

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE
PAICO (*Chenopodium ambrosioides*), KHOA (*Clinopodium
bolivianum*) Y RUDA (*Ruta graveolens*) FRENTE A
Moniliophthora spp AISLADA A PARTIR DE MUESTRAS
DE CACAO CON MONILIASIS, LA PAZ-BOLIVIA,
2015.**

Tesis de grado presentada para la obtención del Grado de Licenciatura

POR: CERVANDO CHRISTIAN GUTIERREZ FORONDA

TUTORES: LILY SALCEDO ORTIZ Msc.

SERGIO RODRIGO QUISBERTH BARRERA Msc.

LA PAZ –BOLIVIA

2017

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA

Tesis de grado:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE
PAICO (*Chenopodium ambrosioides*), KHOA (*Clinopodium*
***bolivianum*) Y RUDA (*Ruta graveolens*) FRENTE A**
***Moniliophthora spp* AISLADA A PARTIR DE MUESTRAS**
DE CACAO CON MONILIASIS, LA PAZ-BOLIVIA,
2015.

Presentada por:

Para optar el grado académico de Licenciado en Bioquímica

Nota numeral:.....

Nota Literal:.....

Ha sido

Director de carrera de Bioquímica:

Tutores: Lily Salcedo Ortiz Msc.

Sergio Rodrigo Quisberth Barrera Msc.

Tribunal: Dr. Pablo Irahola Schmeisser

Tribunal: Dra. Carla Crespo M.

Tribunal: Dra. Sandra Vargas N.

LA PAZ –BOLIVIA

2017

DEDICATORIA.

**El presente trabajo se lo dedico
con mucho cariño a Dios, mi Familia y
con especial aprecio a mi madre,
a todos ellos los llevo siempre en mi corazón.**

AGRADECIMIENTO

Mi más profundo agradecimiento a Dios.

A mi mamá Rufina Foronda y mi papá Hugo Gutierrez por todo el apoyo y las enseñanzas incondicionales que siempre me brindaron.

A mis hermanas Isela y Lilian Gutierrez por haberme acompañado durante todo este proceso.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por todos los grandiosos años aportados a mi formación profesional.

Al Instituto de Investigaciones Químicas por haberme acogido en sus ambientes y por todas las enseñanzas otorgadas.

A la Estación Experimental de Sapecho por haber coadyuvado en la realización de la presente tesis.

A la Dra. Lily Salcedo Ortiz y al Dr. Sergio Rodrigo Quisberth Barrera por todo el apoyo otorgado antes, durante y en la finalización de la realización del presente trabajo.

Al Dr. Pablo Irahola, Dra. Carla Crespo y la Dra. Sandra Vargas por todas la correcciones y sugerencias que me permitieron obtener el trabajo final y enriquecerlo con todos los conocimientos otorgados.

Al Dr. Dagoberto Cáceres por el apoyo y la guía que de manera incondicional siempre me brindó.

Tabla de contenido

1.	INTRODUCCIÓN	7
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3.	JUSTIFICACIÓN.....	13
4.	OBJETIVOS.....	15
4.1.	Objetivos específicos	15
5.	MARCO TEORICO.....	16
5.1.	Cacao.....	16
5.2.	Moniliasis del cacao.....	17
5.3.	<i>Moniliophthora roreri</i>	18
5.3.1.	Características.....	19
5.3.2.	Taxonomía.....	21
5.3.3.	Ciclo de vida.....	22
5.3.4.	Patogenicidad	23
5.3.5.	Síntomas de la enfermedad.....	24
5.3.6.	Métodos de control.....	25
5.4.	El uso de plantas para el control de fitopatógenos.....	27
5.5.	PAICO (<i>Chenopodium ambrosioides</i>).....	29
5.5.1.	Generalidades	29
5.5.2.	Clasificación taxonómica y descripción morfológica	29
5.5.3.	Composición.....	30
5.5.4.	Actividad biológica	30
5.5.5.	Usos	32
5.6.	KHOA (<i>Clinopodium bolivianum</i>)	33
5.6.1.	Generalidades	33

5.6.2.	Clasificación taxonómica y descripción morfológica	33
5.6.3.	Composición.....	34
5.6.4.	Actividad biológica	34
5.6.5.	Usos	34
5.7.	RUDA (<i>Ruta graveolens</i>).....	35
5.7.1.	Generalidades	35
5.7.2.	Clasificación taxonómica y descripción morfológica	35
5.7.3.	Composición.....	36
5.7.4.	Actividad biológica	38
5.7.5.	Usos	39
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1.	Muestras biológicas.	40
6.2.	Equipos.	40
6.3.	Material fungible.....	40
6.4.	Reactivos.....	40
7.	METODOLOGÍA	41
7.1.	Diseño Metodológico.....	41
7.2.	Recolección de las plantas	41
7.3.	Obtención de los extractos	41
7.4.	Caracterización fitoquímica de los extractos vegetales.	42
7.4.1.	Ensayo de Mayer	42
7.4.2.	Ensayo de Dragendorff.....	42
7.4.3.	Ensayo de Fehling	42
7.4.4.	Ensayo de la Espuma.....	43
7.4.5.	Ensayo de Kedde	43

7.4.6.	Ensayo de Bajlet.....	43
7.4.7.	Ensayo de Keller-Killiani.....	44
7.4.8.	Ensayo de Lieberman-Burchard.....	44
7.4.9.	Ensayo del Cloruro Férrico	45
7.4.10.	Ensayo de Acetato de Plomo.....	45
7.4.11.	Ensayo de Shinoda	45
7.5.	Recolección de agente patógeno <i>Moniliophthora spp</i>	46
7.6.	Aislamiento e identificación de <i>Moniliophthora spp</i>	46
7.7.	Evaluación de la actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central.....	47
7.8.	Evaluación de la actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición del crecimiento micelial.	48
7.9.	Análisis estadístico.....	49
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
8.1.	Identificación	50
8.2.	Rendimiento de los extractos etanólicos de las especímenes vegetales	50
8.3.	Determinación Cualitativa de los componentes mayoritarios	51
	Dragendorff.....	51
8.4.	Aislamiento e Identificación de <i>Moniliophthora spp</i>	53
8.5.	Actividad antifúngica por prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central	56
8.6.	Actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición del crecimiento micelial	62
9.	CONCLUSIONES	68
10.	RECOMENDACIONES	70

- Por todo lo anteriormente expuesto se recomienda hacer las pruebas moleculares a *Moniliophthora spp.* con el fin de identificar la especie de la misma. 70

11. BIBLIOGRAFÍA..... 71

12. ANEXOS..... 88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Moniliophthora roreri</i>	22
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	29
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Clinopodium bolivianum</i>	33
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Ruta graveolens</i>	36
Tabla 5. Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de <i>Chenopodium ambrosioides</i> , <i>Clinopodium bolivianum</i> y <i>Ruta graveolens</i> a partir de la parte aérea de las mismas.	50
Tabla 6. Determinación Cualitativa de los componentes mayoritarios de los extractos etanólicos de <i>Chenopodium ambrosioides</i> , <i>Clinopodium bolivianum</i> y <i>Ruta graveolens</i>	51
Tabla 7. Criterios para la determinación de la actividad antifúngica.	56
Tabla 8. Porcentaje de inhibición <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> después de 14 días.	57
Tabla 9. Porcentaje de inhibición <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Ruta graveolens</i> después de 14 días.	61
Tabla 10. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> durante 21 días.	62
Tabla 11. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Clinopodium bolivianum</i> durante 21 días.	64
Tabla 12. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Ruta graveolens</i> durante 21 días.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mazorcas de caco infestadas con <i>Moniliophthora roreri</i>	18
Figura 2. Esporogénesis en <i>Moniliophthora roreri</i> vista al microscopio.	21
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Moniliophthora roreri</i>	23
Figura 4. Obtención de los extractos etanólicos de las plantas en estudio.	51
Figura 5. Determinación Cualitativa de los componentes mayoritarios.	52
Figura 6. Escaso desarrollo de hongo <i>Moniliophthora spp</i> en condiciones de laboratorio.	53
Figura 7. Cultivos aislados de <i>Moniliophthora spp</i>	54
Figura 8. Esporas de <i>Moniliophthora spp</i> vistas al microscopio, a partir de las muestras obtenidas de la población de Sapecho.	55
Figura 9. Estructuras conidiales de <i>Moniliophthora roreri</i>	55
Figura 10. Evaluación de la actividad antifúngica por el método de inhibición por pozo central del extracto etanólico <i>Chenopodium ambrosioides</i>	57
Gráfico 1. Evaluación del efecto inhibidor a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Chenopodium ambrosioides</i> frente a <i>Moniliophthora spp</i> mediante la prueba de inhibición por pozo central.....	57
Gráfico 2. Evaluación del efecto inhibidor a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Clinopodium bolivianum</i> frente a <i>Moniliophthora spp</i> mediante la prueba de inhibición por pozo central.....	60
Gráfico 3. Evaluación del efecto inhibidor a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Ruta graveolens</i> frente a <i>Moniliophthora spp</i> mediante la prueba de inhibición por pozo central.....	62
Gráfico 4. Inhibición de crecimiento micelial a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Chenopodium ambrosioides</i> frente a <i>Moniliophthora spp</i> durante 21 días.....	65
Gráfico 5. Inhibición de crecimiento micelial a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Clinopodium bolivianum</i> frente a <i>Moniliophthora spp</i> durante 21 días.....	66
Gráfico 6. Inhibición de crecimiento micelial a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Ruta graveolens</i> frente a <i>Moniliophthora spp</i> durante 21 días.....	68

RESUMEN

La Moniliasis es una enfermedad del cacao devastadora causada por el basidiomiceto *Moniliophthora roreri*, que es considerada uno de los patógenos causantes de las mayores pérdidas en producción a nivel mundial. La presencia de *Moniliophthora roreri* en Bolivia se habría generado a finales del año 2011 con el ingreso al país de mazorcas de cacao contaminadas con monilia, procedente de Colombia.

El control químico de esta enfermedad ha mostrado ser ineficiente y muy costoso para los pequeños agricultores. Es por esta razón que las medidas de control están orientadas principalmente a evitar la diseminación de la enfermedad y a la implementación de buenas prácticas de cultivo como podas, drenajes, remoción de frutos enfermos, entre otros. Sin embargo estas prácticas culturales también llegan a ser costosas con el tiempo, es por esta razón que se buscan alternativas mucho más prácticas, eficientes, aplicables y menos dañinas al ambiente.

Para la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*) se utilizó los ensayos de inhibición por difusión en agar en pozo central e inhibición del crecimiento micelial a concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/mL; en el primer experimento se obtuvo concentraciones mínimas inhibitorias de 100 mg/mL para el extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides*, 12.5 mg/mL para *Ruta graveolens* y no hubo un efecto inhibitorio por parte *Clinopodium bolivianum* después de los 14 días. Sin embargo en el experimento de inhibición de crecimiento micelial, en donde el extracto se incorpora al medio de cultivo PDA y la evaluación del efecto inhibitorio se realizó mediante el índice antifúngico en relación al tiempo; se determinó que el extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* a concentraciones de 100 y 200 mg/mL presentan una actividad antifúngica de baja-moderada, el *Clinopodium bolivianum* presenta actividad antifúngica baja a 200 mg/mL a los 21 días y extracto etanólico de *Ruta graveolens* presenta una actividad antifúngica de

baja a los 7 días, a buena a los 21 días; a una concentración de 200 mg/mL, además de presentar diferentes grados de inhibición en todas sus concentraciones.

Por lo anteriormente mencionado el extracto etanólico de *Ruta graveolens* a 200 mg/mL, se presenta como una prometedora opción para control de *Moniliophthora spp* tanto por su efecto inhibitorio agudo, como por su potenciado efecto durante su exposición prolongada.

Palabras clave: *Moniliophthora*, *Chenopodium ambrosioides*, *Clinopodium bolivianum*, *Ruta graveolens*, cacao.

SUMMARY.

Moniliasis is a devastating cocoa disease caused by the basidiomycete *Moniliophthora roreri*, which is considered one of the pathogens causing the greatest losses in production worldwide. The presence of *Moniliophthora roreri* in Bolivia is presumed to have been generated at the end of 2011 with the entry into the country of cocoa-contaminated cocoa bean from Colombia.

The chemical control of this disease has proved to be inefficient and very costly for small farmers. It is for this reason that the control measures are oriented mainly to avoid the dissemination of the disease and to the implementation of good practices of cultivation like pruning, drainage, removal of diseased fruits, among others. However, these cultural practices also become expensive over time, it is for this reason that alternatives are sought that are much more practical, efficient, applicable and less harmful to the environment. For the evaluation of the antifungal activity of the ethanolic extracts of Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) and Ruda (*Ruta graveolens*) were used the diffusion inhibition tests in agar in central well and inhibition of mycelial growth at concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/mL; In the first experiment, minimum inhibitory concentrations of 100 mg/mL were obtained for the ethanolic extract of *Chenopodium ambrosioides*, 12.5 mg/mL for *Ruta graveolens* and there was no inhibitory effect on *Clinopodium bolivianum* after 14 days. However in the mycelial growth inhibition experiment, where the extract is incorporated into the PDA culture medium and the evaluation of the inhibitory effect was performed by antifungal index in relation to time; It was determined that the ethanolic extract of *Chenopodium ambrosioides* at concentrations of 100 and 200 mg /mL present a low-moderate antifungal activity, *Clinopodium bolivianum* only shows low antifungal activity at 200 mg/mL at 21 days and ethanolic extract of *Ruta graveolens* Has a low to good antifungal activity from day 7 to 21 at a concentration of 200 mg/mL, in addition to having different degrees of inhibition at all concentrations.

Because of the aforementioned ethanolic extract of *Ruta graveolens* at 200 mg/mL, it is

presented as a promising option for the control of *Moniliophthora spp* both due to its acute inhibitory effect and its potentiated effect during its prolonged exposure.

Keywords: *Moniliophthora*, *Chenopodium ambrosioides*, *Clinopodium bolivianum*, *Ruta graveolens*, cacao.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao en Bolivia no registra un aprovechamiento de parte de las comunidades indígenas antes de la llegada de los españoles, esta actividad adquiere importancia a partir del Siglo XVIII, introducida por las Misiones de Jesuitas como fuente de sustento en la economía. Actualmente la colecta y cultivo de cacao forma parte importante del ingreso de muchas unidades familiares, manteniéndose a la fecha las tradiciones y las prácticas locales.

La producción nacional está integrada por “Cacao Amazónico Boliviano” que alcanza las 12.115 hectáreas, constituyendo el 26% de la producción (concentradas en el Departamento del Beni con el 67%, Santa Cruz con el 24% y el 9% en el Norte de La Paz, Cochabamba y Pando), el resto de cacao cultivado corresponde a variedades híbridas importadas, representando el 74% del total (concentradas básicamente en el Departamento de La Paz) (Ardaya, 2009) donde tiene gran importancia económica (Vargas, Somarriba, & Carballo, 2005).

Actualmente el cultivo de cacao en Bolivia presenta problemas claramente identificados; entre ellos la falta de tecnología apropiada, escasa capacitación de los recursos humanos, el cambio climático y estado fitosanitario de las plantaciones (Bazoberry Chali & Salazar Carrasco, 2008). Entre los agentes que afectan el estado fitosanitario del cacao (*Theobroma cacao L.*) tenemos a los hongos patógenos tales como *Phytophthora palmivora*, *Moniliophthora perniciosa* (Osorio-Solano, Orozco-Castaño, López-Gartner, & Rivera-Páez, 2012) y *Moniliophthora roreri* (Grisales Ortega & Afanador Kafuri, 2007) (Crozier, Thomas, Aime, Evans, & Holmes, 2006) (Orozco, Osorio S, Rivera Páez, & López Gartner, 2010) (Hernández-rodríguez, Ruíz-beltrán, Acebo-guerrero, Miguélez-Sierra, & Heydrich-Pérez, 2014) que producen grandes pérdidas económicas, afectando la economía de los productores, disminuyendo la producción, además de causar un deterioro de la planta y sus frutos.

La Moniliasis del cacao fue descrita por primera vez en Ecuador en el año 1916, por J. B. Rorer en la región de Quevedo en Ecuador, por lo que fue considerada por casi cien años como el centro de origen de esta enfermedad, pero estudios realizados por Phillips-mora et al. (2006) demuestran que la enfermedad se originó en la zona de Sopetrán (Antioquia), Colombia; a finales del siglo XVIII. Esta es una enfermedad del cacao devastadora causada por el basidiomyceto *Moniliophthora roreri* (Aime & Phillips-Mora, 2005), que se limitaba a 12 países cacaoteros de Centro y Sur América, como son Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela, Surinam; Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Guatemala, Belice y desde el 2008 se ha reportado que ha afectado plantaciones de cacao de México, a donde llegó introducida posiblemente desde Honduras. Hasta el 2012 sólo el Brasil no reporta la presencia de este patógeno afectando sus plantaciones; aunque por la manera en que se expande constituye una amenaza permanente para el cultivo de cacao no solo de nuestro país sino de todo el mundo.

El control químico de esta y otras enfermedades del cacao ha mostrado ser ineficiente y muy costoso para los pequeños agricultores(Chávez, León, Ruíz, Averos, & Peralta, 2007). Es por esta razón que las medidas de control están orientadas principalmente a evitar la diseminación de la enfermedad y a la implementación de buenas prácticas de cultivo como podas, drenajes, remoción de frutos enfermos, entre otros(Lozada, Herrera, Stashenko, & Escobar, 2012). Estas prácticas culturales también llegan a ser costosas con el tiempo, es por esta razón que se buscan alternativas mucho más prácticas, eficientes, aplicables y menos dañinas al ambiente.

En la naturaleza existe una gama muy amplia de plantas que producen una diversidad de metabolitos secundarios, tal característica les permite a estas plantas actuar como antagonistas de patógenos bióticos y plagas. Su potencial antagonista puede ser explotado al rotarlas o asociarlas con los cultivos o al incorporar sus residuos al suelo. Otra forma de aprovechar dicho antagonismo es mediante la preparación de extractos o infusiones a partir de sus tejidos(Zavaleta-Mejía, 2000)(García L. & Montes B., 1992).

Dentro la biodiversidad que tiene Bolivia existen un gran número de plantas de interés antifúngico; sin embargo las que destacamos en el presente trabajo son las siguientes:

El Paico (*Chenopodium ambrosioides*), es una hierba erecta, perenne o anual que puede alcanzar hasta 1 m de altura. Su tallo puede ser simple o ramificado en la base y con pubescencia glandular. Estudios previos de *Chenopodium ambrosioides* reportaron actividad antifúngica, antiaflatoxigénica frente a *Aspergillus flavus* (Kumar, Kumar, Dubey, & Tripathi, 2007), *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*(Prasad, Shukla, Kumar, & Dubey, 2009) *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum*, y *Fusarium semitectum*(Jardim, Jham, & Dhingra, 2008), *Candida albicans*(Tane, Vilarem, & Cerny, 2010) y actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*(Yasunaka et al., 2005)(Owolabi et al., 2009),ademas de *Helicobacter Pylori*-Antibiotico resistente(Wei, Yu, & Xue-zhi, 2013).

