polisulfurosos (Fonnegra & Jiménez, 2007), y es la sustancia que contiene el olor característico y penetrante del ajo. Es usado contra piojos. Otro principio activo: disulfuro de alipropilo: Controla larvas de plagas de diferentes cultivos. Como lechuga, zanahoria, apio y fresas (Maggi, 2004). Ferrada & Farias, 2005 exponen que los repelentes en base a ajos de preparación industrial reducen las poblaciones de áfidos presentes en el cultivo de papa, a los 21 días después de la aplicación, mientras el preparado casero logra reducir las poblaciones de áfidos a los 41 días después de la aplicación. Extractos de ajo probados contra *Myzus persicae* tienen un efecto favorable sobre las plantas en su protección y pueden causar reducción en el número de pulgones que se depositan en la planta (Dancewicz & Gabryœ, 2008) tal como ocurrió en la presente investigación donde se produjeron elevados porcentajes de mortalidad.

Fitches, *et al.*, 2008 estudiaron la actividad insecticida de las lectinas recombinantes presentes en el ajo para áfidos del guisante (*Acyrtosiphon pisum*), siendo éstas agudamente tóxicas a las 48 horas de exposición para pulgones, pero esta toxicidad crónica depende de la dosis a la que sean expuestos. También se han estudiado lecitinas purificadas de la hoja de ajo (ASAL) y se ha encontrado que tiene efecto perjudicial en el crecimiento y supervivencia de dos importantes plagas de insectos homópteros, *Lypaphis erysimi* comúnmente conocido como Afidos y *Dysdercus cingulatus* (bicho rojo del algodón). La capacidad única de unión de "ASAL" a la membrana interna del epitelio del intestino de los insectos afectados se demostró mediante análisis inmunohistoquímico. Y determinaron que las proteínas de los receptores de las células epiteliales intestinales fueron las responsables de las características de unión específica. La capacidad de unión al ligando de esta lectina, correlacionada con la propiedad insecticida, facilitó determinar el modo de acción de la particular lectina, sobre la fisiología de los insectos mencionados. Esto también indica que la lectina de la hoja de ajo se mantiene estable incluso en el ambiente del intestino del insecto.

Hierba mora (*Solanum nigrum L.*). Se realizó el estudio fitoquímico para el planta completa y para la raíz, sin observar mayores diferencias entre la composición de ambas, estudios señalan entre los componentes activos encontramos: glocoalcaloides (0.04%), solasonina, solanigrina, soladodamina, solamarina, asparagina, taninos, saponinas, ácido cítrico, nitratos, heterósidos esteroideos nitrogenados, esteroides, triacontano (Correa, 1990), los cuales en su mayor parte coinciden con los

componentes fitoquímicos que destacan en el presente estudio en esta especie vegetal que son: alcaloides (mediana cantidad), taninos (poca cantidad), saponinas (mediana cantidad), flavonoides (poca cantidad), triterpenos y esteroides (poca cantidad). Los frutos tienen mayor cantidad de saponinas que el resto de la planta. Los principales componentes activos son los alcaloides de los cuales se destacan las saponinas, solaninas, solanigrina, que tienen un mayor efecto como repelente que como insecticida o antialimentario; además, estos componentes pueden presentar especificidad por algunos insectos como los dípteros y las hormigas (Grainge & Ahmeds, 1988).

Los alcaloides, productos naturales de marcada actividad biológica, son compuestos comunes en las especies de solanácea (Chang, *et al.*, 1991). La ampliamente reportada toxicidad de *S. nigrum* ha sido atribuida al alcaloide solanina, este alcaloide es encontrado en todas las partes de la planta, con un creciente nivel a medida que la planta madura, aunque esto es aparentemente modificado por el tipo de suelo y clima (Edmonds & Chweya, 1997). La solasodina y solasonina son también conocidas por sus propiedades hemolíticas y también poseen propiedades anti fúngica y citostáticas (Kumar, *et al.*, 2006). Algunas variedades de *Solanum* son inhibidoras de alimentación debido a su alcaloide característico, repele al pulgón *Myzus persicae* por liberar una feromona de alarma y pueden también manifestar actividad insecticida (Pascual, 1996). Estudios prueban la capacidad de *Solanum nigrum* como insecticida contra en larvas de *Tribolium castaneum* Herbst manifiestan un 60% de mortalidad de la población total de insecto con aplicaciones de 3 µg/insecto y con una dosis del 0.25% mezclada en su dieta se obtuvo una mortalidad de al menos 50% (Pascual, 1998). Dentro del grupo de los fenoles los compuestos reportados con actividad insecticida son los flavonoides (Morimoto *et al.*, 2000). Y uno de los flavonoides a los que se le puede atribuir la actividad insecticida de la hierba mora es la rutina, que es un flavonol glucósido de color amarillo cristalino (C₂₇H₃₀O₁₆) presente en plantas como la hierbamora (Correa, 1990). Estudios contra áfidos como el pulgón negro de la madera (PTA), *Pterochloroides persicae* (Homoptera: *Lachnidae*), demuestra que la ingesta de cierta cantidad de flavonoides tiene un efecto insecticida contra estos insectos (Ateyyat & Abu-Darwish, 2009), los flavonoides tienen un anillo β -catecolico que parece ser responsable de la actividad tóxica para los insectos (Onyilagha *et al.*, 2004). Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que se observaron altos grados de mortalidad de pulgones. Esto se le puede atribuir a la cantidad alcaloides y flavonoides presentes en las plantas hierbamora.

