



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERA BIOQUÍMICA

**Evaluación de la actividad nematocida *In Vivo* de compuestos activos
difundidos en una matriz polimérica frente a *Meloidogyne*.**

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa la obtención del Título de Ingenieros Bioquímicos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Trabajo de Titulación es parte del proyecto de investigación: “Desarrollo de películas biodegradables activas a partir de harina de plátano (género *Musa*) de rechazo y su aplicación agroalimentaria”. Aprobado por el H. Consejo Universitario con resolución 1313-CU-P-2015. Coordinado por Mirari Arancibia, PhD.

Autor: Ximena Estefanía Salinas Pérez

Tutor: Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria

Ambato – Ecuador.

Enero-2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 27 de noviembre de 2019



Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria.

C.I. 180214246-1

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Ximena Estefanía Salinas Pérez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Srta. Ximena Estefanía Salinas Pérez

C.I. 180442088-1

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....
Presidente del Tribunal

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

.....
Ph.D. Carlos Alberto Rodríguez Meza

C.I. 180216650-2

Ambato, 13 de enero de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Srta. Ximena Estefanía Salinas Pérez

C.I. 180442088-1

AUTORA

DEDICATORIA

*Esta tesis esta dedica en memoria de mi abuelita Gloria (Mami Loli),
quien me apoyo siempre y lo sigue haciendo desde el cielo.*

*A mis padres Ximena y Guillermo, por su sacrificio, trabajo y afecto
en todos estos años.*

*A mi hermano Diego que con su ejemplo y apoyo incondicional me
motivó a ser cada día mejor.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por brindarme salud y darme las fuerzas necesarias para superar las dificultades a lo largo de este proceso.

A la doctora Mirari Arancibia por su paciencia y tiempo brindado para realización de este trabajo de investigación.

Al doctor Carlos Vázquez por su apoyo incondicional además de sus conocimientos para la redacción de este proyecto.

A la ingeniera Normita Telenchana por sus conocimientos compartidos y apoyo, para que se pueda desarrollar este trabajo de investigación.

A la empresa Isabrubotanik S.A. por permitirme usar sus instalaciones, así como también por la donación de los aceites esenciales

A mis amigos Andrés, Erika y Lizbeth que con su motivación, afecto y preocupación brindada durante la presente además de compartir buenos momentos durante la carrera universitaria.

Agradezco a todos los profesores que compartieron su conocimiento. A mis compañeros que compartieron buenos momentos con mi persona.

A mi familia abuelito (Papi Loli), mi madrina (Carmita), tías y tíos por brindarme su apoyo incondicional para llegar a cumplir mis metas propuestas.

INDÍCE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
INDÍCE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN EJECUTIVO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I.....	13
1.1. Antecedentes Investigativos	13
1.1.1 Tomate de riñón (<i>Solanum lycopersicum</i>) en el Ecuador	13
1.1.2 Técnicas de Cultivo de tomate de riñón (<i>Solanum lycopersicum</i>)..	13
1.1.3 Nematodos Fitoparasitarios	15
1.1.4 Manejo de nematodos fitoparasitarios	17
1.1.5 Aceites esenciales (AE).....	18
1.1.6 Películas de almidón biodegradables.....	21
1.2. Hipótesis.....	22
CAPÍTULO II	23
2.1 Elaboración de bolsas biodegradables a partir de harina de plátano verde.	23
2.2 Extracción de huevos de nematodos en el embudo de Baermann.	24
2.3 Ensayo de siembra	24
2.4 Infección de tomate en macetas.	25
2.5 Análisis de muestra	25
2.6 Análisis estadístico	26
CAPÍTULO III.....	27

3.1. Análisis y discusión de resultados	27
3.1.1. Efecto nematocida de aceites esenciales	27
3.1.2. Verificación de la Hipótesis	35
CAPÍTULO IV	36
4.1 Conclusiones	36
4.2 Recomendaciones	36
MATERIALES DE REFERENCIA	37
5.1. Referencias Bibliográficas.....	37
ANEXOS	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de los compuestos químicos principales del aceite esencial de Orégano.....	20
Tabla 2. Porcentaje de los compuestos químicos principales del aceite esencial de Tipo Muña.....	21
Tabla 3. Porcentaje de los compuestos químicos principales del aceite esencial de Palo Santo.....	21
Tabla 4. Factores, niveles y codificación para análisis estadístico.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del nemato del nudo de raíz <i>Meloidogyne incognita</i>	16
Figura 2. Efecto nematocida de aceites esenciales en la matriz polimérica semana 2. A: Distancia de 0,5 cm de la matriz polimérica con la plántula. B: Distancia 1,5 cm de la matriz polimérica con la plántula	27
Figura 3. Efecto nematocida de aceites esenciales en la matriz polimérica semana 3. A: Distancia de 0,5 cm de la matriz polimérica con la plántula. B: Distancia 1,5 cm de la matriz polimérica con la plántula.	28
Figura 4. Efecto nematocida de aceites esenciales en la matriz polimérica semana 4. A: Distancia de 0,5 cm de la matriz polimérica con la plántula. B: Distancia 1,5 cm de la matriz polimérica con la plántula.	29
Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizada para Nematodos.....	30
Figura 6. Superficie de respuesta estimada Distancia vs Tiempo.....	31
Figura 7. Superficie de respuesta estimada Aceite esencial vs Distancia.....	31
Figura 8. Superficie de respuesta estimada Aceite esencial vs Tiempo.....	32