La Khoa (*Clinopodium bolivianum*) presenta tallos y ramas cuadrangulares de color marrón-canela. Hojas simples, de dos tamaños, con pequeños dientes al borde y puntos marrones en ambas caras. Flores blancas, en forma de pequeñas trompetas irregulares, saliendo de las axilas de las hojas, agrupadas en espigas tipo ramilletes. Frutos muy pequeños, ovals. De esta especie se han reportado actividad anti-*Helicobacter pylori*(Claros P. et al., 2007) y actividad antioxidante(Mamani, 2010), entre otros.

Y la Ruda (*Ruta graveolens*) que pertenece a la familia Rutaceae; es una hierba perenne de aproximadamente 30-60 cm, posee flores de color amarillo y se caracteriza por su olor fuerte y penetrante. Estudios previos de *Ruta graveolens* reportaron actividad antifúngica frente a *Colletotrichum spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*(Oliva et al., 2003)(Meepagala, Schrader, Wedge, & Duke, 2005), actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*(Rojas et al., 2011) y

Listeria monocytogenes(Alzoreky & Nakahara, 2003), además de actividad citotóxica(Wu et al., 2003)(Ivanova, Mikhova, & Najdenski, 2005).

Debido a todo lo anteriormente expuesto y a que en los últimos años la demanda en el mercado mundial de productos orgánicos va creciendo en tasas que llegan al 30% cada año(Diniz et al., 2006), este trabajo pretende evaluar el uso de extractos etanólicos de Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*) como alternativa para el control de *Moniliophthora spp.*

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de *Moniliophthora roreri* en Bolivia se presume se habría generado a finales del año 2011 con el ingreso al país de mazorcas de cacao contaminadas con monilia, procedente de Colombia, lo que provocó que se expanda en los municipios de Alto Beni y Palos Blancos, de la provincia Caranavi al norte del Departamento de la Paz (<http://www.la-razon.com>, 2012)

En julio de 2012, se realiza el primer reporte de la Frosty Pod Rot (FPR) o también llamada Moniliasis; en Alto Beni, departamento de La Paz, Bolivia, donde el 85% de la producción de cacao es realizada por aproximadamente 3.000 pequeños propietarios(Phillips-Mora, Baqueros, Melnick, & Bailey, 2015), En la actualidad las pérdidas pueden llegar a constituir hasta un 80% de la cosecha anual. Siendo que de cada tres frutos del cacao (denominados mazorcas) afectados por diversas enfermedades, dos mazorcas son lesionadas por moniliasis (<http://www.croplifela.org>, 2015).

Según datos del Instituto Boliviano de Comercio Exterior el valor de las exportaciones nacionales de cacao y sus derivados cayó en 69% en los últimos cinco años, de \$us 4 millones a 1,2 millones, mientras que el volumen vendido se redujo en 80%. El Ceibo, principal exportador chocolatero del país no pudo exportar en 2014 su chocolate debido a la escasez de materia prima ocasionada por la moniliasis, ya que la empresa solo acopió 5.000 de las 16.000 toneladas previstas para ese año(<http://www.la-razon.com>, 2015).

Ante esta situación alarmante, el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG) emite la resolución administrativa No 134/2012, que a través de la Jefatura Nacional de Sanidad declara emergencia fitosanitaria en la región de Alto Beni del Departamento de La Paz, con el objeto de evitar el riesgo de propagación de la plaga (<http://www.senasag.gob.bo>, 2012). A partir del año 2013 los productores de cacao inician acciones para el control de la moniliasis, entre las cuáles tenemos: regulación

de la sombra del cacaotal, la poda, cosecha previa de las mazorcas maduras cada dos semanas para no tener infecciones y destruir las mazorcas afectadas por moniliasis antes de que produzcan esporas entre otras(<http://www.apcbolivia.org>, 2013). Estas medidas son relativamente efectivas aunque presentan el inconveniente de ser costosas, con gran inversión de esfuerzo y tiempo.

La búsqueda de alternativas naturales para el control de la moniliasis que permitan obtener cultivos ecológicos u orgánicos, ha dado lugar a la utilización de biocontroladores y extractos naturales para mitigar el efecto de la moniliasis; sin embargo en nuestro medio no han sido reportados estudios del efecto de extractos naturales a partir de Paico, Ruda y Khoa, plantas promisorias para tal uso. Por lo que surge la pregunta, ¿existe la posibilidad de utilizar extractos naturales de Paico, Ruda y Khoa para reducir el impacto de la moniliasis en cultivos de cacao? Siendo que la utilización de extractos naturales es una medida tradicional que data desde tiempos inmemoriales que ha mostrado ser efectivo y resulta promisorio para el control fitosanitario, considerando que su implementación origina un bajo impacto ambiental y alta efectividad.

3. JUSTIFICACIÓN

El hongo *Moniliophthora roreri* presenta un aspecto pulverulento, esta característica le permite una mejor propagación, aprovechando condiciones ambientales tales como el viento, agua, etc., a esto se suma el hecho de que este hongo tarda mucho desde la penetración superficial de las hifas hasta el apareamiento de los primeros síntomas, transcurriendo aproximadamente de seis a diez semanas (Guayasamín & Aguilar, 2012), lo que lo hace difícil de identificar en sus etapas tempranas. Debido a todo lo anteriormente expuesto su control actualmente resulta muy difícil y a esto se suma que el número de alternativas efectivas disponibles para su manejo son escasas.

En la actualidad el método de control más recomendado para prevenir la enfermedad, es la práctica de recolección y destrucción de frutos enfermos, sin lograr ser esta una práctica de control altamente eficiente (Benítez, 2008). Otra de las alternativas planteada por los investigadores del germoplasma en Sapecho-Bolivia, consiste en la selección de plantas con cierto grado de tolerancia a monilia; propuesta estancada por falta de financiamiento (<http://www.eldiario.net>, 2015).

El control biológico con el Hongo *Trichoderma spp*, aunque ha sido muy estudiado, todavía no representa una alternativa efectiva para el control de la enfermedad (<http://www.croplifela.org>, 2015).

Por otra parte los productos agroquímicos a base de oxiclورو de cobre han demostrado reducir la incidencia de la enfermedad; sin embargo el uso de este tipo de agroquímicos no son considerados dentro de la producción ecológica (<http://www.fao.org>, 2015), por lo que su utilización pondría en riesgo las certificaciones y las exportaciones de productos orgánicos que según el Consejo Nacional de Producción Ecológica (CNAPE) solamente el año 2013, alcanzaron 150 mil toneladas, entre cacao, café, castaña

y quinua(<http://www.eldia.com.bo>, 2014). También es importante considerar que el empleo excesivo y prolongado de estos productos agroquímicos ha generado problemas ambientales, como contaminación de suelo y agua; bioacumulación en las cadenas alimenticias; efectos carcinogénicos, teratogénicos, mutagénicos e intoxicaciones(Zavaleta-Mejía, 2000).De los pocos estudios realizados en el país, el realizado por PLAGBOL en el Altiplano y los Yungas de La Paz el año 2002 muestra que de un grupo de agricultores, el 54% reportaron intoxicaciones agudas por plaguicidas y 41% representaron casos fatales(PLAGBOL,2002).

Por todo ello, son necesarias alternativas que permitan controlar o eliminar a estos agentes etiológicos, sin la necesidad de producir todos los daños anteriormente mencionados. Por esta razón el presente trabajo pretende evaluar los extractos de Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*) que por sus características podrían constituirse en alternativas para el control de *Moniliophthora spp.*

4. OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antifúngica de extractos etanólicos de Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*) frente a *Moniliophthora spp* aislada a partir de muestras de cacao con moniliasis, La Paz-Bolivia, 2015.

4.1. Objetivos específicos

- Aislar y Caracterizar el hongo fitopatógeno *Moniliophthora spp* a partir de muestras de Cacao infestadas, de la población de Sapecho del Departamento de La Paz.
- Obtener extractos etanólicos de (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*)
- Realizar la caracterización fitoquímica general de los extractos etanólicos de (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de Paico (*Chenopodium ambrosioides*) mediante la prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central durante 14 días frente a *Moniliophthora spp*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de Khoa (*Clinopodium bolivianum*) mediante la prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central durante 14 días frente a *Moniliophthora spp*.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de Ruda (*Ruta graveolens*) mediante la prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central durante 14 días frente a *Moniliophthora spp.*
- Evaluar la inhibición del crecimiento micelial producida por el extracto etanólico de Paico (*Chenopodium ambrosioides*) frente a *Moniliophthora spp* durante 21 días.
- Evaluar la inhibición del crecimiento micelial producida por el extracto etanólico de Khoa (*Clinopodium bolivianum*) frente a *Moniliophthora spp* durante 21 días.
- Evaluar la inhibición del crecimiento micelial producida por el extracto etanólico de Ruda (*Ruta graveolens*) frente a *Moniliophthora spp* durante 21 días.

5. MARCO TEORICO

5.1. Cacao

El cacao (*Theobroma cacao*), es una de las más importantes especies de bosques húmedos tropicales. Las semillas de cacao son la fuente del cacao comercial: chocolate y manteca de cacao (Kalvatchev, Garzaro, & Guerra, 1998). Se encuentra dentro de los principales artículos básicos de los países productores y productos exportados por países consumidores, con un valor total mundial de US\$2,5 billones en los últimos años. Casi desde el comienzo de la comercialización del cultivo, África ha sido considerado el mayor productor de cacao, seguido por Asia y Latinoamérica. África del este abastece 72% de la producción mundial y es considerada la región productora de cacao de mayor importancia en término de volúmenes (Donovan, 2006).

El cacao (*Theobroma cacao*) fue clasificado botánicamente por Carlos Linneo, es un árbol de 4-8 m de alto de la familia Esterculiácea, nativo de las regiones tropicales de América, con semillas que contienen una cantidad significativa de grasas (40-50%) y polifenoles (alrededor del 10% del peso del grano seco), está distribuido desde México

hasta el Amazonas en una gran diversidad de ambientes que ha propiciado una alta cantidad de tipos o cultivares, producto de procesos de domesticación y adaptación a condiciones climáticas muy particulares.

5.1.1 Características

Gonzalez Figueroa y Roble Orellana (2014) describen al cacao como un árbol que posee raíz principal y secundaria profunda, con una infinidad de raicillas o pelos absorbentes, que por lo general están entre 0-5 cm del suelo. Tiene dos tipos de tallos; el primero ortotrópico (de crecimiento recto, vertical), son las plantas que provienen de semillas o plantas francas (híbridos y segregantes de híbridos) y el segundo plagiotrópico (de crecimiento horizontal o lateral), son las plantas producidas por injerto.

Las hojas de cacao, poseen una estructura especial, llamada "pulvínulos" que son abultamientos entre la base de la hoja, la base del pecíolo y sirven para seguir la dirección del sol.

El fruto del cacao es una baya, llamada mazorca y puede ser de tres tipos: criollo, forastero y trinitario.

Los frutos de cacao maduran entre los 5 – 6 meses si son del tipo trinitario y de 6 - 7 meses si son del tipo criollo y forastero o amazónico.

Tienen diferentes tamaños, colores y formas según las variedades. Generalmente tienen un tamaño de 12 pulgadas de largo y 4 pulgadas de ancho y contienen entre 20 a 40 semillas. La pulpa puede ser blanca, rosada o café, olorosa y con sabor variado entre ácido y dulce.

Las semillas están dentro de las mazorcas y son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado. Están ubicadas en cinco hileras dentro del fruto.

5.2. Moniliasis del cacao

También es conocida con los nombres de “helada”, “pudrición acuosa de la mazorca” y “enfermedad de Quevedo”, es una de las enfermedades más destructivas del cacao (Phillips-Mora, 2003). Ha sido reportada como dos veces más destructiva que la causada por *Phytophthora spp.* (Desrosiers & Suarez, 1974), más dañina y difícil de controlar que la enfermedad escoba de bruja (*M. pernicioso*) (Aránzazu, 2000), debido a

que el primer síntoma de infección es a menudo la ocurrencia de lesiones con abundante esporulación externa que facilita su dispersión (Maddison, Macias, Moreira, Arias, & Neira, 1995). Algunos autores han advertido que a nivel de Latinoamérica *Moniliophthora roreri* estaría en una fase invasiva y se estaría dispersando de forma clonal (Gutarra, Silva, Márquez, & León, 2013).

La moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora (M. roreri)* en condiciones naturales ataca únicamente a los frutos en cualquier etapa de desarrollo, siendo los frutos de cero a tres meses de edad los más susceptibles (González, Báez, Hernández, Ulloa, & Zaragoza, 2011). Tiene su origen en Colombia, el cual se ha diseminado a países productores de cacao de Sur y Centroamérica, ha dejado a su paso el derribo y abandono de plantaciones, bajas considerables de la producción, aumento de costos de producción y baja rentabilidad del cultivo, empobrecimiento de los productores y deterioro ambiental (González, Báez, Hernández, Ulloa, & Martínez, 2011).



Figura 1. Mazorcas de cacao infestadas con *Moniliophthora roreri* (Evans, 2016)

5.3. *Moniliophthora roreri*

La primera detección del hongo *M. roreri*, fue en la región de Quevedo, Los Ríos, Ecuador por Rorer en 1915 (FHIA, 2003) (Najar & Thomas, 2001) (Rorer, 1918).

M. roreri posee micelio septado con doliporos típicos, las esporas provienen de un basidio modificado y se producen en cadenas con maduración basipétala y se desprenden fácilmente del micelio, con un pseudoestroma denso y carnoso sobre el cual el hongo produce los vestigios del píleo. Las esporas son multifuncionales, sirven no sólo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, la infección y la supervivencia. Éstas pueden ser globosas (60%), elípticas (30%) y subglobosas (10%) con un diámetro promedio de $7\mu\text{m} \times 10.5\mu\text{m}$, $7.5\mu\text{m} \times 11.6\mu\text{m}$ y de $6.3\mu\text{m} \times 9.3\mu\text{m}$ respectivamente, tienen dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared.

Las esporas viejas desarrollan paredes gruesas y se tornan oscuras, las cuales pueden marcar el inicio de la fase de dormancia. El tubo germinativo presenta en el extremo distal una estructura similar a un apresorio y la hifa infectiva. Este es único y en raras ocasiones dobles.

5.3.1. Características

Moniliophthora. roreri, crece lentamente sobre agar extracto de malta. Las colonias alcanzan un diámetro de 8-15 mm después de dos semanas, y muestran un borde levemente levantado. El crecimiento en forma de tapete de aspecto lanoso a fieltro, de color salmón pálido a rosa beige, finalmente se vuelve de color beige canela a arcilla, o localmente café lanoso a chabacano pálido. Ocasionalmente, el tapete es de inicio suave a farináceo, de color blanco a crema o con matices ocráceos. No produce olor.

En la zona avanzada, la hifa es hialina, de pared delgada, septada y algunas veces es levemente irregular con hinchamientos de 1.5- 5 micras de ancho. La hifa aérea es de dos tipos: a) como en la zona avanzada, pero con paredes levemente engrosadas, y b) hialina densa de color parduzco pálido, no septado de 1-1.5 y 2-3 micras de ancho y el esqueleto raramente ramificado (Evans, Stalpers, Samson, & Benny, 1978).

Los conidióforos ramificados dan lugar a cadenas maduras de conidios. Los conidios son fácilmente separables, de paredes gruesas, color amarillo pálido y de color café en masa, típicamente globosa a subglobosa, de 6.5-8.0 y de 15-25 micras de diámetro, algunas veces elipsoides de 8-20 x 5-14 micras, paredes arriba de dos micras de grosor. Los conidios cilíndricos de paredes delgadas también están presentes y probablemente se derivan a partir de cadenas inmaduras. Las hifas se sumergen como en la zona avanzada pero con hinchamientos más frecuentes. El hongo también crece y esporula bien sobre tallos leñosos esterilizados con pérdidas significantes de peso del sustrato; grumos de color crema compactos, de micelio estéril con gotitas de exudado amarillo que se forman frecuentemente y los parches rojo púrpura compuestos de hifas rojas pesadamente incrustadas que están presentes en los cultivos viejos. Las temperaturas de crecimiento óptimas son de 25 a 26°C y máximo 33°C (Evans, Stalpers, Samson, & Benny, 1978).

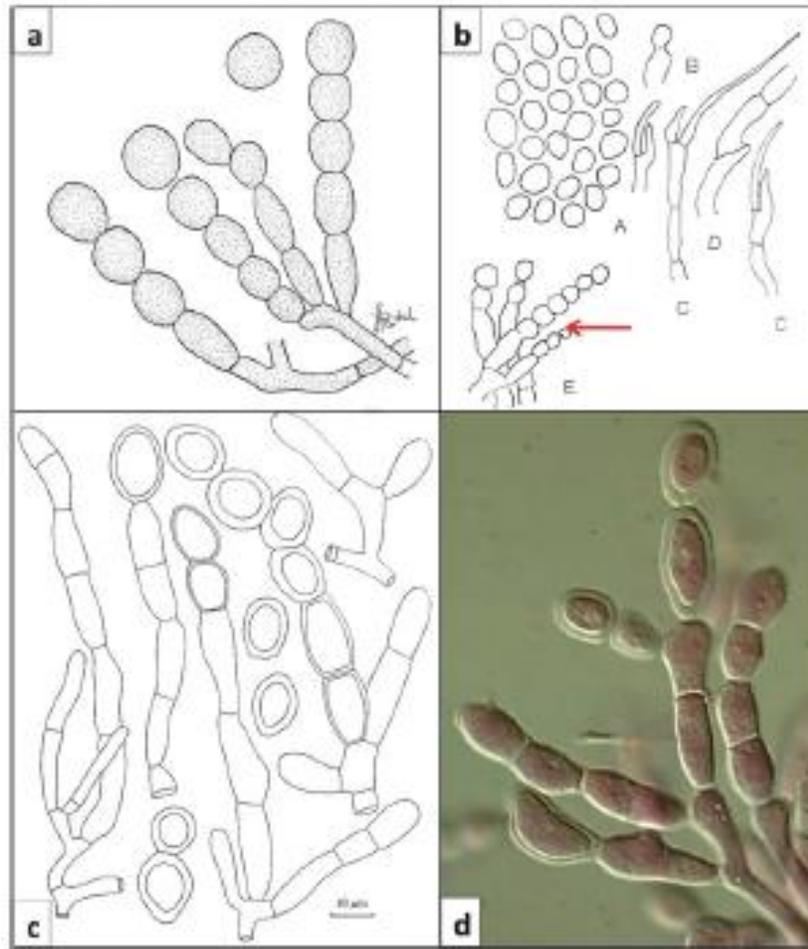


Figura 2. Esporogénesis en *Moniliophthora roreri* vista al microscopio. (a) Ilustración de (Rorer, 1918), (b) (Ciferri & Parodi, 1933), (c) (Evans, Stalpers, Samson, & Benny, 1978) y (d) esporas de *Moniliophthora roreri* vistas en el microscopio de contraste de fases (Evans, 1981).(Evans, 2016)

5.3.2. Taxonomía

El agente causal de la moniliasis fue identificado por Smith en 1918, como una especie del género *Monilia*. Ciferri y Parodi en 1933, revisaron la taxonomía del hongo y confirmaron la identificación temporal hecha por Smith, clasificando al hongo dentro de la clase Deuteromycetes, orden Hyphales, género *Monilia* y especie *roreri*. (Evans,

Stalpers, Samson, & Benny, 1978) observaron la presencia de características morfológicas típicas de los Basidiomicetes, por lo que propusieron su agrupación dentro de este grupo y crearon un nuevo nombre para denominar la especie: *Moniliophthora roreri* (Evans, Stalpers, Samson, & Benny, 1978).