Estudio Económico. El estudio económico cuantifica costos y beneficios económicos derivados de la ejecución de la inversión. En la presente investigación se partió del punto de equilibrio, el cual es una herramienta que se emplea en la mayor parte de las empresas y es sumamente útil para cuantificar el volumen mínimo a lograr (ventas y producción), para alcanzar un nivel de rentabilidad (utilidad) deseado. El Punto de equilibrio es aquel en el que los ingresos son iguales a los costos, esto es, en el que se obtiene un beneficio igual a cero. La empresa no tiene beneficios ni pérdidas (Hernández, 2010). Este dato no se utiliza para evaluar rentabilidad sino para estimar los recursos necesarios para manejar determinado volumen de producción también se le conoce como umbral de rentabilidad porque a partir de este punto la empresa ingresa a una zona de ganancias, mientras que por debajo, no cubre sus costos (Poz, 2004).

Los costos fijos que se tomaron en cuenta en el presente estudio son los valores de depreciación de maquinaria, muebles y enseres, además de los sueldos para el personal o mano de obra. En los costos variables se incluyen los servicios básicos y los insumos que se requieren para producir 100 litros de extracto mensual durante un año, es decir 12000 litros, para aplicaciones cada siete días al 25% v/v. Los valores de costos totales fijos y variables son \$ 1042.59 para los primeros y \$ 3786.06 para los segundos respectivamente, con la suma de estos costos se obtienen los costos totales que son \$ 4828.64 y relacionando este con el número de litros a producirse anualmente se obtiene el costo del valor unitario que es \$ 4.02, este valor es lo que le cuesta a la empresa fabricar 1 litro de extracto. Este valor al ser comparado con los costos por litro de productos orgánicos comerciales, resulta significativamente menor, sin embargo tomando en cuenta que la dosis mínima de aplicación probada para los extractos estudiados fue de 25%v/v, el gasto mensual de aplicación del producto resulta ser más elevado, de ahí la importancia de hacer estudios posteriores probando concentraciones menores de aplicación de los extractos para determinar cuál es la concentración mínima a la que los productos tienen efecto. Por otro lado el valor del punto de equilibrio es de 12000,

esta es la cantidad de litros de extracto que debe producirse en la empresa para que no existan ni pérdidas ni ganancias, en este caso al ser un producto para autoconsumo no existe un porcentaje de utilidad en el producto por ello el punto de equilibrio es igual al número de unidades (litros) que se planifica producir anualmente, con eso queda comprobado que la producción de los extractos resulta factible.

CONCLUSIONES

A partir del estudio tipo "screening" se determinó que tanto la especie vegetal como la metodología de preparación del extracto y su interacción influyen significativamente sobre los porcentajes de control de los sujetos de estudio. La decocción y maceración fueron las mejores metodologías de preparación de extractos, de eneldo (*Anetum graveoleons*) y de penco (*Agave americana*) puesto que presentaron altos porcentajes de efectividad de control sobre oídio. La decocción e infusión fueron las mejores metodologías para el control de pulgones y la mejores especies vegetales fueron ajo (*Allium sativum*) y hierba mora (*Solanum nigrum*). Para trips la mejor metodología fue la decocción, las especies vegetales probadas por sí sola no presentaron influencia significativa en los porcentajes de mortalidad evaluado.

Los extractos vegetales obtenidos a partir de la planta completa, que presentaron los resultados más promisorios para control de oídio, trips y pulgones a concentraciones 1:3 p/v fueron para oídio: decocción de eneldo (76% de efectividad), macerado de penco (76% de efectividad) y decocción de menta (60% de efectividad). Para pulgones: extracto de ajo (57% de mortalidad de Abbott) y decocción de hierba mora (44 % de mortalidad de Abbott), este último presenta efectividad también en el control de trips con un 81% de mortalidad de Abbott también el macerado de menta mostró efectividad insecticida para el control de trips con un 71 % de mortalidad de Abbott.