RESUMEN EJECUTIVO

El tomate de riñón en el Ecuador es de suma importancia, sin embargo, la rentabilidad ha ido disminuyendo por distintos factores, entre ellos la presencia del nematodo *Meloidogyne* causante del problema fitosanitario “nódulos radicales”. Frente a esta problemática es necesario buscar alternativas menos contaminantes de bajo impacto ambiental, entre las cuales se incluye el uso de compuestos naturales de plantas, puesto que se ha demostrado la actividad antimicrobiana e insecticida de muchos de sus compuestos volátiles, especialmente los aceites esenciales. La presente investigación se basó en evaluar *in vivo* el efecto nematicida de tres aceites esenciales: *Bursera graveolens* (palo santo), *Minthostachys mollis* (tipo muña), *Origanum vulgare* (orégano) difundidos en una matriz polimérica (bolsas de agrocultivo biodegradables), las mismas que se elaboraron empleando la técnica de moldeo o “casting” en bicapa, con glicerol al 1,5 % w/v en la primera capa y 4 % v/v de cada aceite esencial en la segunda capa. Los mejores resultados para la actividad nematicida se obtuvieron entre la semana 2 y 3 después de la siembra. El aceite esencial que presentó mayor actividad nematicida fue palo santo, seguido de orégano, mientras que tipo muña fue el menos efectivo frente *Meloidogyne*, además se observó que la distancia a la que se realizaron los muestreos no fue un factor significativo. Aunque se observó efecto nematicida de los aceites durante la semana 4, este fue menor. Basados en los resultados obtenidos el uso de matrices poliméricas podrían ser una alternativa para el manejo de *Meloidogyne* en sustitución de nematicidas sintéticos.

Palabras clave: aceites esenciales, *Bursera graveolens*, *Minthostachys mollis*, *Origanum vulgare*, *Meloidogyne*.

ABSTRACT

Kidney tomatoes in Ecuador are of the utmost importance, however, profitability has been declining due to different factors, including the presence of the *Meloidogyne* nematode causing the phytosanitary problem "radical nodules." Faced with this problem, it is necessary to seek less polluting alternatives with low environmental impact, among which the use of natural plant compounds is included, since the antimicrobial and insecticidal activity of many of its volatile compounds, especially essential oils, has been demonstrated. The present investigation was based on evaluating in vivo the nematicidal effect of three essential oils: *Bursera graveolens*, *Minthostachys mollis*, *Origanum vulgare* diffused in a polymer matrix (biodegradable agricultural bags), the same which were made using the bilayer molding or casting technique, with 1.5 % w / v glycerol in the first layer and 4 % v / v of each essential oil in the second layer. The best results for nematicidal activity were obtained between week 2 and 3 after sowing. The essential oil that presented the greatest nematicidal activity was palo santo, followed by oregano, while muña type was the least effective against *Meloidogyne*, it was also observed that the distance at which the sampling was performed was not a significant factor. Although the nematicidal effect of the oils was observed during week 4, this was lower. Based on the results obtained, the use of polymeric matrices could be an alternative for the management of *Meloidogyne* instead of synthetic nematicides.

Keywords: essential oils, *Bursera graveolens*, *Minthostachys mollis*, *Origanum vulgare*, *Meloidogyne*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1 Tomate de riñón (*Solanum lycopersicum*) en el Ecuador

El tomate siendo un producto nativo de América tiene como característica ser un componente principal en la dieta a nivel mundial. Es un vegetal que contiene una fuente rica en vitaminas A y C, además es bajo en calorías.

El tomate pertenece a la familia *Solanaceae*. **López ,(2017)** menciona que es una planta dicotiledónea y herbácea perenne, la misma que se desarrolla de manera anual para la cosecha de sus frutos. **Amaguaña, (2015)** la gran parte de obtención de tomate de riñón en el Ecuador se encuentran a campo abierto (costa), aunque este cultivo es de suma importancia en la Sierra central, aproximadamente cerca de 1250 hectáreas de tomate de riñón se plantan en invernadero, dichos cultivos se localizan principalmente en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi y Azuay.