La ausencia de estructuras sexuales en el hongo impidió una clasificación taxonómica más exhaustiva por casi 25 años. Usando técnicas moleculares, Phillips-Mora. (2003) confirmó que el hongo es un Basidiomicete y determinó que pertenece al orden de los Agaricales y probablemente a la familia Tricholomataceae. Además, también demostró que este hongo es muy cercano genéticamente a *Crinipellis pernicioso*, agente causal de la escoba de bruja. Evans, Holmes, Phillips y Wilkinson (2002) recientemente propusieron que el nombre *Moniliophthora roreri* debía ser cambiado a *Crinipellis roreri* (Evans, Holmes, Phillips, & Wilkinson, 2002); sin embargo, es necesario realizar algunos estudios complementarios para confirmar la validez de este cambio.

En la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), se encuentra disponible la clasificación taxonómica que se indica a continuación:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Moniliophthora roreri</i> .	
REINO:	Fungi
PHYLUM:	Basidiomycota
CLASE:	Agaricomycetes
SUBCLASE:	Agaricomycetidae
ORDEN:	Agaricales
FAMILIA:	Tricholomataceae
GENERO:	<i>Moniliophthora</i>
ESPECIE:	<i>roreri</i>

5.3.3. Ciclo de vida

Moniliophthora roreri es un patógeno hemibiotrófico (Griffith, Nicholson, Nenninger, Birch, & Hedger, 2003), debido a que posee una etapa biotrófica y una necrotrófica. Este inusual ciclo vital pleomórfico, hemibiotrófico que presenta *M. roreri*, también es observado en otro de los patógenos importantes del cacao: *M. perniciosa*. Evans (2002) propone que la fase reproductiva observada en *M. roreri* es sexual, y que este patógeno corresponde a un teleomorfo modificado. De acuerdo con estos autores, durante la esporogénesis y germinación ocurre la meiosis, la cual da lugar a la formación de hifas infectivas monocarióticas. La fase parasítica haploide se da sólo en el tejido vivo (biotrófico), en la que el hongo crece y se alimenta intercelularmente sin activar los mecanismos de defensa del hospedero. Una señal no identificada (asociada con la edad del fruto) estimula la transición a la fase diploide necrotrófica, la cual induce los síntomas internos y externos característicos de la moniliasis.

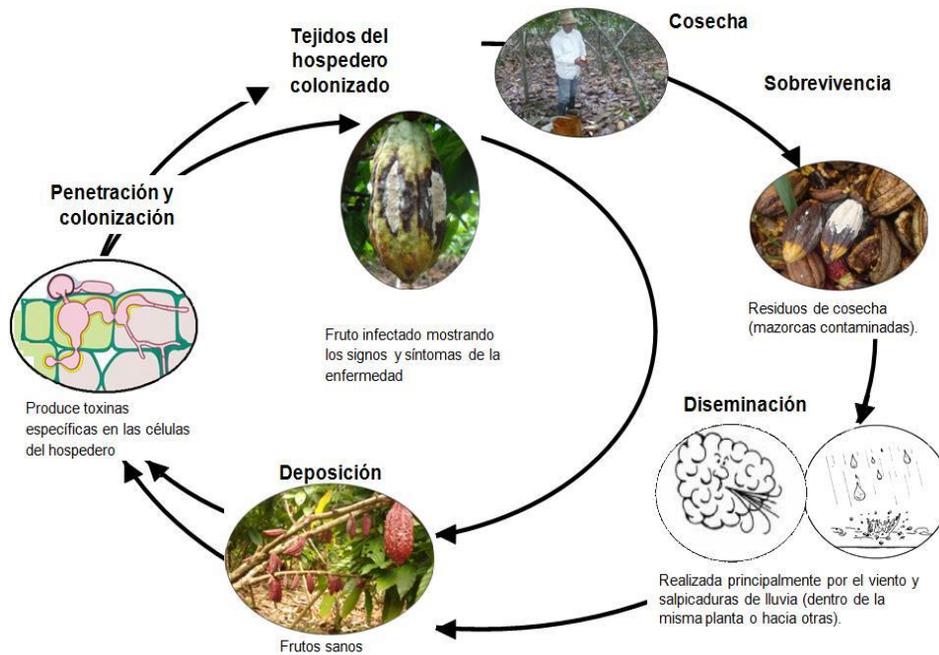


Figura 3.

Ciclo de vida de *Moniliophthora roreri*. (Sánchez & Fiallos, 2012)

5.3.4. Patogenicidad

El patógeno permanece en el estado de conidias, que son de forma globosas, subglobosas y elípticas (8-20 x 5-14 μm), en los frutos infectados que se encuentran adheridos a las plantas. Estas se dispersan principalmente por el viento (Solís Hidalgo & Suárez-Capello, 2001), germinan sobre la mazorca y penetran vía intercelular directamente a través de la epidermis, en cualquier edad de la mazorca; posteriormente el patógeno se torna intracelular, momento en el cual comienzan los síntomas de la enfermedad (Villavicencio & Jiménez, n.d.) (Evans, 1978).

En las plantaciones de cacao, el fruto es el único órgano infectado por *M. royeri*. La penetración y desarrollo del patógeno puede ocurrir en cualquier fase de su desarrollo, pero son más susceptibles en la etapa inicial (Enrique, Carvajal, Orlando, & Valbuena, 2012). Externamente, los síntomas aparecen como puntos aceitosos muy pequeños y circulares, los cuales, se convierten en manchas irregulares de color amarillo y marrón. El proceso desde la infección a la aparición de la mancha tiene una duración aproximada de 60 ± 10 días, dependiendo de la susceptibilidad del clon de cacao. Entre tres y cuatro días, se desarrolla el micelio blanco sobre las lesiones y luego aparecen las esporas, las cuales confieren un color crema a marrón (Jaimes & Aranzazu, 2010).

5.3.5. Síntomas de la enfermedad

El daño externo es caracterizado por una necrosis, deformación y pudrición en mazorcas, aunque algunos frutos de 60 y 80 días pueden completar su desarrollo sin síntomas externos, pero con el tejido interno necrosado. Esto conlleva a la muerte del fruto, con un color café oscuro, para luego cubrirse de una “felpa” de color crema, que son las esporas del hongo. El daño interno causado por la enfermedad puede ser más grave que el externo, pudiendo llegar a perderse casi todas las almendras, sin importar la edad del fruto (FHIA, 2003). Los tejidos centrales, pulpa, semillas y algunas veces la cáscara, forman una sola masa en donde los tejidos son rodeados por una sustancia acuosa debido a la descomposición de ellos, siendo también las almendras destruidas parcial o completamente, dependiendo del tiempo de infestación de los frutos.

En los frutos menores de dos meses, la infección aparece primero como pequeños abultamientos o gibas (protuberancias) en la superficie de la mazorca, incluso esa área se descolora (se vuelve más clara); después que emerge esa giba, se presenta una mancha café (chocolate) que se va extendiendo (el fruto muere poco después), empezando a aparecer una felpa blanca correspondiendo al micelio del hongo (filamentos vegetativos), para luego de tres a siete días, sobre el micelio blanquecino emerger las esporas del tipo conidio de color crema (FHIA, 2003). Un síntoma adicional es la llamada madurez prematura, donde las mazorcas cambian de color dando la apariencia de madurez en frutos que todavía están inmaduros. Hasta 10 semanas de edad los frutos pequeños son susceptibles.

5.3.6. Métodos de control

5.3.6.1. Control cultural

Este control trata básicamente de evitar la entrada del patógeno en el área, y si está presente, impedir que encuentre las condiciones favorables de infección, multiplicación y diseminación. Evitar el excesivo crecimiento del árbol de cacao, ya que el autosombramiento reduce su actividad fotosintética, creando un microclima interno que estimula la infección y el desarrollo de la enfermedad en los frutos (Sánchez & Fiallos, 2012).

La remoción de frutos enfermos también es parte del control cultural de la moniliasis, pero se aplica con frecuencias y niveles muy variables (Krauss et al., 2003). La poda frecuente, regulación del estrato superior, buen drenaje, densidades apropiadas, buen control de malezas y correcto programa de fertilización, ayudan al óptimo desarrollo del árbol de cacao, pues hace que los patógenos que ingresen a las plantaciones tengan pocas probabilidades de establecerse y posteriormente desarrollarse.

5.3.6.2. Control químico

En el control de la Moniliasis tradicionalmente se han empleado productos protectantes enriquecidos con sulfato de cobre, los cuales han mostrado una eficiencia limitada, aunque mostrando una reducción en la incidencia de la enfermedad (Jaimes & Aranzazu, 2000). Estos productos deben ser aplicados en cultivos con alta densidad, semanalmente durante 3 meses e iniciando en los picos más altos de floración. Por otro lado, los fungicidas sistémicos pueden mejorar la eficiencia en el control de *M. royeri*, pero incrementan los costos de producción.

5.3.6.3. Control biológico

La desventaja de este tipo de control es que debe ser utilizado conjuntamente con otros métodos. Se basa en la implementación de organismos vivos (microorganismos) como herramienta base en la erradicación o reducción del inóculo de un patógeno. Se emplean organismos antagonistas nativos para la inhibición del crecimiento del patógeno; en los últimos años se ha demostrado el gran potencial de hongos y bacterias endófitos para el control de la moniliasis. Los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (Villamil Carvajal & Blanco Valbuena, 2012).

5.3.6.4. Control genético

El control de enfermedades fúngicas utilizando clones resistentes es, sin duda, la alternativa más atractiva para los agricultores ya que por este método se reducen drásticamente los costos de producción y se favorece el medio ambiente. No obstante hasta la fecha se han desarrollado muy pocos genotipos altamente resistentes a las infecciones, lo que indica que gran parte de la población vegetal actual contiene genotipos débiles, altamente vulnerables a infecciones por patógenos (Johnson, Bonilla, & Agüero, 2008).

A pesar de tener todas las opciones anteriormente mencionadas para el control de *Moniliophthora royeri*, los esfuerzos parecen insuficientes ya que desafortunadamente, el

cacao enfrenta una crisis debida a factores ambientales, tecnológicos, económicos y sociales, que se ven agravados por estos problemas fitosanitarios llegando a destruir plantaciones enteras y obligando a los productores a abandonar este cultivo.

5.4. El uso de plantas para el control de fitopatógenos

Las plantas medicinales desempeñan una importante función en la medicina, y a través de los años el hombre ha dependido de ellas para el tratamiento de sus enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80 % de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud, y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos.

Las plagas y enfermedades constituyen la principal limitante de la producción agrícola. Su control se ha basado, en el uso de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales han producido, como efecto secundario, problemas en la salud humana, desequilibrio ambiental, surgimiento de plagas, enfermedades más agresivas y resistentes, etc. Existe referencia de una alta incidencia de enfermedades, cuadros clínicos por intoxicación, así también se detectan elevados niveles de pesticidas en cosechas y personas a raíz del uso indiscriminado de estos productos químicos; es por esta razón que actualmente se buscan alternativas mucho menos agresivas tanto para el ser humano como para el medio ambiente.

Antes de que el hombre jugara un rol activo en proteger las plantas mediante el uso de estos productos químicos sintéticos, estas han sido capaces de protegerse de algunas plagas por sí mismas (Wilson, Ghaouth, & Wisniewski, 1999) mediante la síntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios que se relacionan con sus mecanismos de defensa (Njurka, Lauzardo, Baños, & Velázquez, 2007). Tal característica les permite a estas plantas actuar como antagonistas de patógenos bióticos y plagas.

Sus mecanismos de defensa son complejos, variados y dinámicos resultado de un largo proceso evolutivo. Las plantas resisten al ataque de patógenos mediante diferentes estrategias de defensa que pueden ser constitutivas (histológicas o químicas) o defensas inducidas por factores externos (Verpoorte, 2000).

De acuerdo a Grayer & Harborne (1994), los antifúngicos constitutivos pertenecen a todas las principales clases de compuestos secundarios: terpenoides, iridoides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminos, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos, bibenzilos, xantonas y benzoquinonas). Dentro de las fitoalexinas se encuentran lactonas sesquiterpénicas, pterocarpanos, cumarinas, indoles, bibenzilos, derivados del ácido antranílico, estilbenos, flavanonas, diterpenos, antocianidinas, cromonas, isoflavonas, isoflavonoides, alcaloides, fenoles, antraquinonas, fenilpropanoides y sesquiterpenos. No existe una división estricta desde el punto de vista químico entre los metabolitos constitutivos y fitoalexinas (Montes-belmont, 1995).

Su uso para control de fitopatógenos puede ser mediante el aprovechamiento del potencial antagonista, que se puede explotar al rotarlas, asociarlas con los cultivos o al incorporar sus residuos al suelo, además de la preparación de extractos o infusiones a partir de sus tejidos.

5.5. PAICO (*Chenopodium ambrosioides*)

5.5.1. Generalidades

Chenopodium ambrosioides L., es una planta que originalmente crece en América tropical y se distribuye ampliamente a todo lo largo de las zona templadas a las áreas tropicales alrededor del mundo (Song et al., 2015), es conocida en Bolivia como paico, payco, yuraj payco, paicu, care (Vidaurre de La Riva, 2006), en México como epazote o hierba del zorrillo, epazote en Argentina y Perú, Hierva de Santa María, mastruz en Brazil, ‘worm grass’, ‘Mexican tea’, ‘fit weed’, en Estados Unidos, aritasou, en Japón; simé kontwá, patois en República Dominicana (Nascimento et al., 2006) (Kiuchi et al., 2002).

5.5.2. Clasificación taxonómica y descripción morfológica

Según Borja Barragán y Chimbo Rochina (2013), la clasificación taxonómica que corresponde al *Chenopodium ambrosioides* es la siguiente:

REINO:	Plantae
FILO:	Angiospermae
CLASE:	Dicotyledoneae
ORDEN:	Caryophyllales
FAMILIA:	Chenopodiaceae
GÉNERO:	<i>Chenopodium</i>
ESPECIE:	<i>ambrosioides</i>

El paico es una planta aromática, perenne, más o menos pubescente, con el tallo usualmente postrado, olor fuerte, de aproximadamente 40 cm de altura; las hojas son oblongo-lanceoladas y serradas, de entre 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, con pequeñas

flores verdes en panículos terminales densos, cada uno con cinco sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto, y las semillas son negras y no mayores a 0,8 mm de longitud (Gadano, Gurni, López, Ferraro, & Carballo, 2002)(Jamali et al., 2006)(Gómez Castellanos, 2008).

5.5.3.Composición

La composición química del Paico (*Chenopodium ambrosioides*) varía de acuerdo con la región donde la planta es recolectada, la maduración de la planta y el método de extracción, siendo los principales componentes el (Z)-ascaridol, (E)- ascaridol, carvacrol, p-cimeno y a-terpineno(Oliveira et al., 2015).

Entre otros compuestos identificados en extractos metanólicos e infusiones están; ácido ascórbico, cítrico, fumárico, málico, oxálico y quínico; compuestos fenólicos como ácido p-cumárico, ácido ferúlico, isorahmetina, luteolina, kaempferol, quercetina y tocoferoles(Barros et al., 2013). Además el *Chenopodium ambrosioides* posee un gran número de compuestos terpénicos presentes en los aceites esenciales (Harraz et al., 2015) que se encuentran en estructuras filamentosas glandulares llamadas tricomas (Santiago et al., 2016).

5.5.4. Actividad biológica

Algunas acciones biológicas de esta planta han estado científicamente demostradas, especialmente por el uso de extractos de sus hojas. Una parte de estos estudios están implicados en la modulación de las respuestas inmunes e inflamatorias(Song et al., 2015)(Calado et al., 2015). Además varios artículos académicos le atribuyen actividad antioxidante (Ajaib, Hussain, Farooq, & Ashiq, 2016) y el percolado de la planta completa presenta actividad anti-osteoporotica (Soares et al., 2015) evitando el desgaste de los huesos.

Debido a la composición química del aceite esencial; se destaca que este posee una gran actividad insecticida, reportándose actividad contra *Blattella germánica* (Zhu, Zhao, Chu, & Liu, 2012), *Plutella xylostella* (Wei et al., 2015), el extracto hidroalcohólico de la parte aérea presenta actividad ovicida frente a garrapatas *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (Almança et al., 2013).

Actividad antiparasitaria frente a *Ascaridia sp*, aunque con un bajo control de oocistos de *Eimeria sp* (Vita et al., 2015), el extracto metanólico reduce el número de larvas de *Schistosoma mansoni* después de 7 semanas de tratamiento en ratones (El-Emam, Mahmoud, & Bayaomy, 2015).

Aunque algunos autores como Rosato et al (2007) indican que esta planta tiene una actividad antimicrobiana limitada, han propuesto investigar una interacción de sinergismo entre productos de bioactivos de la planta y algunos agentes antimicrobianos (Hemaiswarya, Kruthiventi, & Doble, 2008).

El aceite esencial de *C. ambrosioides* (EOCA) es conocido para inhibir el crecimiento de dermatofitos (Kishore N, Chansouria JPN, 1999) y otros hongos filamentosos como *Fusarium*, *Colletotrichum* (Jardim, Jham, Dhingra, & Freire, 2008), según Shah (2014), los extractos crudos de tallos de paico presentan actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Trycophyton horzianum*, *Rhizopus tolenapur* y *Aspergillus flavus*.

En el artículo publicado por Cysne et al. (2016) se indica que el extracto crudo hidroalcohólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* tuvo un fuerte efecto antiplasmodial frente a *Plasmodium falciparum* tanto in vivo como los modelos experimentales in vivo, también se han descrito actividad antileishmanicida en contra de promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* (Monzote et al., 2014).

Sanchez Aspajo, S. y Curitima Ahuanari, E. (2016) indican que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* es poco activo frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el método de macrodilución.

5.5.5. Usos

Comenzando el siglo XVIII, fue producido como un medicamento antihelmíntico y en el siglo XIX, el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* se destilaba como un potente antihelmíntico con fines comerciales, siendo utilizado durante muchos años en el Reino Unido y los Estados Unidos de Norteamérica. Posteriormente, el uso del aceite esencial disminuyó, permaneciendo restringido a la población rural (MacDonald et al., 2004). La principal forma de utilización de esta planta por la población es como un extracto acuoso, decocción o infusión (Gadano, Gurni, & Carballo, 2006).

En la medicina tradicional en Bolivia las hojas de Paico se utilizan para el alivio de los cólicos estomacales (se toma como infusión después de las comidas), resfríos, espasmos, hemorroides, pulmonías, gastritis, dismenorrea, inflamaciones de las vías urinarias, y sirve como antitusígeno. También como antihelmíntico, purgante, diurético, hepatoprotector, antiinflamatorio, antiemético, antiséptico, digestivo, antirreumático y antiartrítico. El ascaridol es uno de sus principales componentes, responsable de su aroma y de sus propiedades parasiticidas.