Las dosis y concentraciones más efectivas para control de Oídio dependen del tipo de planta y en algunos casos también depende de la parte de la planta que se utilizó para preparar el extracto. Así para el control de oídio los extractos probados fueron eneldo, penco y menta. Para eneldo se estableció que empleando toda la planta para el extracto se pueden realizar aplicaciones al 50% de concentración del extracto cada 3 días. El macerado de raíz de penco presentó sobresalientes resultados de control de oídio alcanzando los porcentajes de efectividad máximos del 100% y mostrando un efecto residual hasta 7 días después de la última aplicación sin que haya rastro de rebrote del patógeno, con aplicaciones del 50% de concentración del extracto cada 7 días. Los porcentajes de efectividad de la decocción de menta fueron relativamente bajos tomando en cuenta que las concentraciones y periodicidades de aplicación a las que se obtienen los mejores resultados son las más altas, aplicaciones diarias al 75% de concentración, lo cual no resulta práctico para aplicaciones en campo a gran escala.

Para pulgones, el extracto de ajo se debe aplicar a concentraciones menores al 25% v/v como recomienda la bibliografía, ya que concentraciones más elevadas no presentaron diferencias significativas y pueden llegar a producir un bloqueo bioquímico que interrumpe como en este caso la determinación de las dosis y concentraciones más efectivas, debido a que las dosis altas pueden estimular el metabolismo del agente nocivo o también provocar un bloqueo bioquímico de las moléculas. Para la decocción del hierba mora se puede realizar el extracto de las hojas y tallos y aplicarlo a la concentración más baja probada del 25% cada 3 días obteniendo así altos porcentajes de Mortalidad de Abbott.

Las dosis y concentraciones más afectivas para control de trips con extracto de decocción de hierba mora son 25% v/v cada 3 días mientras el extracto sea realizado de las hojas y fruto. Para el macerado de menta la concentración de aplicación del extracto más adecuada es al 25% v/v empleando las hojas y tallos para realizar el extracto.

El análisis fitoquímico reveló los constituyentes que presentan actividad biológica ya sea fúngica o insecticida: para oídio se determinó que los componentes activos que le confieren capacidad fungicida en eneldo (*Anetum graveolens*) son los aceites esenciales y flavonoides. Para el penco los

componentes biológicamente activos son las saponinas. Tanto para trips como para pulgones los constituyentes que presentan propiedades insecticidas en hierba mora son las saponinas y los alcaloides, y únicamente para pulgones el extracto de ajo contiene compuestos altamente azufrados como la alliina y flavonoides que poseen capacidad biológica insecticida.

El estudio económico realizado manifiesta que el costo de la producción del litro de extracto es de \$ 4.02, valor que en comparación a productos orgánicos comerciales es relativamente bajo, sin embargo el costo de la cantidad de extracto que se debe aplicar en volumen mensual es mayor. El punto de equilibrio obtenido es de 12000 y señala que el proyecto pese a no ser rentable, por no producir directamente utilidades debido a que es un producto para autoconsumo, si es factible ya que genera beneficios para el control de plagas y enfermedades, los cuales a mayor escala podrían conllevar a ahorros para la empresa en la adquisición de productos de control de problemas fitosanitarios. Y además cabe recalcar que la empresa puede autoabastecerse de la materia prima para la obtención de extractos, lo cual desemboca en una reducción sustancial de costos de producción, y de igual forma la mano de obra requerida para la preparación de los extractos será la ya existente en la empresa, sin producir de esta forma costos extras de contratación.

BIBLIOGRAFÍA:

Ávila, María., Toledo, Samuel. 2007. Contribución al estudio sistemático de la familia Lamiaceae en el estado monagas, (municipio maturín y municipio caripe). Universidad pedagógica experimental libertador. Instituto pedagógico de Maturín departamento de ciencias naturales.

Barbado, José Luís. 2005. Hidriponía. Primera Edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Albatros. Pag 47-48.

Carballo, Manuel & Guaharay Falguni. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Primera edición: Managua. CATIE

Castedo, Hugo. 2010. Saponina de la Quinoa - QS Agri 350.CCBOL GROUP S.R.L. <http://www.ccbolgroup.com/saponina.html>

Castaño, Jairo. 2005. Guía ilustrada de hongos promisorios para el control de malezas, insectos, nematodos y hongos fitopatógenos. Primera Edición. Manizales-Colombia. Editor Universidad de Caldas.