La obtención de tomate en Ecuador se efectúa en climas cálido-templado con temperaturas promedio de 16 °C a 20 °C bajo cubierta, para alcanzar una producción y desarrollo óptimo en la sierra ecuatoriana **Villavicencio & Vásquez, (2008)**. La variación de temperatura brusca genera un impacto instantáneo en la planta transformando los procesos biológicos. Mientras que temperaturas iguales o inferiores a 12 °C ocasionan una reducción en la toma de nutrientes del suelo y crecimiento, entretanto que a temperaturas elevadas a 32 °C interrumpen la floración con la subsecuente caída de la producción del fruto, además se eleva el consumo de agua y nutrientes (**Borja, 2012**).

1.1.2 Técnicas de Cultivo de tomate de riñón (*Solanum lycopersicum*).

En condiciones sencillas, la manera cómo funciona la planta de tomate en respuesta a las condiciones ambientales y manejo del cultivo. En el momento que se siembra el tomate en invernadero la actividad (crecimiento, formación de racimos flores, desarrollo de frutos, entre otros) difiere al de cultivo a campo abierto, a causa de las variaciones en la temperatura **Escobar & Lee, (2009)**. Del mismo modo, las prácticas de manejo como fertilización o podas hacen que funcione de una u otra manera.

Siembra y germinación.

La semilla de tomate es plana y de forma lenticular. Frecuentemente, un gramo de semillas contiene de 250 a 350 semillas según la variedad. Debido a los costos que simbolizan nuevas tecnologías de obtención de plántulas, las semillas deben ser de alta calidad para que se garantice una rápida germinación, buena uniformidad y plantas fuertes. Las múltiples ventajas que presenta el empleo de las bandejas de proliferación como el uso más eficaz de la semilla, a causa de sembrar una semilla por celda; la comodidad con la que se puede trasladar las plántulas de un lugar a otro; el ahorro del sustrato y el reducido deterioro al sistema radicular **Escobar & Lee, (2009)**.

De igual manera proponen que debe colocarse la semilla a una profundidad aproximadamente de 5 o 10 milímetros, además para mantener la humedad de deberá enterrar con el mismo sustrato en que fue sembrada. La aireación es importante para que exista una correcta germinación de la semilla de tomate, por esta razón es indispensable precaver la saturación del sustrato con agua. Por otra parte, la temperatura apropiada para la germinación está entre 23 y 25 °C. Otro aspecto a mencionar es el tiempo necesario para la germinación cambia según la variedad y el lote de semillas, pero usualmente la germinación y desarrollo de las plantas se produce entre los 3 y 6 días después de la siembra.

Trasplante

Es el paso de las plántulas del semillero al sitio final, el cual se realiza alrededor de 30 y 35 días luego de sembrado el semillero, de acuerdo a la calidad y robustez de la planta **(Jaramillo, Rodríguez, Guzmán, Zapata, & Rengifo, 2007)**.

Sandoval & Calipa, (2015), sostienen que, anticipadamente al trasplante se debe reducir la cantidad de riego para promover mayor resistencia y tolerar el estrés del trasplante. Por lo que hay que trasplantar plantas que mantengan condiciones de desarrollo y fitosanitarias se encuentren en perfecto estado conforme a la recomendación técnica, además se menciona que esta actividad se debe ejecutar en horas de la mañana o tarde.

Riego

Para efectuar esta actividad se debe tener conocimiento hídrico del cultivo de tomate riñón para tener una buena productividad y que permita calcular la necesidad de agua y la forma de suministro sea natural o por un sistema de riego mixta, actividades que

deben estar respaldadas por el técnico responsable, además se sugiere llevar registros sobre la aplicación de agua para riego del cultivo (**Sandoval & Calipa, 2015**).

1.1.3 Nematodos Fitoparasitarios

Los nematodos fitoparasitarios de las plantas son plagas importantes de la mayoría de los cultivos del mundo. Las estimaciones de pérdida de cultivos generalmente oscilan entre 5% y 15% pero a veces ocurren mayores pérdidas, y hay situaciones en las que los nematodos son un factor importante que limita la producción de un cultivo en particular (**Stirling, 2014**).

Según **Guzmán, Castaño, & Villegas, (2012)**, la palabra nematodo, procede del griego *nema* que significa “hilo” y *eidés* u oídos, que significan con respecto de, descrito así animales con características filiformes, cuerpo sin segmentos y poco transparentes, envueltos de una cutícula hialina, la cual está compuesta por estrías u otras marcas además son ovalados en sección transversal, con boca, sin extremidades u otros apéndices, varios de estos se parecen a las lombrices o tienen forma de anguila. Además, sostiene que los nematodos están en casi todos los ambientes, son esencialmente acuáticos. En su mayoría son microscópicos miden entre 300 y 1000 μm de largo y su ancho oscila entre 15 y 35 μm ; debido a su tamaño los hace invisibles a simple vista, por lo tanto, con la ayuda de un microscopio o estereoscopio pueden ser observados fácilmente.