En la década del 60 fue abolida la distribución comercial del aceite debido a muertes derivadas del consumo del aceite esencial, probablemente debido a sobredosis en la mayoría de los casos. Los principales síntomas de la intoxicación con el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* son gastroenteritis y alteraciones del sistema nervioso central (dolor de cabeza, pérdida de la visión, incoordinación)

5.6. KHOA (*Clinopodium bolivianum*)

5.6.1. Generalidades

El *Clinopodium bolivianum* se encuentra ampliamente distribuido sobre áreas extensas en lugares pedregosos, montes bajos subpuna y puna desde 3200 m.s.n.m. hasta alrededor de 4500 m.s.n.m. a lo largo del borde este del altiplano sureño del Perú al sur boliviano, es conocido como “khoa”, “k’oa”, “cjuñuca”, “cjuñu muña”, “pampa muña”, “chulpa muña” u “orégano de los incas”, y pertenece a la Familia Lamiaceae (Teodoro, 2003), (Mamani, 2010).

5.6.2. Clasificación taxonómica y descripción morfológica

Takhtajan (1980) indica que la ubicación taxonómica de la khoa es la siguiente:

<i>Tabla 3. Clasificación taxonómica de Clinopodium bolivianum</i>	
DIVISIÓN :	Magnoliophyta
CLASE :	Magnoliopsida
SUBCLASE :	Asteridae
ORDEN :	Verbenales
FAMILIA :	Lamiaceae
GENERO :	Minthostachys (Benth.) Spach
ESPECIE :	<i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze

La khoa es un arbusto que pertenece a la familia Lamiaceae (Harley & Paucar, 2000), muy aromático bifurcado con ramas erectas o ascendientes de 0.5 – 2m de alto. Las hojas opuestas, cortamente pecioladas (1-1.5 mm.); láminas abovadas a elípticas, sub-obtusas, bordes enteros o aserrados, 1-2 cm de largo (Wood, 2011); flores blanquecinas, subsésiles, solitarias o en fascículos axilares; cáliz tubuloso, lóbulos deltoides, corola tubular, bilabiada, internamente pubescente; estambres didínamos, epipétalos; frutos

tetraquenos, de 1 – 5 mm de largo con una espícula pubescente en la parte superior (Macbride, 1960)(Ryding, 2010).

5.6.3.Composición

Las hojas de Khoa son una fuente rica en compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos mayoritarios corresponden a la familia de flavanonas(chirinos2011), aunque también indica la presencia de los ácidos oleanólico, ursólico y rosmarínico (Calsino, Quispe, Quispe, Huamán, & Rodríguez, 2016).

5.6.4.Actividad biológica

Dentro de la revisión bibliográfica de esta planta se puede evidenciar que existen un gran número de artículos científicos que caracterizan a los extractos del *Clinopodium bolivianum* como fuertemente antioxidantes (Chirinos, Pedreschi, Rogez, Larondelle, & Campos, 2013), esto debido a sus componentes mayoritarios provenientes del metabolismo secundario; principalmente compuestos fenólicos. Estos compuestos son principalmente flavononas y flavonas (Chirinos, Huamán, Betalleluz-Pallardel, Pedreschi, & Campos, 2011). También se ha descrito en la literatura científica que las hojas de khoa poseen actividad anti-*Helicobacter pylori*(Claros et al., 2007)

5.6.5.Usos

Según un estudio recientemente publicado por Justo-Chipana et al. (2015),el *Clinopodium bolivianum* también conocido como muña o k'oa, es una de las especies con mayor valor de uso en las ciudades de La Paz y el Alto; principalmente en la artritis, várices, sobrepeso, dolor de cabeza, dolores estomacales(Bussmann, Paniagua Zambrana, Moya Huanca, & Hart, 2016) y fiebre entre otros.

La khoa ha sido empleada milenariamente por nuestros antepasados, siendo múltiples los usos que se le atribuye (Mamani, 2010) (Teodoro, 2003), así se tiene que por vía externa es utilizada en forma de emplastos contra las neuralgias en fricciones, para ello la maceración de la planta se hace en alcohol, las hojas se utilizan en infusiones para tratar la indigestión, náuseas, diarrea, anemia y enfermedades respiratorias (Agapito y Sung, 2002), además de su uso como un antiulceroso debido a su actividad anti-*Helicobacter pylori* (Claros et al., 2007) (Regalado Veloz, Sánchez Perera, & Dorvigny, 2012). Las flores y hojas han sido utilizadas como condimentos en carnes, sopas y estofados (Brack, 1999).

5.7. RUDA (*Ruta graveolens*)

5.7.1. Generalidades

La *Ruta graveolens* es oriunda del Mediterráneo (África del norte y sur de Europa) y del Asia menor. Actualmente está naturalizada y cultivada en diversas partes del mundo. En América se la encuentra en Canadá, Estados Unidos, México, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Chile (Maita Vásquez & Guerra Davila, 2015).

Crece de manera espontánea en lugares pedregosos, matorrales, suelos secos, o cerca de huertos; comúnmente llamada ruda es una especie de la familia Rutaceae (Ruiz Ortiz, 2013). Se suele cultivar como planta ornamental, hierba medicinal y condimento.

5.7.2. Clasificación taxonómica y descripción morfológica

Según Borja Barragán y Chimbo Rochina (2013), la clasificación taxonómica que corresponde a la *Ruta graveolens* es la siguiente:

<i>Tabla 4. Clasificación taxonómica de Ruta graveolens.</i>	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Rutaceae
Subfamilia:	Rutoideae
Género:	Ruta
Especie:	Ruta graveolens L.

Arbusto muy ramificado que puede vivir varios años, debido a esta longevidad el tallo puede volverse leñoso. Alcanza alturas de entre 70 a 100 cm. Las hojas semi-perennes, de color verde glauco, son alternas compuestas por varios segmentos de los cuales los laterales son alargados y el terminal ovalado o blanquecino, de consistencia algo carnosa. Las flores, forman ramilletes y tienen entre cuatro y cinco pétalos, siendo de un color amarillo vivo. El fruto es una especie de cápsula con cinco lóbulos. La planta entera tiene un aroma característico difícil de confundir con otros. El sabor de las hojas es ligeramente picante pero éste queda enmascarado por el intenso aroma que despide.

5.7.3. Composición

Las especies del género *Ruta* se caracterizan por contener una diversidad de metabolitos secundarios (Preethi, Kuttan, & Kuttan, 2006), según lo descrito por Ruiz Ortiz (2013) *Ruta graveolens* contiene un gran número de metabolitos secundarios,

concentrados principalmente en las hojas (especialmente antes de floración), entre los que se destacan:

- Los glucósidos, como rutina, un flavonoide.
- Los alcaloides (quinolonas): coquisagenine y skimmianine graveoline.
- Furocoumarins (psoralenos): bergaptene (3-metoxipsoraleno) y xantotoxine (8-metoxipsoraleno).
- Los aceites esenciales: metil-nonil-cetona, metil-n-octil-cetona y heptil-metil-cetona.
- Alcoholes: metil-etil-carbinol, pineno, limenenes.
- Otros compuestos son: dictamine, gammafagarine, skimmianine, pteleine y kokusaginine.
- Aceite esencial (0,1 %) de composición compleja.
- Alcoholes: 2-undecanol (1,5 %).
- Cetonas alifáticas: 2-nonanona (35 %), 2-decanona, 2-undecanona (2,5 %), heptanona, 2-octanona.
- Esteres.
- Cumarinas.
- Fotocumarinas.
- Monoterpenos

Los aceites esenciales provenientes de *Ruta graveolens*, tienen una composición química que varía de acuerdo al órgano o parte de la planta de que se extrae. En el aceite de la raíz se han identificado los monoterpenos, sesquiterpenos (Saldaña Medina & Torres Vintimilla, 2012), componentes fenólicos, además de antraceno y pireno. En las hojas se han detectado monoterpenos, flavonoides, cumarinas, alcaloides y en las ramas principalmente monoterpenos y sesquiterpenos (Ruiz Ortiz, 2013).

En el extracto de acetato de etilo de las hojas de *Ruta graveolens* identificado dos furanocoumarinas, una quinolina alcaloide y cuatro quinolonas alcaloides. Los extractos de cloroformo de la raíz, el tallo y la hoja, muestra el aislamiento de la furanocoumarina chalepensina (Nagarjuna & Jabbar, 2016).

5.7.4. Actividad biológica

A la Ruda se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, sudoríficas, rubefacientes, antiparasitarias, hipotensoras, sedantes, alelopáticas, citotóxicas, antisépticas, emenagogas, venotónicas y vasoprotectoras (Montes, 2001). Además que está aprobada por la FDA (Food Drug Administration) para su uso como condimento.

En la bibliografía se menciona que posee actividad anti-inflamatoria (Raghav, Gupta, Agrawal, Goswami, & Das, 2006), antihipertensiva (Chiu & Fung, 1997), antitumoral (Preethi et al., 2006), además Saldaña Medina & Torres Vintimilla (2012), indica que conos nasales elaborados a partir de aceite esencial de *Ruta graveolens* (Ruda) al 2.5%, demostró ser efectivo contra la cefalea post ingesta de alcohol.

La base de conocimientos etnobotánicos indica que *Ruta graveolens* tiene actividad antimicrobiana potente (Anna Oliva et al., 2003), en el trabajo publicado por Ivanova et al. (2005) se demuestra una buena actividad antimicrobiana del extracto metanólico de Ruda frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocitogenes* y *Bacillus subtilis*, sin embargo también indica que no presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias gram negativas; Quintana y Lenín (2015) obtuvieron que extractos acuosos *Ruta graveolens* a concentraciones de 25% y 50%, presentaron inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Romero et al. (2015) sugiere al extracto etanólico de Ruda para el manejo integrado de mosca blanca y Meepagala et al (2005) lo identifica como un potente alguicida.

A altas concentraciones sin embargo puede llegar a producir un efecto toxicológico marcado tal como lo indica Forsatkar et al (2016) en su estudio sobre el efecto del extracto etanólico de ruda en el comportamiento y la agresividad del pez *Betta splendens*, conjuntamente con alteraciones asociadas en la histología testicular.

5.7.5.Usos

Esta planta es utilizada en casos de dismenorreas (sólo en dosis altas es abortiva), para reducir los síntomas menopaúsicos, en casos de anginas, tonsilitis, pleuresía, complicaciones respiratorias, calambres(Montes, 2001). La esencia es utilizada como antiespasmódico, digestiva, anticonvulsivante, antiparasitario, trastornos circulatorios, arteriosclerosis: neuralgias, nerviosismo, histeria; debilidad visual, inflamaciones, trastornos de la diuresis y gota.

La ruda es una planta con gran contenido de vitamina C y por esta razón se considera antiescorbútica, si bien no es tan apropiada como la del limón. Se suele emplear en infusión como emenagoga, es decir para provocar o para detener la menstruación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Muestras biológicas.

Se utilizó la parte aérea (Tallo y Hojas) de Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) a partir plantas obtenidas de la población de Huatajata y Ruda (*Ruta graveolens*) que fueron recolectadas del municipio de Achocalla.

El hongo *Moniliophthora spp* fue aislado a partir de mazorcas de cacao infestadas, obtenidas en la población de Sapecho.

6.2. Equipos.

- Balanza analítica Modelo BP – 210S Sartorius, industria Japonesa.
- Autoclave ALL AMERICAN.
- Estufa Modelo Venticell, GERMANI.
- Rotaevaporador.

6.3. Material fungible

- Algodón
- Papel Filtro.
- Tubos.
- Tips.
- Micropipetas
- Cajas Petri.
- Asa bacteriológica.
- Pinza anatómica.
- Cámara de Neubauer

6.4. Reactivos.

- Agar Papa Dextrosa
- Agar V8
- Sulfato de bario.(p.a.)
- Ácido sulfúrico.(p.a.)
- Solución Fisiológica (NaCl 0.9%).

- Agua Destilada.
- Cloranfenicol (25 mg/mL)

7. METODOLOGÍA

7.1. Diseño Metodológico

- La evaluación de la actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central se realizó en 4 bloques por triplicado (control negativo, 3 extractos). Cada bloque estuvo formado por cinco niveles que corresponden a las diluciones seriadas descritas en la sección 7.7.
- La determinación de la inhibición de crecimiento micelial fue realizada en 4 bloques por triplicado (control negativo, 3 extractos), donde cada bloque estará formado por cinco niveles que corresponden a las diluciones seriadas descritas en la sección 7.8.

7.2. Recolección de las plantas

Las muestras de Ruda (*Ruta graveolens*) fueron recolectadas del municipio de Achocalla ubicado a 15 km de la ciudad de La Paz, y situada a 3.750 metros sobre el nivel del mar.

El Paico (*Chenopodium ambrosioides*) y la Khoa (*Clinopodium bolivianum*) fueron recolectados de la población de Huatajata ubicado a 80 Km. de la ciudad de La Paz y situada a 3.800 metros sobre el nivel del mar.

7.3. Obtención de los extractos

Los extractos fueron obtenidos en el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales (UMSA), donde se procesados de la siguiente manera:

- Se realizó la recolección de la parte aérea de las tres especies vegetales; Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*), para posteriormente ser secadas en oscuridad, molidas, pesadas y maceradas en etanol durante 48 horas.
- Luego se procedió a filtrar el macerado y posteriormente rotaevaporarlo para eliminar los residuos de etanol.

7.4. Caracterización fitoquímica de los extractos vegetales.

La determinación de los componentes mayoritarios de las especies vegetales en estudio fueron realizadas según (Sharapin, 2000):

7.4.1. Ensayo de Mayer

Permite reconocer la presencia de alcaloides, se pesó 0.5 gramos de la muestra seca en un tubo de ensayo, se diluyó con agua destilada y se le agregó 5 mL del reactivo de Mayer.

El reactivo de Mayer se preparó disolviendo 1.3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 ml.

Los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol.

7.4.2. Ensayo de Dragendorff

Permite reconocer la presencia de alcaloides, se disolvió el extracto en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Luego se calentó suavemente y se deja enfriar hasta acidez. Con la solución ácida se realizó el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y valorando de acuerdo a:

La opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

7.4.3. Ensayo de Fehling

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores.

Se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo redisolver en 1-2 mL de agua. A este residuo se adicionó 2 mL del reactivo y se calentó en baño de agua durante 5 a 10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

El reactivo se preparará de la siguiente forma:

- **Solución A:** Se pesó 35 g de sulfato cúprico pentahidratado cristalizado y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000 mL.
- **Solución B:** Se pesó 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disolvieron con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

7.4.4. Ensayo de la Espuma

Permite reconocer en una muestra la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. Se diluyo la muestra con 5 veces su volumen en agua, luego agitó la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

7.4.5. Ensayo de Kedde

Permite reconocer el grupo cardenolido de los glucósidos cardiotónicos.

Se mezclaron cantidades iguales de las soluciones A y B del reactivo y se añadió una punta de espátula de la muestra a ensayar.

Los cardenólidos y sus agliconas dan color azulado, rosa hasta violeta. El reactivo de Kedde tiene la siguiente composición:

Solución A: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2 % en metanol.

Solución B: KOH al 5,7 % en agua.

7.4.6. Ensayo de Bajlet

A 2 o 3 mL del extracto etanólico se le adicionan 3 o 4 gotas de reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura. El reactivo de Bajlet tiene la siguiente composición:

Solución A; 1 g de ácido pícrico de afora con 100 mL de etanol.

Solución B; 10 g de hidróxido de sodio se afora a 100 mL con agua.

7.4.7. Ensayo de Keller-Killiani

Se colocó en un tubo de ensayo aproximadamente 1 mg de extracto y disolvió en 2 ml de reactivo de keller, luego se agregó por las paredes del tubo 2 ml de reactivo de Killiani.

En la zona de contacto de los dos líquidos se produce un anillo que se colorea de color rojo pardo.

7.4.8. Ensayo de Lieberman-Burchard

Permite reconocer en una muestra la presencia de triterpenos y/o esteroides, ambos tipos de productos deben poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1 mL de cloroformo. Posteriormente se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejó resbalar 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Los resultados se valoraron de acuerdo al rápido cambio de coloración:

- 1) Rosado-azul muy rápido.
- 2) Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3) Verde oscuro-negro-final de la reacción.

La reacción de Lieberman-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas

coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

7.4.9. Ensayo del Cloruro Férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

7.4.10. Ensayo de Acetato de Plomo

El acetato de plomo normal da con todos los extractos tánicos un precipitado. El filtrado de estos precipitados da con la mayoría de los taninos color amarillo cuando se añade hidróxido de sodio.

7.4.11. Ensayo de Shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides en una muestra. La alícuota de la muestra alcohólica (extracto alcohólico) se diluyó con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos para añadir 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se dejan reposar hasta su separación.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

7.5. Recolección de agente patógeno *Moniliophthora spp*

El muestreo de mazorcas de cacao que presentan características típicas de Moniliasis se realizó en la población de Sapecho que está ubicado en la provincia de Sud Yungas en el municipio de Palos Blancos cerca del Río Beni, a una altura de 414 m.s.n.m.

Una vez identificadas las muestras se procedió a cortarlas y depositarlas en papel Karft debidamente etiquetados, para luego ser transportados en un recipiente de plastoform herméticamente cerrado al laboratorio.

7.6. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora spp*

La realización de este y todos los procedimientos que se realizaron bajo las recomendaciones que realiza la OMS en su publicación (Organización Mundial De La Salud, 2005) para agentes biológicos de nivel de contención biológica 2. Todas las técnicas de manipulación de muestras y cultivos de *Moniliophthora spp* se realizaron en cabinas de seguridad biológica de tipo 2.

Para el aislamiento se procedió a cortar pequeños trozos de tejido epidérmico de las mazorcas infestadas; estos trozos tenían una porción sana y otra infestada, las mismas muestras fueron sometidas a diferentes protocolos de desinfección con etanol al 70 % por 30, 60, 90 y 120 segundos; así como también con hipoclorito al 5% en los mismos tiempos. Posteriormente fueron enjuagados con agua destilada estéril y secados a temperatura ambiente con papel secante (Agrios, 2010).

Una vez secos estos trozos fueron sembrados en PDA (Agar Papa Dextrosa) suplementado con Cloranfenicol a una concentración de 25 mg/mL, para la inhibición del crecimiento bacteriano.

Luego de observar en los medios de cultivo, el crecimiento de micelio con las características de *Moniliophthora spp.*, se realizaron resiembras mediante sacabocados de 10 mm del borde del micelio hasta obtener cultivos puros.

La identificación se realizó mediante la observación de características macroscópicas, microscópicas, tamaño y forma de conidias; ya que como indica Evans (2016), no es posible llevar a cabo los postulados de Koch o es muy cuestionable.

7.7. Evaluación de la actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central

El protocolo que se describe a continuación fue tomado del trabajo de Cano et al. (2008)

- Se preparó el medio de PDA y se mantuvo en baño María a 45 °C, luego se inoculó una solución homogenizada del hongo *Moniliophthora roreri* en agua destilada estéril equivalente al patrón No. 9 de la escala Mc Farlan, se mezcló bien y se vertieron en cajas Petri de 10 cm, 20 mL por placa.
- Una vez solidificado el medio, se realizaron perforaciones de 10 mm de diámetro donde se inocularon 100 µL de extractos a concentraciones de (200, 100, 50, 25, 12,5 mg/mL) y como control negativo se utilizó agua destilada con DMSO al 10%, esto debido a que los extractos fueron preparados utilizando DMSO al 10 %; posteriormente se incubaron a 25 °C durante 14 días. Este ensayo se repitió 3 veces.
- Para la obtención de los resultados se midió el diámetro en centímetros de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo.
- Se realizaron 3 mediciones desde la línea que define el halo de inhibición de un lado al otro del centro y se tomará como resultado el valor promedio de estas mediciones; posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición relativo.