Chalcat J., Garry R., Lamaty C., Menut C., Malhuret R, & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of essential oils research* **9**, 67-75.

Chang, Artemio, Klinar, Silvia, Castillo, P., Torres, J. y Vicuña L. (1991) Determinación cuantitativa de alcaloides en solanáceas medicinales de Ica. XVII Congreso Peruano de Química. I Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas.

Clemente, S.; Mareggiani, G.; Broussalis, A.; Martino, V.; Ferraro, G. 2003. Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products insects. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* **29**, 1-8.

Correa, Q. & Bernal, H. 1990. Especies Vegetales Promisorias de los países del convenio Andrés Bello: *Bracharis*. Bogota: SECAB. Ciencia y Tecnología. V,5, pp. 170-236.

Dausch JG, Nixon DW. 1990. Garlic: a review of its relationship to malignant disease. *Prev Med*; **19** (3): 346-61.

Dancewicz, Katarzyna & Gabryś, Beata. 2008. Effect of extracts of garlic (*Allium sativum* L.), wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and tansy (*Tanaceum vulgare* L.) on the behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.) during the settling on plants. *Pestycydy/Pesticides*, 2008, (3-4),

93-99.

Edmonds, Jennifer & Chweya, James.1997. Black nightshades, *Solanum nigrum* L. and related species. Volumen 15 de Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Bioversity International. N° Pags 113

Diario HOY. 2003. El país todavía puede cifrar sus esperanzas en la producción agropecuaria. <http://www.hoy.com.ec/zhechos/2003/libro/tema17.htm>

Dwivedi Suresh K. & N.K. Dubey. 1993. Potential use of the essential oil of *Trachyspermum ammi* against seed-borne fungi of Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L. (Taub.)). *Mycopathologia*. 121: 101-104.

Edmonds, Jennifer & Chweya, James.1997. Black nightshades, *Solanum nigrum* L. and related species. Volumen 15 de Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Bioversity International. N° Pags 113

El-Meniawi, Fatma A., Seham M. 2006. Toxic and biochemical impact of certain plants essential oils on *Bemisia tabaci* Genn (Hom., Aleyrodidae). *J. Pest Cont. & Environ Sci.* 14(1):81-99.

Ferrada, Iann & Farias, Antonio. 2005. Uso de extractos de ajo como repelentes de áfidos (Hemiptera: Aphididae) en el cultivo orgánico de papas. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo.

Fitches, Elaine; Wiles, Duncan; Douglas, Angela; Hinchliffea, Gareth; Audsleyb, Neil; Gatehousea, John. 2008. The insecticidal activity of recombinant garlic lectins towards aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 38. Issue 10. Pages 905-915.

Grainge M. & A. Ahmeds. 1988. Handbook of plant with pest control properties. John Wiley and Sons, Nueva York. 469-470 p.

Griffin, Shane. 1979. "Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure"; *Physic Bulletin*, 30, pp 262

Griffin S. (2000). Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship with their molecular structure. Tesis doctoral. In faculty of science technology and agriculture. University of western Sydney.

Gruiz K. 1996. Fungitoxic Activity of Saponins: Practical Use and Fundamental Principles. In *Saponins used in Traditional Modern Medicine*, edited by G.R. Waller and K. Yamasaki. Plenum Press. NY USA and London England.

Harari, Raúl. 2003. Fuerza de trabajo y floricultura: empleo, ambiente y salud de los trabajadores. En: *Ecuador Debate*, No. 59. Agosto 2003. Quito.

Henry Doubleday Research Association. 2000. <http://organicgardeningweb.com/Recipe%20book/Pesticide%20Recipes/Garlic%20Spray.htm>

Hérmadez, César. 2010. Determinación del punto de equilibrio económico y productivo y su impacto en las explotaciones apícolas. Universidad Autónoma de Tamaulipas. México.

Hostettmann, K. and A. Marston. 1994. c. Cambridge University Pres, London, England p. 240-291.

Fonnegra, Ramiro & Jiménez, Silvia 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Segunda Edición. Colombia. Editorial Universidad de Antioquia.

Fulder, Stephen; Blackwood, John. 1997. El Ajo: Un Remedio Natural. Editorial Inner Traditions / Bear & Company. Reimpresión en español: Ediciones Étoile-México.

Glauert A.M., Dingle J.T., Lucy J.A. 1962 Action of Saponin on Biological Cell Membranes. Nature. Vol. 196 Dec. 2 pp 952-955.

Griffin S. (2000). Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship with their molecular structure. Tesis doctoral. In faculty of science technology and agriculture. University of western Sydney.