Según el género los nematodos fitoparásitos tienen una región anterior (cabeza), un estilete hueco (estomatoestilete u odontoestilete) también llamado “lanza” o hay algunos con estilete sólido modificado (onquistilete). El estilete es usado para perforar o penetrar las células de las plantas, por medio del cual se puede extraer nutrientes siendo este el principal causante de enfermedades en diferentes cultivos (**Guzmán et al., 2012**).

Riascos Ortíz, (2014) manifiesta que mediante el estilete los nematodos secretan compuestos y remueve nutrientes al interior de las células de la planta. Los nematodos pueden alimentarse fuera (ectoparásitos) o dentro (endoparásitos) de las raíces. Por otra parte, algunos nematodos son migratorios (se mueven durante su ciclo de vida) mientras que otros son sedentarios (se establecen permanentemente en su sitio de alimentación).

Nematodo de Agalla (*Meloidogyne*)

Siendo los más importantes los nematodos del nudo radical, son endoparásitos sedentarios. La palabra *Meloidogyne* es de origen griego y significa hembra con forma de manzana (**Perry, Moens, & Starr, 2009**).

Sijmons, (1997) describe que en el ciclo de vida se puede visualizar en seis estadios: huevos, cuatro estadios juveniles y adultos. **Castillo, (2014)** menciona que los más infectivos en los nematodos son el segundo estadio juvenil (J2). Por consiguiente, se incrustan en la raíz donde empezarán a alimentarse y se convertirán en sedentarios, luego pasarán a J3 seguidamente J4 tanto que, cuando las condiciones son favorables los J4 se desarrollan como hembras, pero en condiciones con limitaciones de recursos ellos se desarrollan como machos fuera de la raíz.

Del mismo modo (**Guzmán et al., 2012**) argumentan que al ser endoparásitos sedentarios se caracterizan porque las hembras inmaduras y juveniles desarrollan un sitio fijo de alimentación e inducen la formación de un sistema trófico sofisticado de células de abrigo (cuidar, criar) llamado sincitia (células fíntes) dentro del tejido de las plantas, logran ser inmóviles, adquieren una forma abultada para depositar los huevos.

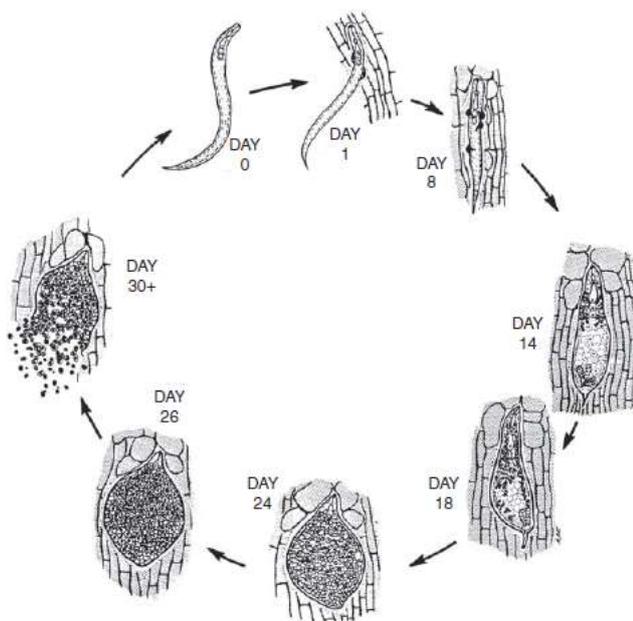


Figura 1. Ciclo de vida del nemato del nudo de raíz *Meloidogyne incognita*.

Fuente: Stirling, 2014

El parasitismo por nematodos del nudo radical es caracterizado por la creación de sitios de alimentación permanentes a manera de células gigantes en el córtex, endodermis,

periciclo y parénquima vascular de las raíces del hospedero. Los sitios de alimentación son sumideros de azúcares provenientes de la fotosíntesis, por lo cual los nematodos del nudo radical retrasan el crecimiento y desarrollo vegetal. En adición, la deformación y bloqueo de tejidos vasculares en los sitios de alimentación limita la translocación de agua y nutrientes, por lo tanto ocurre supresión del crecimiento vegetal y producción del cultivo **(Riascos Ortíz, 2014)**.

Las infecciones causadas por los nematodos fitoparásitos pueden resultar en la aparición de síntomas en raíces y tejidos aéreos de las plantas. Generalmente, los daños causados por los fitonematodos son reflejados en las raíces en menor cantidad y su longitud (supresión del crecimiento), especialmente en raíces secundarias de alimentación, generando un desarrollo anormal como lo es en nudos o agallas, raíces abultadas y redondeadas, raíces con acumulación anormal de partículas de suelo y residuos de raíces, hiperplasia de raíces, clorosis y marchitamiento o flacidez de hojas **(Guzmán et al., 2012)**.

1.1.4 Manejo de nematodos fitoparasitarios

El control de nematodos fitoparásitos debe hacerse a través de la integración de diferentes estrategias de manejo, de tipo legal, genético, cultural, físico, biológico y químico **(Riascos Ortíz, 2014)**.