7.8. Evaluación de la actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición del crecimiento micelial.

- Se prepararon 150 mL de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa previamente esterilizado en autoclave a 121 ° C por 20 min y enfriado hasta llegar a una temperatura alrededor de los 45±2 °C pero sin que solidifique (Bradwhite W.D. & Sosa-Moss, 1995). A esta preparación se le añadieron 150 mL de una solución estéril del extracto a evaluar; a concentraciones de (200, 100, 50, 25, 12,5 mg/mL); debido a que los extractos no eran solubles se añadió DMSO al 10%, el mismo también fue añadido al control negativo.
- Posteriormente esta preparación fue vertida en cajas de Petri de diez centímetros de diámetro con un volumen final de 20 mL. Simultáneamente a las cajas Petri del control negativo se le vertieron solamente 20 mL de medio de cultivo PDA. Se dejaron solidificar a temperatura ambiente durante una hora todas y cada una de las cajas Petri del experimento.
- A continuación se procedió con el inoculado, el cual se realizó colocando sobre el centro de cada caja Petri, un taco de inóculo circular del microorganismo de prueba (10 mm), y posteriormente fueron incubadas a 26 ± 2 °C, hasta que los controles cubran completamente la caja de Petri (21 días).
- Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada concentración. El crecimiento diametral de cada microorganismo (mm) fue medido cada 7 días, hasta que los controles negativos cubrieron totalmente la caja Petri (21 días), tiempo que es tomado como referencia.

Al final se calcula el índice antifúngico que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice antifúngico (IA)} = \left[1 - \frac{(Da+0.5)}{Db+0.5} \right] * 100$$

Donde

Da=Diámetro de crecimiento de la muestra.

Db= Diámetro de crecimiento del control.

7.9. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos fueron presentados como promedio (\pm error estándar de la media) de las tres determinaciones. El análisis estadístico de los datos fue realizado por análisis de varianza utilizando el software MINITAB y un valor de probabilidad de $p < 0.05$ será considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Identificación

Los especímenes vegetales de *Chenopodium ambrosioides*, *Clinopodium bolivianum* y *Ruta graveolens* fueron identificados en el Herbario Nacional-UMSA por la Lic Arely Palabral.

8.2. Rendimiento de los extractos etanólicos de las especímenes vegetales

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento de los extractos etanólicos de *Chenopodium ambrosioides*, *Clinopodium bolivianum* y *Ruta graveolens* a partir de la parte aérea de las mismas.

	Peso de material vegetal (g)	Extracto etanólico (g)	Porcentaje de Rendimiento
<i>Clinopodium bolivianum</i>	1252,55	191,27	15,27 %
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	672,48	72,84	10,83 %
<i>Ruta graveolens</i>	824,95	138,65	16,81 %

		
Secado de la parte aérea de <i>Chenopodium Ambrosioides</i>	Secado de la parte aérea de <i>Clinopodium bolivianum</i>	Secado de la parte aérea de <i>Ruta graveolens</i>



Figura 4. Obtención de los extractos etanólicos de las plantas en estudio.

8.3. Determinación Cualitativa de los componentes mayoritarios

Tabla 6. Determinación Cualitativa de los componentes mayoritarios de los extractos etanólicos de *Chenopodium ambrosioides*, *Clinopodium bolivianum* y *Ruta graveolens*.

	ALCALOIDES		AZÚCARES	SAPONINAS	TRITERPENOS	GLUCOSIDOS CARDIOTÓNICOS			COMP. FENÓLICOS	TANINOS	FLAVONOID	PROTEINAS	ACEITES NO VOLÁTILES
	Mayer	Dragendorff	Fehling	Espuma	Lieberman -Burchard	Kedde	Baljet	Kelle Killan	Cloruro Férrico	Acetato de Plomo	Shinoda	Nindirina	Test de Punto
Extracto etanólico de <i>Clinopodium bolivianum</i>	-	-	+	+	+	-	-	++	++	+	+	-	+
Extracto etanólico de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	+	++	-	-	+	-	+++	-	+++	-	+	-	++
Extracto etanólico de <i>Ruta graveolens</i>	-	-	+	-	+++	-	-	+++	+	-	-	-	-

Como se puede observar en la Tabla N° 6 el extracto etanólico de *Clinopodium bolivianum* presenta como componentes mayoritarios; compuestos fenólicos, que coincide con lo mencionado en los trabajos de (Chirinos, Huamán, Betalleluz-Pallardel, Pedreschi, & Campos, 2011)(Chirinos, Pedreschi, Rogez, Larondelle, & Campos, 2013); donde indican que la koa es una fuente rica en compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos principalmente corresponden a la familia del flavanonas, que le proporcionan una alta capacidad antioxidante. También es destacable la presencia en menor grado de saponinas, triterpenos, taninos, azúcares y aceites no volátiles.

El extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* destaca por la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, aceites volátiles y en menor proporción triterpenos y flavonoides.

Ruta graveolens contiene un gran número de metabolitos secundarios, concentrados principalmente en las hojas(Ruiz Ortiz, 2013), en la Tabla N° 6 se puede observar que el extracto etanólico de esta planta presenta como componentes mayoritarios triterpenos, glucósidos cardiotónicos y azúcares.



Figura 5. Determinación Cualitativa de los componentes mayoritarios.

8.4. Aislamiento e Identificación de *Moniliophthora spp*

El cambio de los factores ambientales en que se encontraban las muestras tomadas del hongo *Moniliophthora spp* en la población de Sapecho a las condiciones de laboratorio hizo que este hongo se adaptara muy lentamente, teniendo en muchos casos escaso o nulo desarrollo en el medio de cultivo PDA en condiciones de laboratorio tal como se puede observar en la Figura N°6, es por esta razón que se tuvo que hacer una observación minuciosa de cada uno de los factores implicados en esta respuesta.

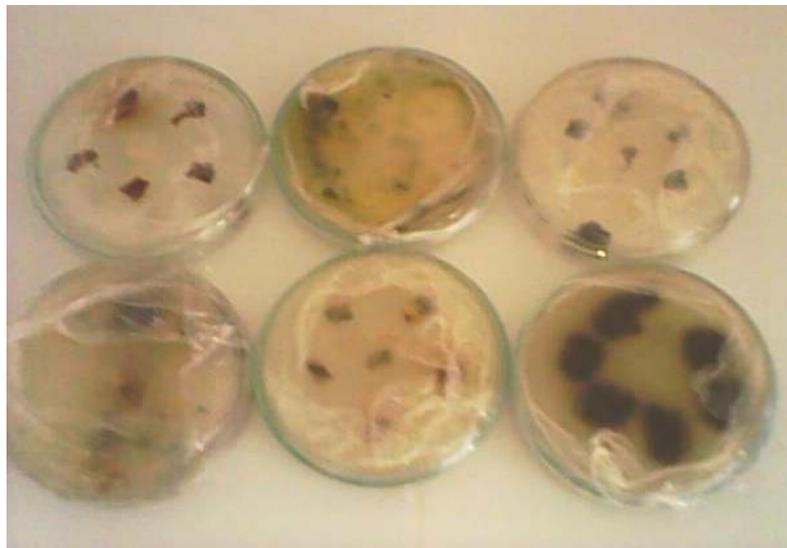


Figura 6. Escaso desarrollo de hongo *Moniliophthora spp* en condiciones de laboratorio.

Según referencias bibliográficas el hongo *Moniliophthora roreri* se desarrolla bien en medio PDA sin embargo se tiene que la adición de otros suplementos como Malta, extracto de cacao o asparagina (Villavicencio Vásquez, 2010) mejoraban su desarrollo. Con respecto a la temperatura, se tiene referencias que el mayor crecimiento y esporulación ocurrió de 22°C a 28°C, pero a temperaturas mayores a 32°C el hongo no esporula según (Herrera Murillo, 1988). En la misma tesis también se indica la mayor producción de conidios ocurre cuando se somete al hongo a un fotoperiodo de 4 a 16 horas de luz, dato que también es corroborado por (San-blas, Carrillo, & Parra, 2012) donde en el aislamiento se somete al hongo a un fotoperiodo de luz continua por el lapso de catorce días.

Durante el aislamiento se tuvieron muchos inconvenientes en cuanto a la adaptación del hongo proveniente de las muestras de mazorcas de la población de Sapecho, respecto a su adaptación a las condiciones de laboratorio; sin embargo el problema más importante estaba constituido por su desarrollo lento que fue subsanado con la estimulación del hongo mediante luz continua, que favoreció su germinación y crecimiento.

A partir de muestras recolectadas se realizaron aislamientos que fueron evaluados e identificados mediante criterios morfológicos (diámetro, borde, coloración y textura de las colonias; tipo y tamaño de conidias, entre otros).

El cultivo aislado presentó un crecimiento radial, que en un inicio era de color café claro-blanco, las tonalidades de colores del micelio observados variaron según los días de crecimiento, hasta tomar la coloración que se observa en la Figura N° 7 , con una consistencia pulverulenta, además de un borde regular mucho más claro y combinado con porciones blancas.

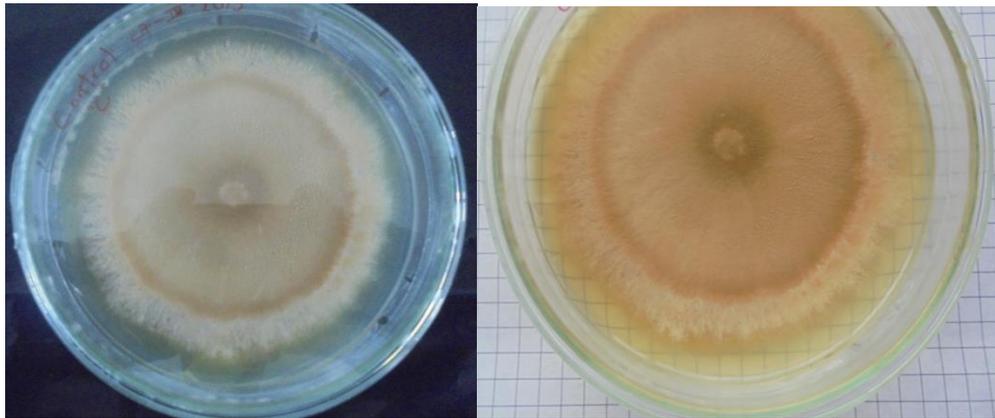


Figura 7. Cultivos aislados de *Moniliophthora spp*

En la observación microscópica de las esporas se evidenció que presentaron formas globosas, subglobosas y elípticas que coincide con las descripciones de Evans et al. (1978) y Suárez (1971) tal como puede observarse en las Figura N° 8.

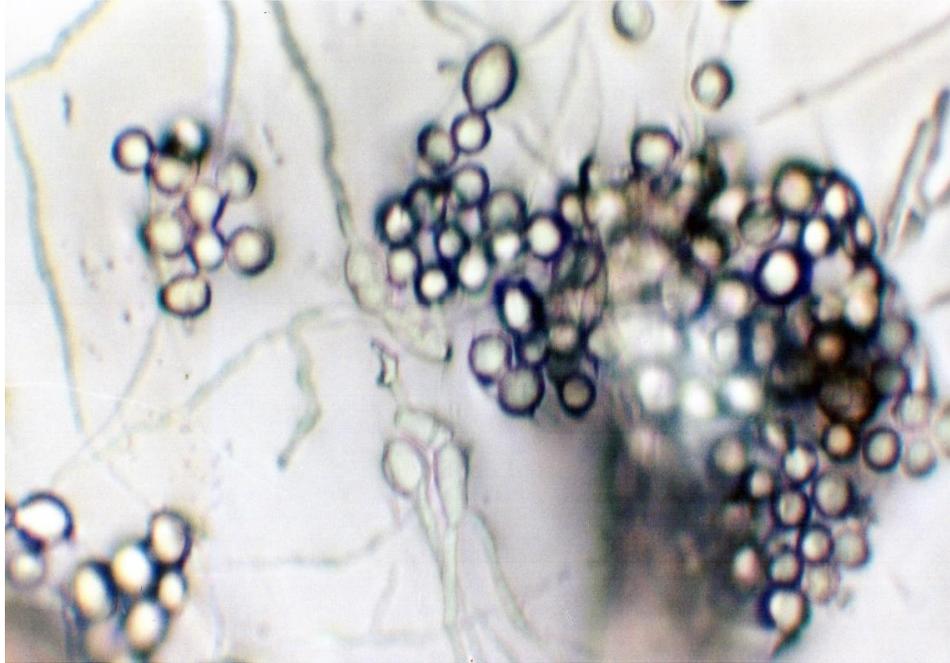


Figura 8. Esporas de *Moniliophthora spp* vistas al microscopio, a partir de las muestras obtenidas de la población de Sapecho.

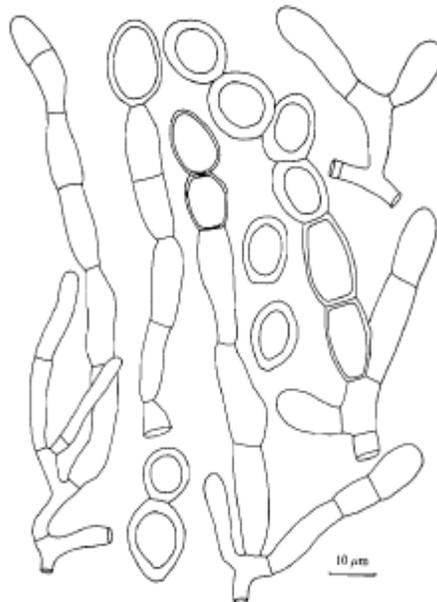
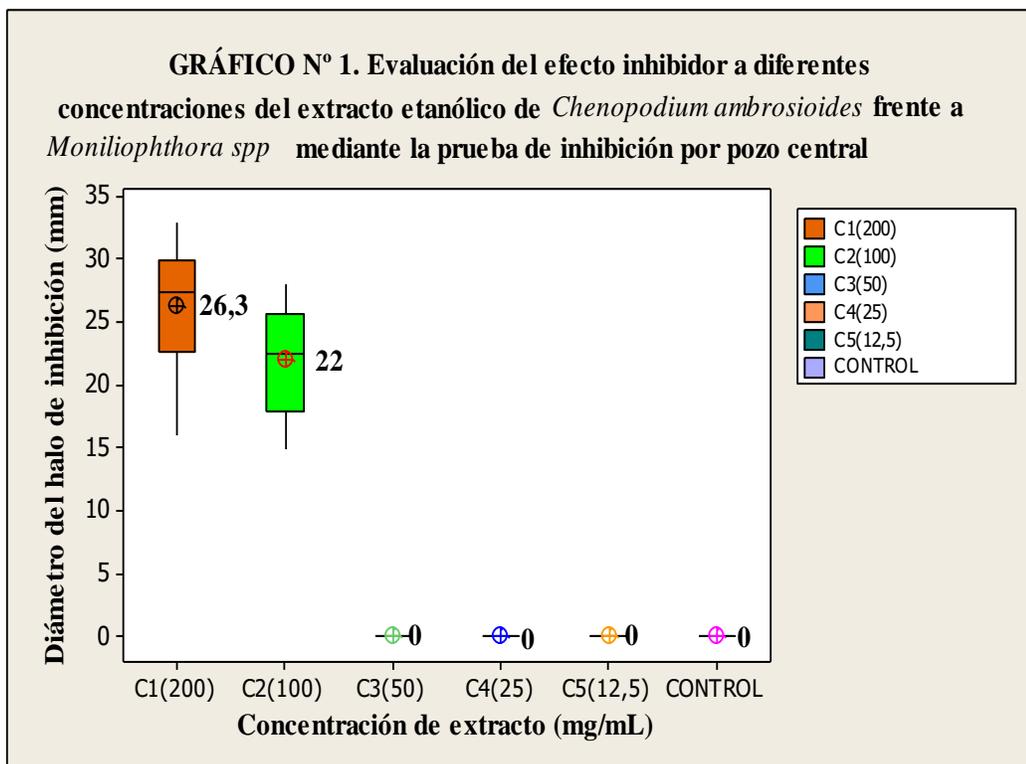


Figura 9. Estructuras conidiales de *Moniliophthora roreri*. (Evans, Stalpers, Samson, & Benny, 1978)

8.5. Actividad antifúngica por prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central

Shah (2014) establece una categorización de la actividad antifúngica, asignándoles intervalos de porcentaje de inhibición; tal como puede apreciarse en la Tabla siguiente:

Categoría	Porcentaje de Inhibición	Actividad antifúngica
1	30-40	Baja
2	41-50	Moderada
3	50-60	Buena
4	61-70	Muy buena
5	>70	Significativa



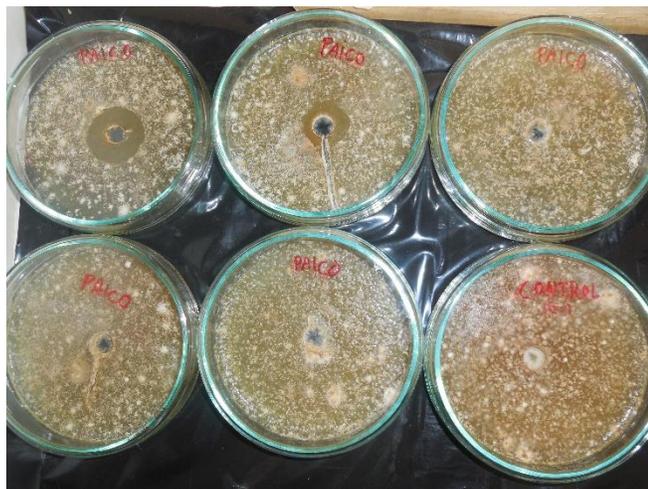


Figura 10. Evaluación de la actividad antifúngica por el método de inhibición por pozo central del extracto etanólico *Chenopodium ambrosioides*.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> después de 14 días.		
Concentración mg/mL	Diámetro(mm)	Porcentaje de inhibición (%)
200	26,30±2,33	28,90
100	22,00±1,86	24,18
50	0,00±0,00 ^a	0,00
25	0,00±0,00 ^a	0,00
12,5	0,00±0,00 ^a	0,00
Control	0,00±0,00 ^a	0,00

Las medias de las columnas con alguna letra no son estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$).

El extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* solamente es efectivo frente a *Moniliophthora spp* a concentraciones de 100 y 200 mg/mL presentando halos de

inhibición de 22,00 y 26,3 mm respectivamente; con un porcentaje de inhibición de 28,90 y 24,18; que según la tabla N° 7 propuesta por (Shah, 2014), no llegaría a presentar actividad antifúngica significativa. Aunque a una concentración de 200 mg/mL presenta un porcentaje de inhibición muy cercano al criterio de actividad antifúngica baja.

Dentro la bibliografía se tiene un gran número de artículos que evidencian la actividad antifúngica de *Chenopodium ambrosioides* ya sea como extracto o como aceite esencial; entre estos tenemos el trabajo de Jardim et al. (2010) donde se demostró una fuerte actividad antifúngica del extracto hexánico de *Chenopodium ambrosioides* frente a *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium semitectum*, *Colletotrichum musae* y *Colletotrichum gloeosporioides*, esto es reforzado con los trabajos de Hernández et al. (2007) y (Bomfim et al., 2008), donde indican que el extracto acuoso de paico es fuertemente activo frente la ultimo microorganismo mencionado.