Gruiz K. 1996. Fungitoxic Activity of Saponins: Practical Use and Fundamental Principles. In Saponins used in Traditional Modern Medicine, edited by G.R. Waller and K. Yamasaki. Plenum Press. NY USA and London England.

Jacobsen, Sven-Erik & Sherwood Stephen. 2002. Cultivo de Granos Andinos Ecuador, Informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Editorial Abaya-Yala. Quito-Ecuador.

Kumar, Ashwani; Roy, Shikha; Sopory, Sudhir K. 2006. Plant biotechnology & its applications in tissue culture. India. Editorial I. K. International Pvt Ltd.

Lewiz, J. A. and C. G. Papaviza. 1991. Biocontrol of plant disease. In: The Approach for tomorrow. Crop Protection 10: 95-105.

Maggi, María. 2004. Insecticidas Naturales. Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales Agencia Cordoba Ciencia-Unidad CEPROCOR.

Martínez, Paulina. 2010. Taninos. <http://www.scribd.com/doc/41643055/TANINOS#>

Martínez, Alejandro. 2002. Alcaloides esteroidales de solanaceas. Facultad de Química Farmacéutica. Antioquia

Martínez, Anahí; Conde Juan; Fernández Nidelvia. 2003. Caracterización fisicoquímica y fitoquímica de la hierba mora (*Solanum nigrescens* L) cosechada en campeche. 176. In: Almaguer V.G.; T. Colinas L.; A. Flores M.; R. Mora A.; E. Vidal L.; H. González R.; C. Ayala S.; J.M. Mejía M. (eds). Memoria de Resúmenes del X Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas, IX Congreso Nacional y II Internacional de la Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental. 20 al 24 de octubre del 2003. Chapingo, Mex., México. Vol. 10.

Morimoto, M.; Kumeda, S.; Komai, K. 2000. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphilum affine* D. Don Journal of Agriculture and Food Chemistry. 48. 1888-1891.

Mucciaarelli, M., Camuso, W., Berteau, C., Bossi S., Maffei, M. 2001. Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha x piperita* on cucu, ber respiration. Phytochemistry. 57:91-98.

Osborn, A. E. 1996a. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. The Plant Cell 8: 1821-1931.

Pascual-Villalobos, M. J. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: estado actual de la investigación. España. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

Pascual-Villalobos, M. J., 1998: Repellency, growth inhibition and toxicity in *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleóptera: *Tenebrionidae*) larvae caused by plant extracts. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(1): 143-154

Poz, Marvin. 2004. Estudio de factibilidad para la instalación de una empresa de comercialización y

exportación de tejidos típicos, en el municipio de cantel, quetzaltenango. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico industrial. Guatemala.

Regnault-Roger, C., Philogène, B. JR, Vincent C., Terrón P. 2004. Biopesticidas de origen vegetal. Madrid – España. Mundi-Prensa Libros.

Roselló Josep.2001. Extractos naturales utilizados en agricultura ecológica. Centro de Química Farmacéutica. La Habana-Cuba. Pag 7-10.

Sellar, Wanda. 2005. Guía de Aceites Esenciales. Quinta edición. Madrid- España. Editorial EDAF.

Shane Griffin. 2000 . “Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure”; *Physic Bulletin*, 30, pp 262

Singh UP, Prithviraj B, Sarma BK, et al. 2001. Role of garlic (*Allium sativum L.*) in human and plant diseases. *Indian J Exp Biol*; 39 (4): 310-22

Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M. and Catalan, C. (2005), Chemical Constituents, Antimicrobial Investigations, and Antioxidative Potentials of *Anethum graveolens L.* Essential Oil and Acetone Extract: Part 52. *Journal of Food Science*, 70: M208–M215.

Soubeiran, Eugène. 1847. Tratado de farmacia teórico y práctico. Traducido de la tercera edición por Antonio Casares. Madrid- España. Sociedad de autores, Libreros, impresores de España.

Tong M, Altman P & Bartetson R (1992). Tea tree oil in the treatment of tinea pedis. *Australian Journal of dermatology* 33, 145-149.

Velasteguí, J.R. 2005. Alternativas ecológicas para el manejo integrado fitosanitario en los cultivos. AgroExpress Editorial. Quito-Ecuador. 173p.

Waller, G.R., M. Jurzysta y R.L.Z. Thorne. 1993. Allelopathic activity of root saponins form alfalfa (*Medicago sativa L.*) on weeds and wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 34:11.

Wilkomirski, B.; Bobeyko, V.; Cintia, P.,1975.New esteroidal saponins of *Agave americana*. *Phytochemistry*.14, 2657-2659.

Zavaleta-Mejía, E. 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra*. 3:202.