El manejo integrado de plagas se ha definido de varias maneras, pero se trata esencialmente de utilizar nuestro conocimiento de la biología de las plagas y plantas para evitar que las plantas causen daños económicos **Stirling, (2014)**. Las distintas estrategias de control deben tomar en cuenta las características taxonómicas, biológicas e interacciones específicas con el cultivo.

Control Químico

La utilización de productos de químicos es empleado con mayor frecuencia, principalmente en el momento que los métodos agronómicos no reducen o eliminan el problema nematológico lo necesario para seguir manteniendo la planta huésped financieramente aceptable. Del mismo modo promueve una contundente reducción de la concentración de la población del nematodo y disminuye las pérdidas a corto plazo. No obstante, está probado que el uso constante y desmedido de compuestos químicos con actividad nematicida es de peligro potencial de contaminación medioambiental alto por lo que puede ser muy tóxico para productores y consumidores **(Andrés, 2002)**.

Control Biológico

La definición de control biológico depende de la palabra “población”. Todo control biológico involucra el uso, de alguna manera, de poblaciones de enemigos naturales también llamados antagonistas, que sirven para reducir poblaciones de plagas o densidades menores, ya sea temporal o permanente (**Driesche, Hoddle, & Center, 2007**).

Stirling, (2014) manifiesta otra alternativa de control biológico la constituye algunas prácticas culturales que mediante el manejo de los residuos vegetales consiguen reducir el desarrollo de nematodos patógenos. Así se han observado efectos nematicidas en los residuos obtenidos en el cultivo de caña de azúcar, de cacao. Aunque no está claro los mecanismos por los que se reducen las poblaciones de los nematodos, es obvio que a partir de este material vegetal se liberan compuestos o metabolitos nematicidas.

Control Orgánico

Pesticidas de este tipo son las primeras generaciones de productos hallados con facilidad, como aceites de animales y moléculas de plantas de uso tradicional. Se ha encontrado que los aceites vegetales son importantes para el control orgánico por ser más heterogéneos y complejos **Hinojosa, (2011)**. Etimológicamente, se define un biopesticida como cualquier pesticida de origen biológico; es decir, los organismos vivos o las sustancias de origen natural sintetizadas por ellos. Con mayor generalidad, se define como todo producto para la protección de los vegetales que no se ha obtenido por vía química (**Regnault-Roger & Vincent, 2004**).

1.1.5 Aceites esenciales (AE).

Ntalli, Ferrari, Giannakou, & Menkissoglu-Spiroudi, (2010b) señalan que los aceites esenciales son extractos volátiles de plantas aromáticas con olor característico, no solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos, compuestos de metabolitos secundarios y comúnmente concentrados en las hojas, la corteza o los frutos. Generalmente se obtienen por destilación al vapor y constituyen mezclas complejas principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos y fenoles Además, por ser altamente volátiles, por lo que deben almacenarse en recipientes herméticos en la oscuridad para evitar cambios en su composición (**Burt, 2007**).

Park, Kim, Lee, & Shin, (2007) mencionan que los aceites esenciales de las plantas pueden proporcionar alternativas potenciales a los agentes de control utilizados

actualmente porque constituyen una rica fuente de productos químicos bioactivos y se usan comúnmente como fragancias y agentes saborizantes para alimentos y bebidas, además se ha informado que los aceites esenciales de plantas y sus componentes tienen actividad nematocida.

Acción biocida de los aceites esenciales

A nivel mundial existen innumerables reportes de aceites esenciales integrados a prácticas agrícolas con acción biocida, en el manejo de enfermedades y plagas agrícolas (Koul, Walia, & Dhaliwal, 2008; Saito, 2004). Los aceites esenciales al presentar esqueleto carbonado en su composición que permite insertarse en la membrana celular convirtiéndola permeable y dispuesto a componentes más tóxicos, dependiendo de la dosis puede impedir la respiración celular hasta la lisis celular (Pérez, 2012).

En particular el uso de aceites esenciales sobre fitopatógenos de manera asilada o en combinación con otros métodos de manejo, pueden tener un importante papel en la reducción del uso de fungicidas y consecuentemente un menor impacto ambiental, de los alimentos, intoxicación de los agricultores y consumidores, eliminación de organismo no objetivo (Koul et al., 2008; Salgado, 2009).

Aceites esenciales con actividad nematocida

Ntalli et al., (2010b) Mencionan que en la investigación sobre el control de *Meloidogyne incognita* se ha propuesto con extractos naturales de origen vegetal compatible con programas de manejo integrado de plagas, los autores actuales informaron recientemente sobre la actividad nematocida de los aceites esenciales de *Lamiaceae* y terpenos puros.

Las plantas son una fuente de pesticidas naturales. De hecho, muchos compuestos con actividad nematocida, tales como alcaloides, fenoles, sesquiterpenos, diterpenos y poliacetilenos. Los aceites esenciales de algunas plantas y sus componentes han sido probados para determinar la actividad nematocida in vitro y en el suelo (Oka, 2001).