Por otro lado Rivera-Castañeda et al. (2001) investigaron la actividad antifúngica del extracto diclorometanico, indicando que es activo frente a *Tilletia indica* a 500 µg/ml; Correa-Royero et al. (2009) investigaron el sinergismo de los extractos etanólicos de *Chenopodium ambrosioides* y *Myrcia cucullata* frente a *Candida krusei* mostrando una actividad buena.

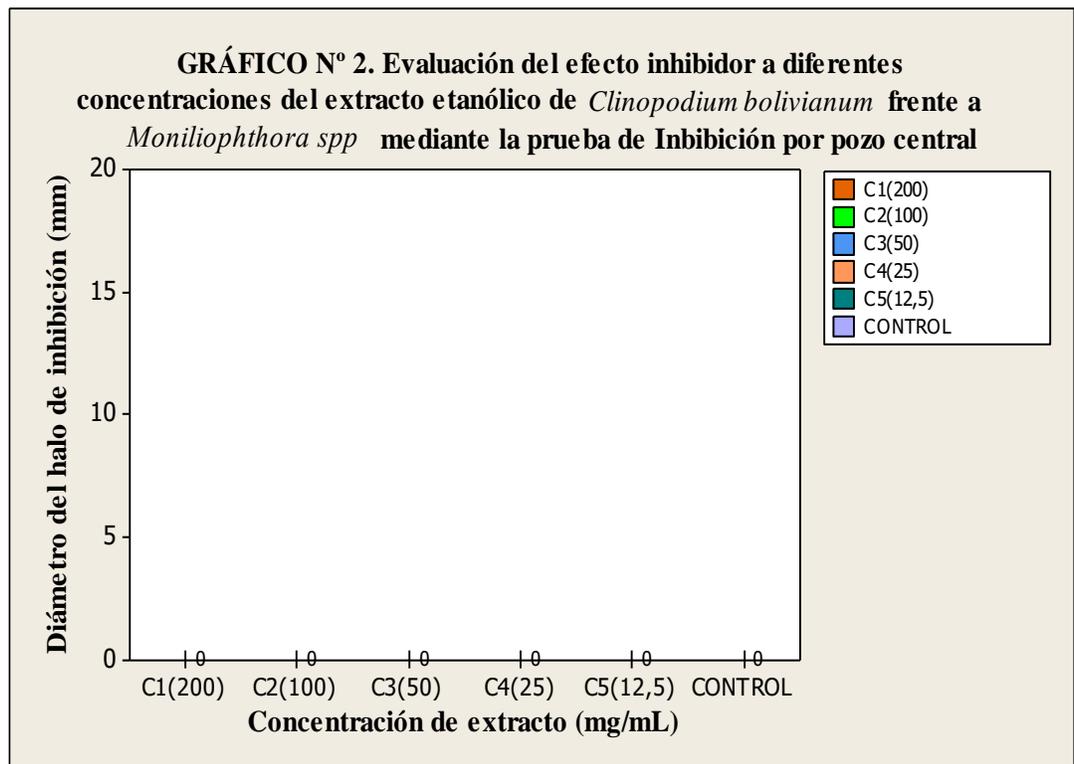
En el trabajo de Vásquez Covarrubias et al. (2014) se destaca la buena actividad antifúngica del *Chenopodium ambrosioides* frente a *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, aunque se obtuvieron diferencias en la susceptibilidad (crecimiento micelial y producción de conidios) entre los aceites esenciales y extractos acuosos de diferentes variedades de la misma planta.

Jaramillo et al. (2012), indica que el aceite esencial presentó una marcada actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum*, que puede ser atribuida a la presencia de a-terpineno o la mezcla de este compuesto con otros metabolitos, también evidencio la presencia de a-terpineno, p-cimeno, 4-careno, trans-ascaridol, carvacrol.

Debido a todo lo anteriormente mencionado existe la posibilidad de que el contenido de algunos de los anteriores componentes, estén presentes o no en menor concentración en el extracto etanólico obtenido en el presente trabajo y que esto podría repercutir en su

actividad antifúngica. Sin embargo en el extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* se pudo evidenciar la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, aceites volátiles y en menor proporción triterpenos y flavonoides (Tabla 6). Según Wolters y Eilert (1981), los alcaloides y compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que poseen una buena actividad antimicrobiana, caracterizados por su toxicidad y su utilidad en la protección ante agentes externos, como hongos (Paixão et al. ,2014).

En el caso del extracto etanólico de *Clinopodium bolivianum* se pudo observar que en ninguno de los tratamientos a las diferentes concentraciones presentó un halo de inhibición frente a *Moniliophthora spp* tal como puede apreciarse en el GRÁFICO N° 2.



Dentro de la bibliografía existe escasa información del *Clinopodium bolivianum*; entre estas destacan el trabajo realizado por Fournet et al (1996) donde encontraron que es activa frente a *Rhodnius neglectus* y *Triatoma infestans*; en el trabajo de Cumara y Choquehuanca (2015) se destaca la presencia de pulegona en aceites esenciales que es altamente activo frente a áfidos (*Myzus Persicae*, *Aphis Fabae*) y las investigaciones realizadas del aceite esencial frente a *Helicobacter pylori* (Mamani M., Gonzales E.,

Mamani, B, 2014). (Regalado Veloz et al, 2012) donde se indica que presenta actividad anti-*Helicobacter pylori* y se le atribuye esta actividad principalmente a los monoterpenoides.

En el extracto etanólico de *Clinopodium bolivianum* del presente trabajo se pudo evidenciar mediante la determinación cualitativa fitoquímica la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos y una presencia mucho menor de azúcares, taninos, flavonoides, saponinas y triterpenos, lo que coincide con los trabajos presentados por Dorman et al. (2006) y Chirinos et al. (2013).

La nula actividad del extracto etanólico podría deberse a la baja concentración de los componentes anteriormente mencionados.

En el extracto etanólico de *Ruta graveolens* los halos de inhibición y porcentajes de inhibición son mucho más altos; pudiéndose considerar a las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/mL con una actividad antifúngica moderada según la categorización propuesta por Shah (2014).

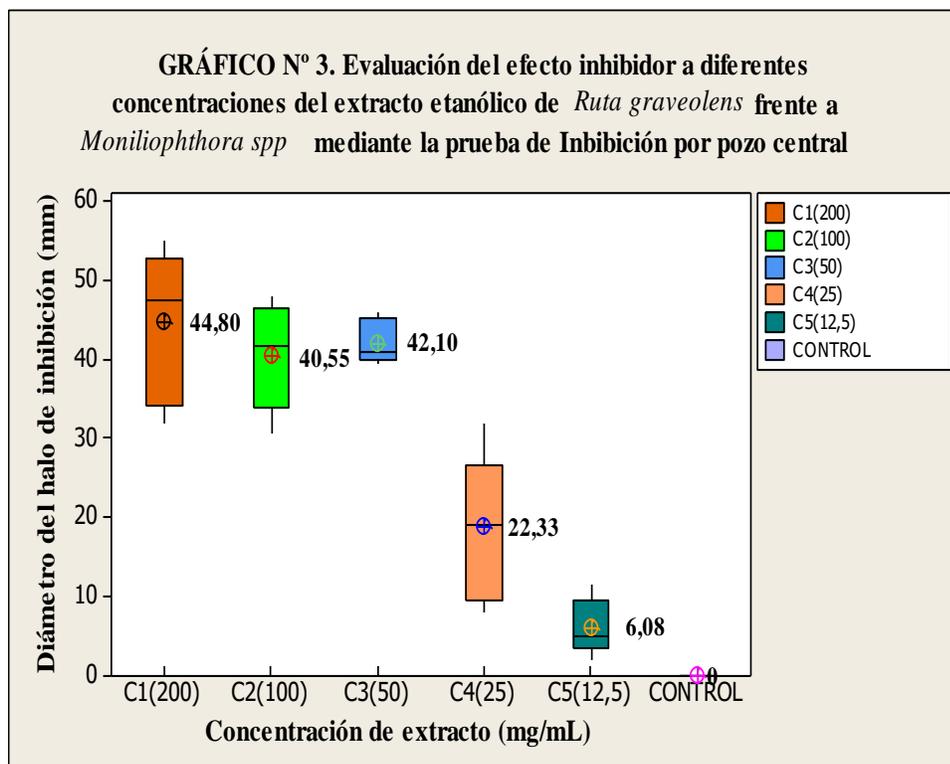


Tabla 9. Porcentaje de inhibición <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Ruta graveolens</i> después de 14 días.		
Concentración mg/mL	Diámetro(mm)	Porcentaje de inhibición (%)
200	44,80±3,80	50,06
100	40,55±2,71	45,31
50	42,10±1,11	47,04
25	18,83±3,72	21,04
12,5	6,08±1,45 ^a	6,79
Control	0,00±0,00 ^a	0,00
Las medias de las columnas con alguna letra no son estadísticamente significativas respecto al control (p<0.05).		

En la bibliografía se destaca a la *Ruta graveolens* como una promisoriosa planta con actividad antimicrobiana; en el trabajo realizado por Ivanova et al. (2005), se identificaron cumarinas, terpenoides, alcaloides, flavonoides, ácidos alifáticos y cetonas, en el extracto etanólico obtenido a partir de la parte aérea de Ruda; destacándose una buena actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*.

Oliva et al. (2003) indica que las quinolinas, quinolonas y alcaloides de *Ruta graveolens* tienen alta actividad antifúngica frente a *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*.

Meepagala (2005) menciona que el componente Rutacridona presente en *Ruta graveolens* tiene una buena actividad antifúngica frente a *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

Garcia et al. (2012) demostró que el extracto acuoso de ruda tiene actividad antifúngica baja frente a *Sclerotinia sclerotiorum* y Amber L. el al (2004) también hace referencia a fitotoxinas que inhiben el crecimiento de *L. sativa* y *A. stolonifera*.

Se pudo evidenciar cualitativamente que el extracto etanólico de *Ruta graveolens* del presente trabajo presenta como componentes mayoritarios a triterpenos y glucosidos cardiotónicos; además en menor proporción azúcares y compuestos fenólicos (Tabla 6).

Los triterpenos son compuestos presentes en la naturaleza, que están considerados dentro de la familia de compuestos inhibidores de síntesis de glucanos (Lipopéptidos) con alta actividad antifúngica según Gregorí Valdés (2005); que podrían ser probablemente los responsables de la actividad antifúngica del extracto etanólico de *Ruta graveolens*.

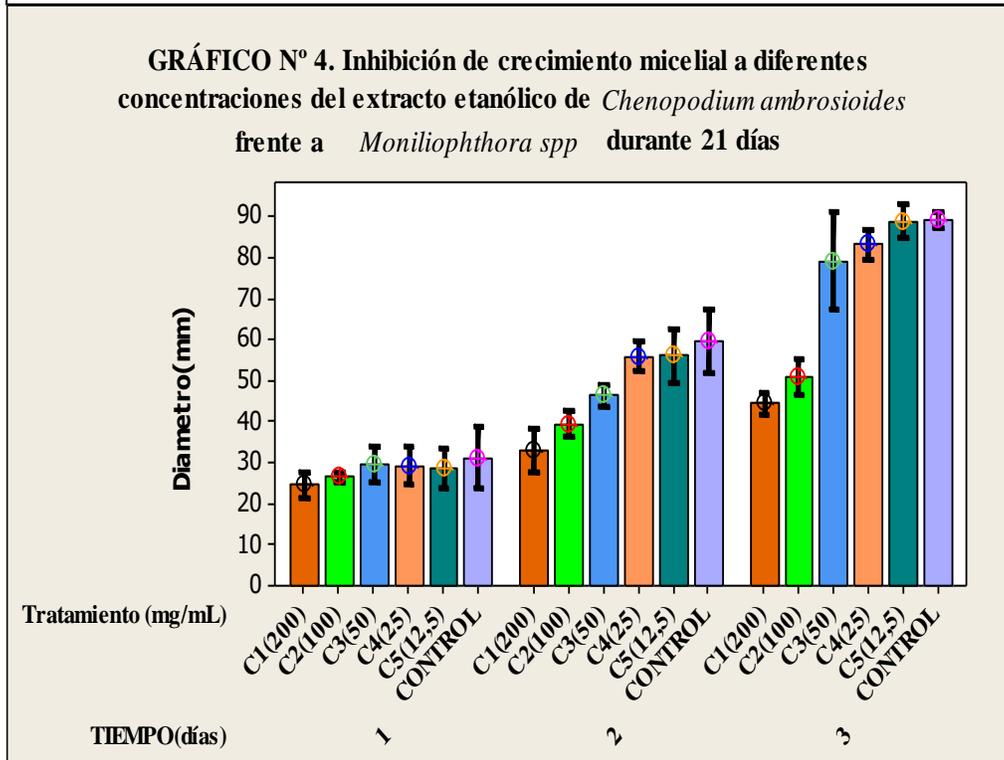
8.6. Actividad antifúngica mediante la prueba de inhibición del crecimiento micelial

El *Chenopodium ambrosioides* produce inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* a partir de los 14 días, donde a una concentración de 50 mg/mL presenta un índice antifúngico de 22,14 valor que no es considerado dentro la categorización propuesta por (Shah, 2014); sin embargo a una concentración de 100 y 200 mg/mL, cuyo índice antifúngico es de 33,76 y 44,79 respectivamente es considerado como un antifúngico con actividad de baja a moderada como puede apreciarse en la Tabla N° 10. A los 21 días el crecimiento de *Moniliophthora roreri* es muy similar, con la variación de que los índices antifúngicos se incrementan teniéndose que para 100 mg/mL es 42,70 y para 200 mg/mL es de 50,15; presentando ambos una actividad antifúngica moderada.

Tabla 10. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Chenopodium ambrosioides</i> durante 21 días.

Tiempo	7 días		14 días		21 días	
Concentración mg/mL	Diámetro(mm)	IA (%)	Diámetro(mm)	IA (%)	Diámetro(mm)	IA (%)
200	24,67±1,23 ^a	20,94±3,94 ^a	32,95±2,04	44,79±3,41	44,44±1,06	50,00±1,18
100	26,55±0,46 ^a	14,90±1,46 ^a	39,53±1,25	33,76±2,10	51,08±1,69	42,70±1,89
50	29,58±1,69 ^a	5,18±5,40 ^a	46,47±1,05	22,14±1,76	79,25±4,66	11,10±5,23
25	29,33±1,73 ^a	5,98±5,53 ^a	55,98±1,34 ^a	6,19±2,25 ^a	83,25±1,44 ^a	6,62±1,62 ^a
12,5	28,73±1,84 ^a	7,91±5,89 ^a	56,17±2,57 ^a	5,89±4,31 ^a	88,83±1,59 ^a	0,36±1,78 ^a
Control	31,20±2,95 ^a	0,00±9,46 ^a	59,68±3,08 ^a	0,01±5,16 ^a	89,15±0,73 ^a	0,00±0,82 ^a

Las medias de las columnas con alguna letra no son estadísticamente significativas respecto al control (p<0.05).IA=Índice antifúngico

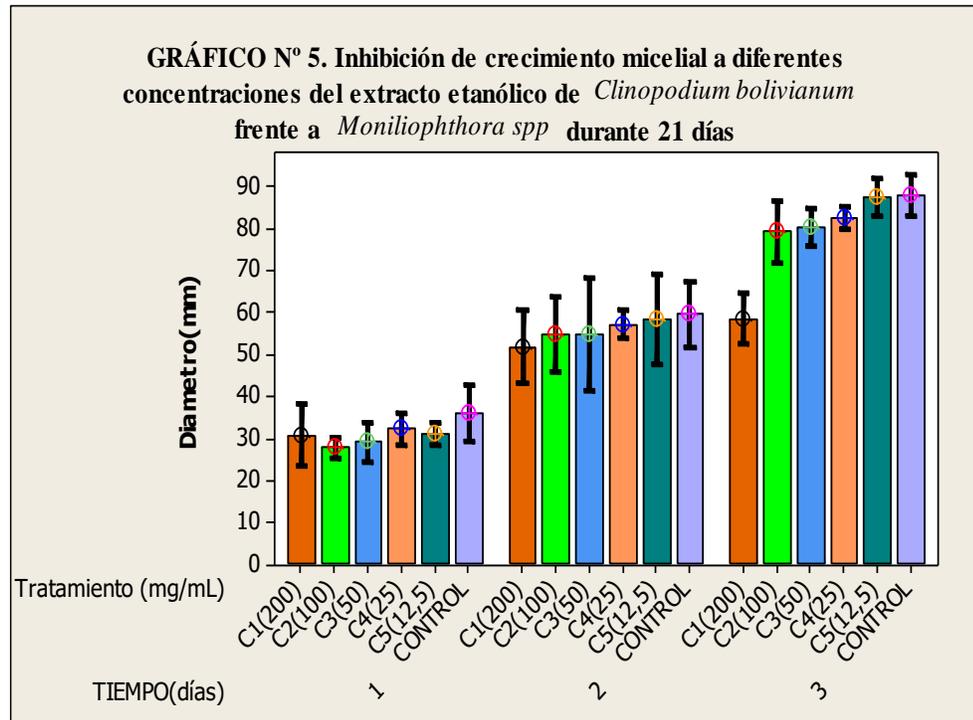


El extracto etanólico de *Clinopodium bolivianum* solamente inhibe el crecimiento micelial de *Moniliophthora spp* a los 21 días, a una concentración de 100 y 200 mg/mL con una

diferencia estadísticamente significativa frente al control negativo, presentando índices antifúngicos de 9,83 y 33,42 respectivamente, destacándose solamente una actividad antifúngica baja a una concentración de 200 mg/mL.

Tabla 11. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Moniliophthora spp</i> a diferentes concentraciones de extracto de <i>Clinopodium bolivianum</i> durante 21 días.						
Tiempo	7 días		14 días		21 días	
Concentración mg/mL	Diámetro(mm)	IA (%)	Diámetro(mm)	IA (%)	Diámetro(mm)	IA (%)
200	30,76±2,94 ^a	14,39±8,17 ^a	51,78±3,37 ^a	13,23±5,64 ^a	58,63±2,39	33,42±2,72
100	27,68±1,02 ^a	22,95±2,84 ^a	54,73±3,52 ^a	8,29±5,90 ^a	79,40±2,89	9,83±3,28
50	29,05±1,80 ^a	19,15±5,02 ^a	54,80±5,28 ^a	8,18±8,84 ^a	80,47±1,82 ^a	8,62±2,07 ^a
25	32,15±1,52 ^a	10,52±4,22 ^a	57,12±1,31 ^a	4,30±2,20 ^a	82,65±1,05 ^a	6,14±1,19 ^a
12,5	31,02±1,09 ^a	13,67±3,03 ^a	58,42±4,11 ^a	2,12±6,89 ^a	87,77±1,75 ^a	0,33±1,98 ^a
Control	35,93±2,66 ^a	0,01±7,40 ^a	59,68±3,08 ^a	0,01±5,16 ^a	88,06±1,86 ^a	0,00±2,11 ^a

Las medias de las columnas con alguna letra no son estadísticamente significativas respecto al control (p<0.05).
IA=Índice antifúngico



El extracto de *Ruta graveolens* inhibe el crecimiento micelial de *Moniliophthora spp* desde los 7 días a una concentración de 200 mg/mL (IA=35,16) con una actividad antifúngica baja, conforme el tiempo de exposición es mayor a concentraciones de 50,100 y 200 mg/mL presentan una diferencia estadísticamente significativa frente al control negativo, con índices antifúngicos de 23.36, 19.84 y 42.15 respectivamente; presentando solamente a 200 mg/mL una actividad antifúngica moderada.