Se ha demostrado que varios aceites esenciales inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa en los insectos. Dado que la acetilcolina también sirve como neurotransmisor en los nematodos, los componentes del aceite esencial pueden afectar negativamente su sistema nervioso. Otra posibilidad es que los aceites esenciales rompan la membrana celular del nematodo y cambien su permeabilidad. Los aldehídos utilizados pueden causar cambios irreversibles en las estructuras de proteínas,

especialmente aquellas ubicadas en la superficie del nematodo (**Bargmann, Hartweg, & Horvitz, 1993; Oka, 2001; Ryan & Byrne, 1988**).

Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

El orégano es una hierba aromática perteneciente a la familia Lamiaceae, en medicina tradicional era empleada para tratar trastornos respiratorios, dispepsia, entre otros. El orégano es de gran importancia económica debido a su uso como especia y como aceite esencial. El aceite esencial es rico en compuestos fenólicos y tiene fuertes actividades antioxidantes, antimicrobianas, citotóxicas y antifúngicas (**Bolechowski et al., 2011**). De acuerdo con (**Cueto, 2010; Ntalli, Ferrari, Giannakou, & Menkissoglu-Spiroudi, 2010; Oka et al., 2000**) describen que el aceite esencial de orégano contiene concentraciones altas de timol y carvacrol los cuales han evidenciado actividad nematicida, causando la inmovilidad en estadio juvenil de nematodos de agalla. Como citan en su trabajo el timol, carvacrol, linalol y el mentona son más tóxicos para huevos y J2 de *Meloidogyne incognita*. (**Ibrahim, Traboulsi, & El-Haj, 2006**).

Tabla 1. Porcentaje de los compuestos químicos principales del aceite esencial de Orégano.

Compuesto	%
Carvacrol	14,5
Timol	12,6
β -Fenchyl alcohol	12,8
γ -terpineno	7,5

Fuente: Teixeira et al., (2013)

Aceite esencial de Tipo muña (*Minthostachys mollis*)

Minthostachys mollis en Ecuador es lo conoce como “tipo” o tipillo”. Las hojas aromáticas y las espigas de flores tienen un olor distintivo a menta, y se lo utiliza como digestivo, afrodisíaco, en el tratamiento de infecciones respiratorias, entre otras (**Mora, Araque, Rojas, Ramírez, & Silva, 2009**).

El aceite esencial posee múltiples propiedades, se enfatiza que el aceite es capaz de ser empelado como agente bactericida y plaguicida **Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, (2008)**. Se señala que contiene limoneno, pulegona, carvacrol, mentona, neomentol entre otros **Alkire, Tucker, & Maciarelo, (1994)**. Por lo tanto actúa dependiendo del tipo de microorganismos, principalmente atacando el sistema de la pared celular y la membrana externa de los mismos (**Malagón, Vila, Iglesias, Zaragoza, & Cañigueral,**

2003).

Tabla 2. Porcentaje de los compuestos químicos principales del aceite esencial de Tipo Muña.

Compuesto	%
Neomentol	29,34
Mentona	24
Mentol	20,55
Piperitona	8,96

Fuente: Alkire et al., (1994)

Aceite esencial de Palo santo (*Bursera graveolens*)

Bursera graveolens pertenece a la familia Burseraceae, es un árbol caducifolio que se distribuye en la zona tropical de América Latina y América de Sur. Su material leñoso tiene un fuerte olor a madera y ha sido utilizado para el incienso por los pueblos indígenas por lo cual se le atribuyo el nombre de Palo Santo, además era empleado como analgésico, sedante y para el reumatismo **Young, Chao, Casablanca, Bertrand, & Minga, (2007)** además se informó la presencia de componentes como el limoneno, α -terpineol en el aceite esencial de palo santo. (**Luján et al., 2012; Monzote, Hill, Cuellar, Scull, & Setzer, 2012; Yukawa, Iwabuchi, Komemushi, & Sawabe, 2005**) mencionan que ha encontrado compuestos mono y sesquiterpenoides, transcarveol entre otros. Además, mencionan que contiene β -elemeno, β -ocimeno y mentofurano dichos compuestos presentan actividad nematocida frente a *Meloidogyne incognita* (**Ntalli et al., 2010a**).