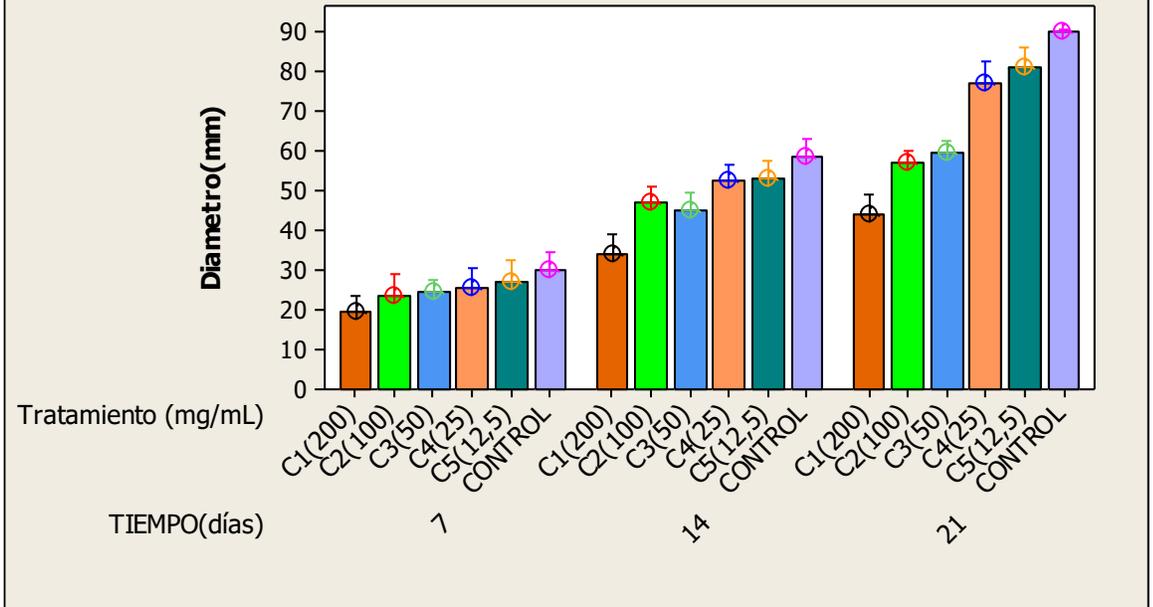
A los 21 días se observa en la Tabla N° 12 que todas las concentraciones presentan una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo según la categorización presentada por Shah (2014), las concentraciones de 50 y 100 mg/mL presentan una actividad antifúngica baja con índices antifúngicos de 33,54 y 36,48. A 200 mg/mL presenta un índice antifúngico de 51,05 que lo categorizaría como una actividad antifúngica buena.

Tabla 12. Inhibición del crecimiento micelial de *Moniliophthora spp* a diferentes concentraciones de extracto de *Ruta graveolens* durante 21 días.

Tiempo	7 días		14 días		21 días	
Concentración mg/mL	Diámetro(mm)	IA (%)	Diámetro(mm)	IA (%)	Diámetro(mm)	IA (%)
200	19,55±1,94	35,16±6,44	33,97±2,48	42,15±4,22	44,12±2,53	51,05±2,80
100	23,60±2,66 ^a	21,72±8,84 ^a	47,07±1,98	19,84±3,38	57,25±1,55	36,48±1,72
50	24,75±1,50 ^a	17,91±4,99 ^a	45,00±2,19	23,36±3,73	59,90±1,45	33,54±1,61
25	25,75±2,41 ^a	14,59±8,01 ^a	52,48±2,12 ^a	10,62±3,61 ^a	77,50±2,53	14,01±2,80
12,5	27,23±2,60 ^a	9,67±8,61 ^a	53,00±2,34 ^a	9,74±3,98 ^a	81,07±2,69	10,06±2,99
Control	30,15±2,31 ^a	0,00±7,67 ^a	58,72±2,33 ^a	0,00±3,96 ^a	90,13±0,36 ^a	0,00±0,40 ^a

Las medias de las columnas con alguna letra no son estadísticamente significativas respecto al control (p<0.05).
IA=Índice antifúngico

GRÁFICO N° 6. Inhibición de crecimiento micelial a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Ruta graveolens* frente a *Moniliophthora spp* durante 21 días



9. CONCLUSIONES

Mediante la prueba de inhibición por difusión en agar en pozo central se pudo determinar que el extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* a 100 y 200 mg/mL presenta una diferencia estadísticamente significativa frente al control negativo con un $p < 0,05\%$; sin embargo por sus porcentajes de inhibición a esas concentraciones se las podrían considerar como fungistáticos. Esta actividad aunque baja, podría ser atribuida a los compuestos que se evidenciaron de manera cualitativa; tales como compuestos fenólicos, alcaloides, aceites volátiles, en menor proporción triterpenos y flavonoides; los cuales tienen antecedentes bibliográficos de poseer actividad antimicrobiana.

En la misma prueba el extracto etanólico de *Clinopodium bolivianum* no presentó ningún halo de inhibición para todas sus concentraciones por lo que bajo las condiciones del experimento, este extracto no tendría actividad antifúngica.

Mediante la determinación cualitativa fitoquímica se pudo identificar la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos y una presencia mucho menor de azúcares, taninos, flavonoides, saponinas y triterpenos.

El caso del extracto etanólico de *Ruta graveolens* es muy interesante ya que presenta una diferencia estadísticamente significativa frente al control negativo desde una concentración de 25 mg/mL, aunque se considera que presenta una actividad antifúngica moderada a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/mL. Además se pudo demostrar cualitativamente que el extracto etanólico de *Ruta graveolens* del presente trabajo presenta como componentes mayoritarios a triterpenos y glucósidos cardiotónicos; además en menor proporción azúcares y compuestos fenólicos. De estos resultados se destaca la presencia de Triterpenos como componente mayoritario que podría ser los responsables de la actividad antifúngica.

Por lo tanto se tiene que la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* es de 100 mg/mL, 12,5 mg/mL para el extracto etanólico de *Ruta graveolens* y el extracto de *Clinopodium bolivianum* no presenta concentración mínima inhibitoria frente a *Moniliophthora spp.*

La inhibición del crecimiento micelial por el extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* se da desde los 14 días a partir de los 50 mg/mL con una diferencia estadísticamente significativa frente al control negativo, las concentraciones de 100 y 200 mg/mL presentan una actividad antifúngica de baja-moderada a moderada a los 21 días. Por su parte el extracto etanólico de *Clinopodium bolivianum* presenta una inhibición del crecimiento micelial estadísticamente significativa frente al control negativo solamente a los 21 días a concentraciones de 100 y 200 mg/mL, destacándose únicamente una actividad antifúngica baja a los 200 mg/mL. El extracto etanólico de *Ruta graveolens* presenta una actividad antifúngica de baja a buena desde el día 7, a una concentración de 200 mg/mL, con una diferencia estadísticamente significativa frente al control, a los 14 días desde una concentración 50 mg/mL y 12,5 mg/mL a los 21 días, con una actividad antifúngica baja a concentraciones de 50 y 100 mg/mL; pero destacando una actividad antifúngica buena a los 200 mg/mL.

También se pudo evidenciar dentro de los tres extractos etanólicos la presencia cualitativa de compuestos con antecedentes de actividad antifúngica; sin embargo al parecer esta actividad variaría por la concentración y el tiempo de exposición a las mismas.

10. RECOMENDACIONES

- Por todo lo anteriormente expuesto se recomienda hacer las pruebas moleculares a *Moniliophthora spp.* con el fin de identificar la especie de la misma.
- En estudios posteriores se recomienda como siguiente paso el fraccionamiento de los extractos; principalmente del extracto etanólico de *Ruta graveolens* y *Chenopodium ambrosioides*, ya que son los que mejor actividad antifúngica presentan.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, V. Y., Villarreal, J. J., Delgado, V. R., & Gavilanez, P. Q. (2016). Evaluation of the Antifungal Activity of Sulfur and Chitosan Nanocomposites with Active Ingredients of *Ruta graveolens*, *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus melliodora* on the Growth of *Botrytis fabae* and *Fusarium oxysporum*. *Biology and Medicine*, 8–11.
2. Agrios, George N. (2010). *Fitopatología*. LIMUSA. México 285-289
3. Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97(5), 1012-1022.
4. Ajajib, M., Hussain, T., Farooq, S., & Ashiq, M. (2016). Analysis of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Chenopodium ambrosioides*: An Ethnomedicinal Plant, 2016.
5. Aliotta, G., Caiero, G., De Feo, V., Di Blasio, B., Iacovino, R., & Oliva, A. (2000). Allelochemicals from rue (*Ruta graveolens* L.) and olive (*Olea europaea* L.) oil mill waste waters as potential natural pesticides. *Curr. Top. Phytochem.* 3, 167–177.
6. Almança, C. C. J., Pozzatti, P. N., Casagrande, F. P., Silva Filho, J. P., Bissi, B., Barbosa, B. C., & Porfírio, L. C. (2013). Eficácia in vitro de extratos de *Chenopodium ambrosioides* sobre teleóginas de *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 80(1), 43–49.
7. Alzoreky, N., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int. J. Food Microbiol.* (80), 223-230.
8. Amber L. Hale, Kumudini M. Meepagala, Anna Oliva, Giovanni Aliotta y Stephen O. Duke. (2004). Phytotoxins from the Leaves of *Ruta graveolens*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3345-3349.
9. APC Bolivia. (2013). Inician actividades para el control de la moniliasis del cacao en el Municipio de Palos Blancos. 8 de Mayo de 2013. Revisado de

<http://www.apcbolivia.org/inf/noticia.aspx?fill=1937&Id=8&D86rtFv&fil=9&hrtsdate=10&BDrt54SSDfe=&%FS45>.

10. Aránzazu, F. (2000). Escoba de bruja en Colombia su Impacto Económico y Manejo. In Mejía, F.L.A. y Arguello, C.O. (Compiladores). Tecnología para el mejoramiento del Sistema de Producción del Cacao. (p. 144). Bucaramanga, Colombia: CORPOICA.
11. Ardaya, L. M. (2009). Cacao Silvestre Boliviano: Oportunidad para el desarrollo. Comercio exterior, 176.
12. Barros, L., Pereira, E., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Functional Foods, 5(4), 1732–1740.
13. Bazoberry Chali, O., & Salazar Carrasco, C. (2008). El cacao en Bolivia. Una alternativa económica de base campesina indígena. La Paz - Bolivia: Centro de Investigación y Promoción del Campesinado (CIPCA), 108-121.
14. Benítez, M. F. (2008). “Manejo Integrado de Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el Cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Mediante el Uso de Fungicidas, Combinado con Labores Culturales”.
15. Bomfim Celoto M., Stradioto Papa M., Silva do Sacramento L., Juari Celoto F. (2008). Acta Scientiarum. Agronomy, Vol. 30, Nº. 1, 1-5.
16. Borja Barragán, C. E., & Chimbo Rochina, J. M. (2013). Adaptación Y Caracterización Morfológica de Plantas Medicinales Subtropicales del Cantón Echeandía Provincia de Bolívar. Universidad Estatal de Bolívar.
17. Bradwhite W.D., C., & Sosa-Moss, C. (1995). Introducción al diagnóstico de las enfermedades de las plantas (Diagnóstico fitosanitario I) (Primera Ed). México: IICA, 30.
18. Bussmann, R. W., Paniagua Zambrana, N. Y., Moya Huanca, L. A., & Hart, R. (2016). Changing markets-Medicinal plants in the markets of La Paz and El Alto,

Bolivia. Journal of Ethnopharmacology, 193, 76–95.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.074>

19. Calado, G. P., Lopes, A. J. O., Junior, L. M. C., Das Chagas A. Lima, F., Silva, L. A., Pereira, W. S., Nascimento, F. R. F. (2015). *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis. Plos One, 10(11), 1–18.
20. Calsino, C. B., Quispe, T. L. A., Quispe, H. I. R., Huamán, M. L., & Rodríguez, R. F. E. (2016). Cuantificación de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico en tres especies peruanas de *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae). Arnaldoa, 23(1), 333–350.
21. Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña) Medicina Experimentalis, 25(3), 298-301.
22. Chávez, E., León, R., Ruíz, O., Averos, C., & Peralta, E. (2007). Aplicación de biofertilizantes líquidos de producción local y su efecto en la rehabilitación de plantaciones de cacao fino y de aroma. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
23. Chirinos, R., Huamán, M., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R., & Campos, D. (2011). Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. Food Chemistry, 128(3), 711–716.
24. Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. Industrial Crops and Products, 47, 145–152.
25. Chiu, K., & Fung, A. (1997). The cardiovascular effects of green beans (*Phaseolus aureus*), common rue (*Ruta graveolens*) and Kelp (*Laminaria japonica*) in rats. Gen Pharmacol, 29, 859–862.
26. Ciferri, R., & Parodi, E. (1933). Descrizione del fungo che causa la “Moniliasi” del cacao. Cooke, Phytopathologische Zeitschrift, 6, 539–542.

27. Claros P., M., Bilbao R., P., Damiani M., E., Gonzales D., E., Estensoro C., M., Alvarez A., M. T., et al. (2007). Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *BIOFARBO*, 15, 37-42.
28. Correa-Royero J., Tangarife V., Durán C., Stashenko E., Mesa-Arango A. (2009). In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(5): 734-741.
29. Croplifela. (2015). Moniliasis del Cacao. Revisado de <http://www.croplifela.org/es/proteccion-de-cultivos/otras-plagas-del-mes/moniliasis.html>.
30. Crozier, J., Thomas, S. E., Aime, M. C., Evans, H., & Holmes, K. A. (2006). Molecular characterization of endophytic morpho-species isolated from cocoa (*Theobroma cacao*): a potential source of biocontrol agents? *Proceedings of the 1st International Conference on Plant-Microbe Interactions: Endophytes and biocontrol agents*, Saaris, 18-22.
31. Cumara Q. P. y Choquehuanca L. R. (2015), "Estudio de las propiedades de aceites esenciales de los géneros *Clinopodium* y *Minthostachys* colectados de siete provincias del departamento de La Paz". Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Tecnología. Carrera de Química Industrial.
32. Cysne, D. N., Fortes, T. S., Reis, A. S., de Paulo Ribeiro, B., Dos Santos Ferreira, A., Do Amaral, F. M. M., Nascimento, F. R. F. (2016). Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitology Research*, 1–8.
33. Desrosiers, R., & Suarez, C. (1974). Monilia Pod Rot of Cacao. In Gregory, P.H. *Phytophthora Diseases of Cocoa*. Gregory, P.H. (pp. 273–277). London.: Logman Group.
34. Diniz, L., Maffia, L. A., Dhingra, O. D., Casali, V. W., Santos, R. H., Mizubuti, E. S., et al. (2006). Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, (31), 171-179.

35. Donovan, J. (2006). Diversification in international cacao markets: opportunities and challenges for smallholder cacao enterprises in Central America. A Consultancy Report Prepared by RUTA, 135.
36. Dorman, D., Bachmayer, O., Kossar, M., & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 762–770.
37. El Día. (2014). Bolivia exporta 150 mil toneladas de producción orgánica. 22 de Abril de 2014. Revisado de http://www.eldia.com.bo/index.php?cat=1&pla=3&id_articulo=143678.
38. EL DIARIO. (2015). Cacao de Alto Beni es afectado por plaga monilia. 10 de Mayo de 2015. Revisado de http://www.eldiario.net/noticias/2015/2015_05/nt150510/nacional.php?n=43&-cacao-de-alto-beni-es-afectado-por-plaga-monilia.
39. El-Emam, M. A. W., Mahmoud, S. S., & Bayaomy, F. E. Z. A. (2015). Potential role of mefloquine (antimalarial drug) and methanol extract of *Chenopodium ambrosioides* and *Sesbania sesban* in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(8), 608–613.
40. Evans, H. C. (1981). Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. *Phytopathological Papers*, 24, 44.
41. Evans, H. C. (2002). Invasive neotropical pathogens of tree crops. In Watling, R. Frankland, J.C. Ainsworth, A.M. Isaac, S. Robinson. *Tropical Mycology*. Vol. 2. *Micromycetes*. (Watling, R, p. 83–112.). Wallingford, UK. CABI Publishing.
42. Evans, H. C. (2016). Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). In Bailey Bryan A., Meinhardt, Lyndel W. *Cacao Diseases. A History of Old Enemies and New Encounters*. (pp. 93–96). Springer.
43. Evans, H. C., Stalpers, J. A., Samson, R. A., & Benny, G. L. (1978). On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 2528–2532.

44. FAO. (2015). Anexo 2: Substancias permitidas para la producción de alimentos orgánicos. Revisado de <http://www.fao.org/docrep/005/y2772s/y2772s0c.htm>.
45. Forsatkar, M. N., Nematollahi, M. A., & Brown, C. (2016). The toxicological effect of *Ruta graveolens* extract in Siamese fighting fish: a behavioral and histopathological approach. *Ecotoxicology*, 25(4), 824–834.
46. Fournet A., Rojas de Arias A., Charles B., Bruneton J. (1996). Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *Journal of Ethnopharmacology* (52) 145-149.
47. Gadano, A., Gurni, A. A., & Carballo, M. A. (2006). Genotoxic effects of *Chenopodiaceae* family. *J Ethnopharmacol*, 103, 246–251.
48. Gadano, A., Gurni, A., López, P., Ferraro, G., & Carballo, M. (2002). In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Ethnopharmacol.*, 81(1), 11–16.
49. Garcia, R. A., Juliatti, F. C., Garcia Barbosa, K. A., Cassemiro, T. A. (2012). Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48-57.
50. García L., R., & Montes B., R. (1992). Efecto de extractos vegetales en la germinación de esporas y en los niveles de daño de *Alternaria solani* en jitomate. En: *Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México., 159.
51. Gómez Castellanos, J. R. (2008). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 7(1), 3–9.
52. Grayer, R., & Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 37, 19–42.
53. Gregorí Valdés B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*; 39(2).

54. Griffith, W. G., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, N. R., & Hedger, N. J. (2003). Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*, 41, 423–435.
55. Grisales Ortega, S. P., & Afanador Kafuri, L. (2007). Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX, 15-32.
56. Guayasamín, E. E., & Aguilar, J. G. (2012). Medidas de control de bajo impacto ambiental para mitigar la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans et al.) En cacao híbrido Nacional Trinitario en Santo Domingo de los Tsáchilas. Santo domingo – ecuador.
57. Harley, R. M., & Paucar, A. G. (2000). List of Species of Tropical American *Clinopodium* (Labiatae), with New Combinations. *Kew Bulletin*, 55(4), 917–927.
58. Harraz, F. M., Hammada, H. M., El Ghazouly, M. G., Farag, M. A., El-Aswad, A. F., & Bassam, S. M. (2015). Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. *Natural Product Research*, 29(9), 879–82.
59. Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639–652.
60. Hernández-Albíter R., Barrera-Necha L., Bautista-Baños S., y Bravo-Luna, L. (2007). Antifungal Potential of Crude Plant Extracts on Conidial Germination of Two Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 25, N° 2. 180-185.
61. Hernández-rodíguez, A., Ruíz-beltrán, Y., Acebo-guerrero, Y., Miguélez-Sierra, Y., & Heydrich-Pérez, M. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Rev. Protección Veg.*, 29(1), 11-19.
62. Herrera Murillo, F. A. (1988). Efecto de factores nutricionales y físicos sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreli* in vitro.