Tabla 3. Porcentaje de los compuestos químicos principales del aceite esencial de Palo Santo

Compuesto	%
Limoneno	42,9
β -ocimeno	17,39
β -elemeno	11,82
mentofurano	6,79

Fuente: Luján et al., (2012)

1.1.6 Películas de almidón biodegradables

El almidón al poseer propiedades termoplásticas a nivel molecular en el momento de la disrupción estructural **Villada, Acosta, & Velasco, (2007)**. Además de ser

altamente biodegradable por sus características. Por lo tanto las condiciones como temperatura y el contenido de plastificante influyen en el proceso de termoplastificación (Lu, Xiao, & Xu, 2009; Velasco, Enriquez, Torres, Palacios, & Ruales, 2012). La pérdida de cristalinidad se debe a la ruptura de los enlaces de hidrogeno entre las cadenas de almidón mediante la temperatura, al enfriarse después se forman nuevos enlaces de hidrogeno entre el agua u otros plastificantes y las cadenas de almidón Koch, (2017). Los plastificantes, como el glicerol, el sorbitol y el polietilenglicol se usan a menudo para modificar las propiedades mecánicas (flexibilidad) de la película (García, Martino, & Zaritzky, 2000).

1.2. Hipótesis

1.2.1 Hipótesis nula

Los aceites esenciales de orégano, tipo muña y palo santo analizados a dos distancias no presentan efecto nematocida *In vivo*.

1.2.2 Hipótesis alternativa

Los aceites esenciales de orégano, tipo muña y palo santo analizados a dos distancias presentan efecto nematocida *In vivo*.

1.3. Señalamiento de variables de la Hipótesis

1.3.1 Variables dependientes

Número de nematodos

1.3.2 Variables independientes

Tiempo, distancia y tipo de aceite esencial

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad nematocida *In vivo* de compuestos activos difundidos de una matriz polimérica frente a *Meloidogyne*.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el porcentaje de mortalidad de nematodos mediante la técnica del embudo de Baermann.
- Identificar el aceite esencial que presenta mayor actividad nematocida en la matriz polimérica.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Elaboración de bolsas biodegradables a partir de harina de plátano verde.

Las bolsas se realizaron en base a lo que menciona (**Arancibia, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2014**), con ciertas modificaciones, empleando la técnica de moldeo o “casting” en bicapa.

2.1.1 Primera capa

Se pesó 2 g de harina de cáscara de plátano verde y 2 g de harina de pulpa de plátano verde en una balanza analítica y se diluyó en 100 ml de agua destilada con calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 80 °C o 90 °C con agitación constante por 20 min. Después se redujo la temperatura a 70 °C, seguidamente se añadió el glicerol al 1.50% (w/v) en relación a la solución total. Una vez obtenida la solubilización completa, se pesó 85 g de solución en una bandeja plástica (15x30 cm) y se colocó en una estufa a 50 °C por 5 horas.

2.1.2 Segunda capa

La segunda capa se elaboró pesando 2 g de harina de cáscara de plátano verde y 2 g de harina de pulpa de plátano verde en una balanza analítica, se lo diluyo con 100 ml de agua destilada con calentamiento y agitación constante hasta los 80 °C o 90 °C por 20 min. Luego se redujo la temperatura hasta llegar a 30 °C, se añadió aceite esencial de Tipo Muña, Palo Santo y Orégano con una concentración de 4% (v/v) en cada uno de los aceites esenciales antes mencionados. Se hizo uso de una licuadora para homogenizar la solución durante 10 min, se pesó y vertió 85 g de solución sobre la primera capa y posteriormente se colocó en una estufa a 30 °C por 12 horas.

Una vez que las películas se encontraron secas, se acondiciono a una temperatura de 20-22 °C, empleando un desecador con una solución saturada de NaBr para conservar una humedad relativa del 58% durante 72 horas antes de los análisis de actividad nematicida del film.

Para dar forma a bolsas de agrocultivo a las películas biodegradables, se cortaron de un tamaño de 10x17 cm y se termosellaron con una máquina de termosellado manual de calor constate.

2.2 Extracción de huevos de nematodos en el embudo de Baermann.

La extracción de nematodos a partir de huevos en las raíces infectadas (ver anexo 5) se obtuvo de las raíces de *Solanum lycopersicum* con agallas de la parroquia Izamba del cantón Ambato. Se utilizará la metodología descrita por (Atamian, Roberts, & Kaloshian, 2012) con ciertas modificaciones.

Se realizó una limpieza de las raíces con agua de llave, se maceró los tejidos con ayuda de una licuadora (Oster) para obtener los nematodos endoparásitos. Se tomó aproximadamente 10 gr de raíces, se cortó en trozos de 2 a 3 cm de longitud y se colocó en la licuadora, seguidamente se añadió agua destilada necesaria para cubrir el material y dependiendo de la dureza del material. Se licuó a máxima velocidad por 30 seg y a velocidad baja por 30 seg, la solución obtenida se verterá sobre un juego de tamices: N°60, N°325 y N°200 (ver anexo 9).

Se colocó toallitas (Kleenex) o papel filtro sobre una canasta de malla metálica, en un embudo de vidrio conectado a una manguera.

Se vertió los huevos de nematodos extraídos (solución obtenida del juego de tamices) sobre el papel en la canasta de alambre, se agregó agua suficiente para que la parte inferior de la canasta de alambre toque la superficie del agua, pero no quede sumergida en agua.