63. Ivanova, A., Mikhova, B., & Najdenski, H. (2005). Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia*, 76, 344 - 347.
64. Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2000). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en Monilia (*Moniliophthora roreri*). In Hoyos L.M. (ed.). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria* (p. 90). Corpoica, Colombia.
65. Jamali, A., Kouhila, M., Ait Mohamed, L., Jaouhari, J. T., Idlimam, A., & Abdenouri, N. (2006). Sorption isotherms of *Chenopodium ambrosioides* leaves at three temperatures. *J. Food Eng.*, 72(1), 77–84.
66. Jaramillo C. B, Duarte R. E. y Delgado W. (2012). Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17(1)54-64.
67. Jardim, C., Jham, G., Dhingra, O., & Freire, M. (2008). Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1213–1218.
68. Johnson, J., Bonilla, J., & Agüero, L. (2008). *Manual de manejo y producción del cacaotero*. Leon, Nicaragua.
69. Justo-Chipana, M., & Morales R, M. (2015). Plantas medicinales comercializadas por las chifleras de La Paz y El Alto (Bolivia). *Ecología En Bolivia*, 50(2), 66–90.
70. Kishore N, Chansouria JPN, D. N. (1999). Antidermatophytic action of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* and an ointment prepared from it. *India Phytotherapy Research*, (10), 453–455.
71. Kiuchi, F., Itano, Y., Uchiyama, N., Honda, G., Tsubouchi, A., Nakajima-SHIMADA, J., & Aoki, T. (2002). Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J. Nat. Prod.*, 65(4), 509–512.
72. Krauss, U., Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., Sánchez, V. (2003). Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería En Las Américas*, 10, 37–38.

73. Kumar, R., Kumar, A., Dubey, N. K., & Tripathi, Y. B. (2007). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *Microbiology*, 115, 159 - 164.
74. LA RAZÓN. (2012). Plaga introducida en vegetales de contrabando afecta al 60% de la producción de cacao en el norte de La Paz. 15 de octubre de 2012. Revisado de http://www.la-razon.com/economia/Plaga-introducida-contrabando-produccion-Paz_0_1706229404.html.
75. LA RAZÓN. (2015). Una plaga afecta al 65% de los cultivos de cacao de Alto Beni. 08 de marzo de 2015. Revisado de http://www.la-razon.com/index.php?url=/suplementos/financiero/plaga-afecta-cultivos-Alto-Beni_0_2231176946.html.
76. Lozada, B. S., Herrera, L. V., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 2, 102-110.
77. Macbride, J. F. (1960). Flora of Peru. Botanical Series Field Museum of Natural History, 12, 754.
78. MacDonald, D., VanCrey, K., Harrison, P., Rangachari, P., Rosenfeld, J., & Warren, C. (2004). Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is (are) not toxic to mammalian smooth muscle. *J Ethnopharmacol*, 92, 2154–221.
79. Maddison, A. C., Macias, G., Moreira, C., Arias, R., & Neira, R. (1995). Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis perniciosa* and *Moniliophthora roreri*. *Plant Pathology*, 44, 982–998.
80. Maita Vásquez, J. J., & Guerra Davila, P. J. (2015). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Ruta graveolens* (Ruda), mediante el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

81. Mamani M., Gonzales E., Mamani, B. (2014). "Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial y Acido Ursólico de *Clinopodium bolivianum* (Khoa) por el método de impregnación de disco". Revista Con-Ciencia N°1/VOL. 2 (2014) 37-46.
82. Mamani, R. Y. (2010). Identificación de los compuestos fenólicos antioxidantes de la Inca Muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
83. Meepagala, K. M., Schrader, K. K., Wedge, D. E., & Duke, S. O. (2005). Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*, 66(22), 2689–2695.
84. Meepagala, K. M., Schrader, K. K., Wedge, D. E., & Duke, S. O. (2005). Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*, 66, 2689-2695.
85. Montes, M. (2001). Plantas Medicinales de uso en Chile (1° Edición). Chile.
86. Montes-belmont, R. (1995). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 73–82.
87. Monzote, L., García, M., Pastor, J., Gil, L., Scull, R., Maes, L., Gille, L. (2014). Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against Leishmania, their mitochondria and other microorganisms. *Experimental Parasitology*, 136(1), 20–26.
88. Nagarjuna, D. R., & Jabbar, A.-R. A. (2016). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L. volatile oils. *Cogent Chemistry*, 2(1), 1220055.
89. Nascimento, F. R. F., Cruz, G. V. B., Pereira, P. V. S., Maciel, M. C. G., Silva, L. A., Azevedo, A. P. S., Guerra, N. M. (2006). Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci.*, 78(2), 2650–2653.

90. Niurka, A., Lauzardo, H., Baños, S. B., & Velázquez, G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mex.*, 30(2), 119–123.
91. Oliva, A., Lahoz, E., Contillo, R., & Aliotta, G. (1999). Fungistatic activity of *Ruta graveolens* L. extract and its allelochemicals. *J. Chem. Ecol.*, 25, 519–526.
92. Oliva, A., Meepagala, K. M., Wedge, D. E., Harries, D., Hale, A. L., Aliotta, G., & Duke, S. O. (2003). Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, Including a New Quinolone Alkaloid. *J. Agric. Food Chem*, 51, 890–896.
93. Oliveira, A. P. de, Araújo, S. de, Lima, E. B. de S., Souza, L. K. M. de, Alvarenga, E. M., & Medeiros, J. V. R. (2015). Prospecção científica e tecnológica de *Chenopodium ambrosioides*, com ênfase nas atividades farmacológicas. *Cad. Prospec.*, Salvador, 8(4), 828–838.
94. Organización Mundial De La Salud. (2005). Manual de Bioseguridad en el laboratorio (Tercera ed.). Malta: OMS, 73-103.
95. Orozco, C. A., Osorio S, C., Rivera Páez, F. A., & López Gartner, G. A. (2010). Evaluación microbiológica y molecular de *Moniliophthora perniciosa* (agaricales: marasmiaceae). *bol.cient.mus.hist.nat.*, 15(1), 41 - 47.
96. Osorio-Solano, C., Orozco-Castaño, C. A., López-Gartner, G. A., & Rivera-Páez, F. A. (2012). Variabilidad genética de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora, comb. nov. (Agaricales - Marasmiaceae) en variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta agronómica.*, 61(2), 93-101.
97. Owolabi, M., Lajide, L., Oladimeji, M., Setzer, W., Palazzo, M., Olowu, R., et al. (2009). Volatile constituents and antibacterial screening of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. growing in Nigeria. *Natural Product Communications*, 4(7), 989-992.
98. Paixão A., Mancebo B., Sánchez L., Walter A., Arsénio de Fontes-Pereira A., Soca M., Roque E., Costa E., Nicolau S. (2014). Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de *Tephrosia vogelii* Hook, *Chenopodium ambrosoides*, *Cajanus*

cajan y *Solanum nigrum* L. de la provincia de Huambo, Angola. Rev. Salud Anim. Vol. 36 No. 3: 164-169.

99. Phillips-Mora, W. (2003). Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. University of Reading, Reading, UK.
100. Phillips-Mora, W., Baqueros, F., Melnick, R., & Bailey, B. (2015). First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. New Disease Reports, 31, 29.
101. Phillips-mora, W., Cawich, J., Garnett, W., & Aime, M. C. (2006). First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (Moniliasis disease) of cocoa in Mexico. Plant Pathology, (January), 3059-3059.
102. PLAGBOL. (2002). Intoxicación aguda por plaguicidas en pequeños agricultores en el departamento de La Paz-Bolivia. PLAGBOL. Ministerio de Previsión Social y Salud Pública
103. Prasad, C. S., Shukla, R., Kumar, A., & Dubey, N. K. (2009). In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. Mycoses, 123-129.
104. Preethi, K. C., Kuttan, G., & Kuttan, R. (2006). Anti-Tumour activity of *Ruta graveolens* extract. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 7(3), 439–443.
105. Quintana, Y., & Lenín, W. (2015). Efecto toxicológico de extractos vegetales sobre *Fusarium oxysporum* bajo condiciones controladas. Quevedo, Ecuador. Universidad Tecnica Estatal de Quevedo.
106. Raghav, S. K., Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., & Das, H. R. (2006). Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology, 104(1–2), 234–239.

107. Regalado Veloz, A. I., Sánchez Perera, L. M., & Dorvigny, B. M. (2012). Tratamientos convencionales y medicina alternativa de la Ulcera péptica. *Revista Cubana de Farmacia*, 46(1), 127–137.
108. Rivera-Castañeda G., Martínez-Téllez M., Vallejo-Cohen S., Alvarez-Manilla G., Vargas-Arispuro I. (2001). In vitro Inhibition of Mycelial Growth of *Tilletia indica* by Extracts of Native Plants from Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol 19, N° 2. 213-217.
109. Rojas, J., Mender, T., Rojas, L., Gullien, E., Buitrago, A., Lucena, M., et al. (2011). Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Mérida y Miranda, Venezuela. *Avances en Química*, 6(3), 89-93.
110. Romero, R., Morales, P., Pino, O., Cermeli, M., & González, E. (2015). Actividad insecticida de seis extractos etanólicos de plantas sobre mosca blanca. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 23–28.
111. Rorer, J. B. (1918). Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del cacao. Report presented to the President and members of the Agricultural.
112. Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., & Milillo, M. A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine*, 14, 727–732.
113. Ruiz Ortiz, J. israel. (2013). Efecto Insecticida del Extracto de Ruda (*Ruta graveolens*) y Albahaca (*Ocimum basilicum*) para el Control de *Tribolium castaneum* Bajo Condiciones de Laboratorio. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
114. Ryding, O. (2010). Pericarp structure and phylogeny of tribe Mentheae (Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 285(3), 165–175.
115. Saldaña Medina, J. R., & Torres Vintimilla, M. V. (2012). Efecto analgésico de aceites esenciales de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), ruda (*Ruta*

- graveolens*), formulados como conos nasales. Universidad de Cue. 08 de marzo de 2015. Revisado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2465>
116. San-blas, E., Carrillo, Z., & Parra, Y. (2012). Archives of Phytopathology and Plant Protection Effect of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and their exudates on *Moniliophthora roreri*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 37-41.
 117. Sanchez Aspajo, S. y Curitima Ahuanari, E. (2016). “actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (PAICO), por el metodo de macrodilucion en caldo frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, Iquitos 2015”. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
 118. Sánchez, M. D. F., & Fiallos, G. R. F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. Scientia Agropecuaria, 3, 249–258.
 119. Santiago, J. A., Cardoso, M. D. G., Batista, L. R., Castro, E. M. de, Teixeira, M. L., & Pires, M. F. (2016). Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 38(2), 139.
 120. SENASAG. (2012). Resolucion Administrativa N° 1340001. 31 de Octubre de 2012. Revisado de <http://www.senasag.gob.bo/descarga-documentos/category/5202-sanidad-vegetal-normativas-resoluciones-2012.html?download=1021:resolucion-administrativa-n-134-2012>.
 121. Shah, H. (2014). Antibacterial and antifungal activities of the crude extracts from the stem of *Chenopodium ambrosioides* Linn. an indiginous medicinal plant. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 8(8), 231–234.
 122. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. (R. Pinzón, Ed.) (Primera Ed). Santa fe de Bogota, Colombia: Convenio Andrés Bello.
 123. Soares, C. D., Freire de Carvalho, M. G., Andrade de Carvalho, R., Pereira Trindade, S. R., Meneses do Rêgo, A. C., Araújo-Filho, I., & Martins Marques,

- M. (2015). *Chenopodium ambrosioides* L. extract prevents bone loss. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 30(12), 812–818.
124. Song, K., Zhang, J., Zhang, P., Wang, H.-Q., Liu, C., Li, B.-M., Chen, R.-Y. (2015). Five new bioactive compounds from *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17(5), 482–90.
125. Suárez, C. (1971). Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cif & Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Guayaquil, Ecuador.
126. Takhtajan, A. L. (1980). Outline of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*). *The Botanical Review*, 46(3), 225–359.
127. Tane, P., Vilarem, G., & Cerny, M. (2010). Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* species. *Pharmaceuticals*, (3), 2900-2909.
128. Teodoro, A. F. (2003). *Fitomedicina, 1100 plantas medicinales*. (Troncoso, Ed.). Lima, Peru.
129. Vargas, A., Somarriba, E., & Carballo, M. (2005). Dinámica poblacional del chinche (*Monalonion dissimulatum* Dist) y daño de mazorcas en plantaciones orgánicas de cacao del Alto Beni. *Agroforestería en las Américas*, (43-44), 72-76.
130. Vásquez Covarrubias, D., Montes Belmont, R., Jiménez Pérez, A., Flores Moctezuma H. (2014). Aceites Esenciales y Extractos Acuosa para el Manejo in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 31, N° 2, 170-179.
131. Verpoorte, R. (2000). Metabolic engineering of plant secondary metabolism. In R. Verpoorte & A. W. Alfermann (Eds.) (p. 29). Dordrecht: Kluwer Publishers.
132. Vidaurre de La Riva, P. J. (2006). Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 1, 268–284.
133. Villamil Carvajal, E. J., & Blanco Valbuena, O. J. (2012). Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora*

- roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín, 65(1), 6305–6315.
134. Villavicencio Vásquez, M. E. (2010). “Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana”.
135. Vita, G. F., Ferreira, I., da Costa Pereira, M. A. V, Sanavria, A., Aurnheimer, R. de C. M., Barbosa, C. G., Vasconcellos, H. V. G. (2015). Eficacia de *Chenopodium ambrosioides* (erva-de-santa-maria) no controle de endoparasitos de *Coturnix japonica* (codorna japonesa). Pesquisa Veterinaria Brasileira, 35(5), 424–430.
136. Wei, H., Liu, J., Li, B., Zhan, Z., Chen, Y., Tian, H., Gu, X. (2015). The toxicity and physiological effect of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Protection, 76, 68–74.
137. Wei, L., Yu, L., & Xue-zhi, Z. (2013). In Vitro Bactericidal Activity of *Jinghua Weikang* Capsule (荆花胃康胶丸) and Its Individual Herb *Chenopodium Ambrosioides* L. against Antibiotic-Resistant *Helicobacter Pylori*. Chin J Integr Med, 19(1), 54-57.
138. Wilson, C. L., Ghaouth, A. El, & Wisniewski, M. E. (1999). Prospecting in nature’s storehouse for biopesticides. 17:49-53. Rev. Mex. Fitopatol., 17, 49–53.
139. Wolters B. y Eilert U. (1981). Antimicrobial Substances in Callus Cultures of *Ruta graveolens*. Journal of Medicinal Plant Research. Vol. 43, pp. 166—174.
140. Wood, J. R. I. (2011). *Clinopodium* L. (Lamiaceae) in Bolivia. Kew Bulletin, 66(2), 199–226.
141. Wu, T., Shi, L., Wang, J., Iou, S., Chang, H., Chen, Y., et al. (2003). Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. J. Chin. Chem. Soc., (50), 171-178.

142. Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-p, L., L, E., et al. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 293-299.
143. Zavaleta-Mejía, E. (2000). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra*, 17(3), 201-207.
144. Zhu, W. X., Zhao, K., Chu, S. S., & Liu, Z. L. (2012). Evaluation of essential oil and its three main active ingredients of Chinese *Chenopodium ambrosioides* (family: Chenopodiaceae) against *Blattella germanica*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 6(2), 90–97.

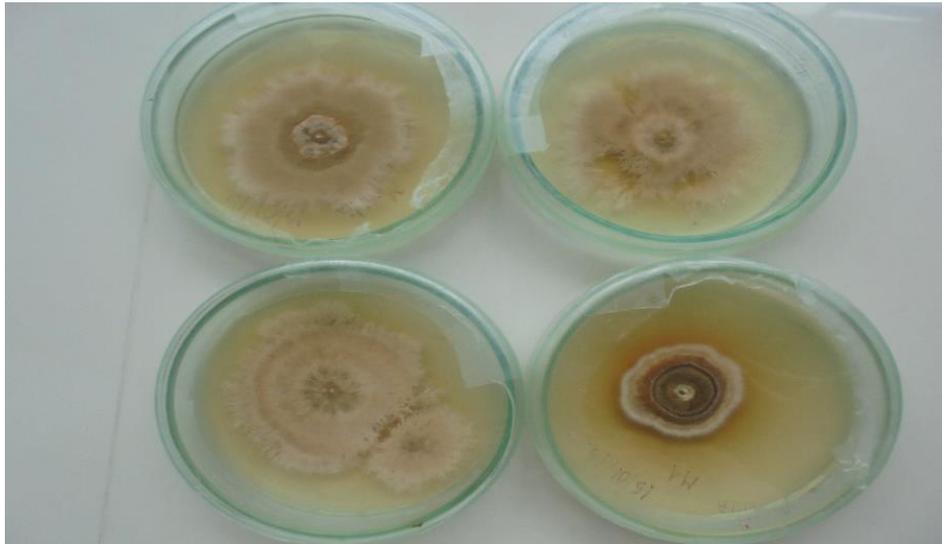
12. ANEXOS



Cacaotal de la población de Sapecho.



Recolección de la muestra de mazorca de cacao con moniliasis.



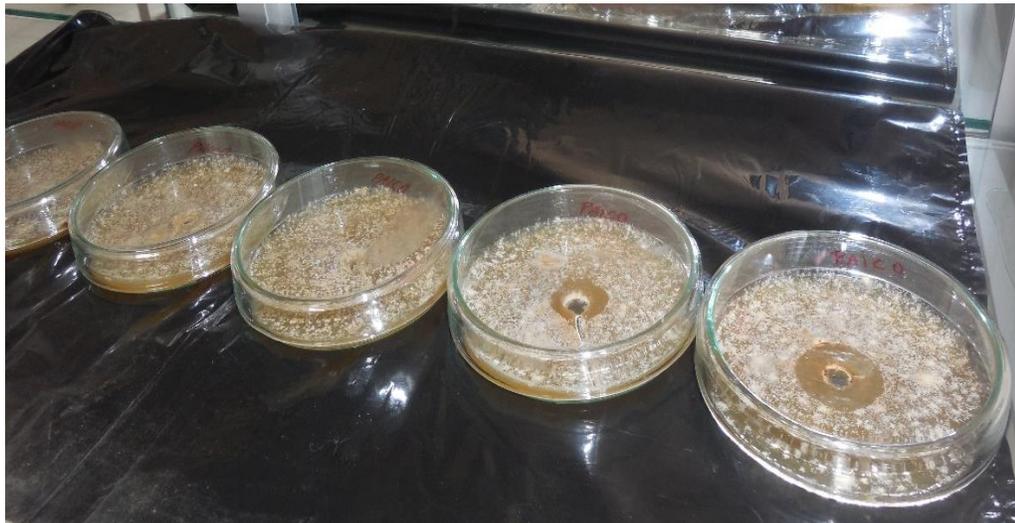
Aislamiento del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.



Análisis fitoquímico de los extractos.



Cultivos líquidos de *Moniliophthora roreri*.



Bateria de cajas Petri de la Prueba de Inhibición en pozo central.