Se verificó todos los días la evaporación de agua y se agregó un poco de agua en el embudo para que se mantenga el nivel del agua. Así se evitó que los huevos se sequen. Cada dos días, se recogió el agua que contiene los J2 en el fondo de las mangueras en un vaso de precipitados, brindando constante aireación. Los J2 se recogieron de la trampa establecida durante un periodo de 6 días.

Con un microscopio electrónico se verificó que se encuentren presentes los nematodos *Meloidogyne* (ver anexo 6).

2.3 Ensayo de siembra

Se recolectó suelo procedente de la parroquia Izamba del cantón Ambato. Asimismo, se adquirió las plántulas de tomate en el Cantón Pelileo, Tungurahua con un periodo de vida de 4 semanas después de la siembra.

Para el ensayo de siembra se esterilizó el suelo recolectado, el cual se colocó en macetas (24 cm de diámetro y 12 cm de profundidad), seguidamente se realizó hoyos en el centro de las macetas.

Por otra parte, para el trasplante de las plántulas se lo realizó en horas de la mañana, previamente efectuando un riego a las plántulas y al suelo de siembra, esto para que las plántulas dispongan de humedad necesaria.

Así pues, con mucho cuidado se colocó la plántula con suelo fértil y sano dentro de la bolsa de agrocultivo correspondiente a cada aceite esencial (Orégano, Palo Santo, Tipo Muña) las mismas que se colocaron dentro de las macetas previamente preparadas.

Finalmente, las macetas se colocaron en un prototipo de invernado pequeño (ver anexo 10), controlando su temperatura y humedad relativa diariamente, además se añadió agua en las macetas pasando un día después de la siembra.

2.4 Infección de tomate en macetas.

Se mantiene la metodología descrita por (Atamian et al., 2012).

Se utilizó 3 alícuotas de nematodos recolectados para contar el número de J2 en un plato de conteo (cajas Petri pequeñas de vidrio: divididas en 12 cuadrantes), se calculó el promedio y se determinó el volumen deseado para la inoculación (2500 nematodos por planta).

Antes de inocular las plantas, se aseguró de que el suelo esté húmedo. Para la inoculación, se realizó 8 agujeros de aproximadamente la mitad de la profundidad en el suelo alrededor de cada sistema (bolsa de agrocultivo con la plántula de tomate) con un lápiz. Se inoculó cada maceta mediante una micropipeta los J2 en el suelo. Se mantuvo la planta en un mini invernadero a 16-20 °C durante 4 semanas.

2.5 Análisis de muestra

Se realizó por triplicado, de cada tratamiento (Testigo y Aceites esenciales de Tipo Muña, Palo Santo y Orégano) y el blanco.

El muestreador agrícola (Barreno) fue elaborado con un área de muestreo de 1x5 cm. Se tomaron muestras de suelo a dos distancias 0,5 y 1,5 cm dividiendo a la maceta en a 0°, 120° y 240°, cada semana de muestreo se rotaba 30° para completar el análisis.

Las muestras recolectadas fueron colocadas en fundas pequeñas de plástico con cierre hermético previamente etiquetadas.

Para el análisis de la mortalidad de nematodos se realizó mediante la técnica del embudo de Baermann.

Se pesó la muestra de tierra, seguidamente se colocó sobre las toallitas (Kleenex) en la canasta metálica sobre un embudo de vidrio conectado a una maguera, se añadió

agua suficiente hasta que toque la canasta metálica, se dejó reposar por 48 h además verificando constantemente que el nivel del agua sea constante. Luego se analizó y contó en un microscopio la cantidad de nematodos presentes en cada muestra (ver anexo 8 y 9), en cajas petri pequeñas de vidrio divididas en 12 cuadrantes. El mismo procedimiento se lo realizó en las 4 semanas.

2.6 Análisis estadístico

El ensayo fue conducido en un diseño de experimentos completamente al azar con arreglo factorial de los tratamientos, con los siguientes factores: tiempo de observación (semana), la distancia de colocación del aceite (0,5 y 1,5 cm de la plántula) y el tipo de aceite esencial (orégano, palo santo y tipo muña). Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y aquellos que mostraron diferencias significativas fueron sometidos a comparación de medias según Tukey $p < 0,001$ usando el programa estadístico Statistix para Windows versión 10.0.

Tabla 4. Factores, niveles y codificación para análisis estadístico.

Factores	Niveles	Codificación
Tipo de Aceite esencial	Testigo	0
	Palo Santo	1
	Orégano	2
	Tipo Muña	3
Distancia	0,5	1
	1,5	2
Tiempo	Semana 1	1
	Semana 2	2
	Semana 3	3
	Semana 4	4

Elaborado por: Salinas, 2019.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Efecto nematicida de aceites esenciales

De acuerdo con los datos obtenidos se observó un efecto del tipo de aceite y a la distancia a la cual fue aplicado sobre el efecto de mortalidad de nematodos (Figuras 1-3).

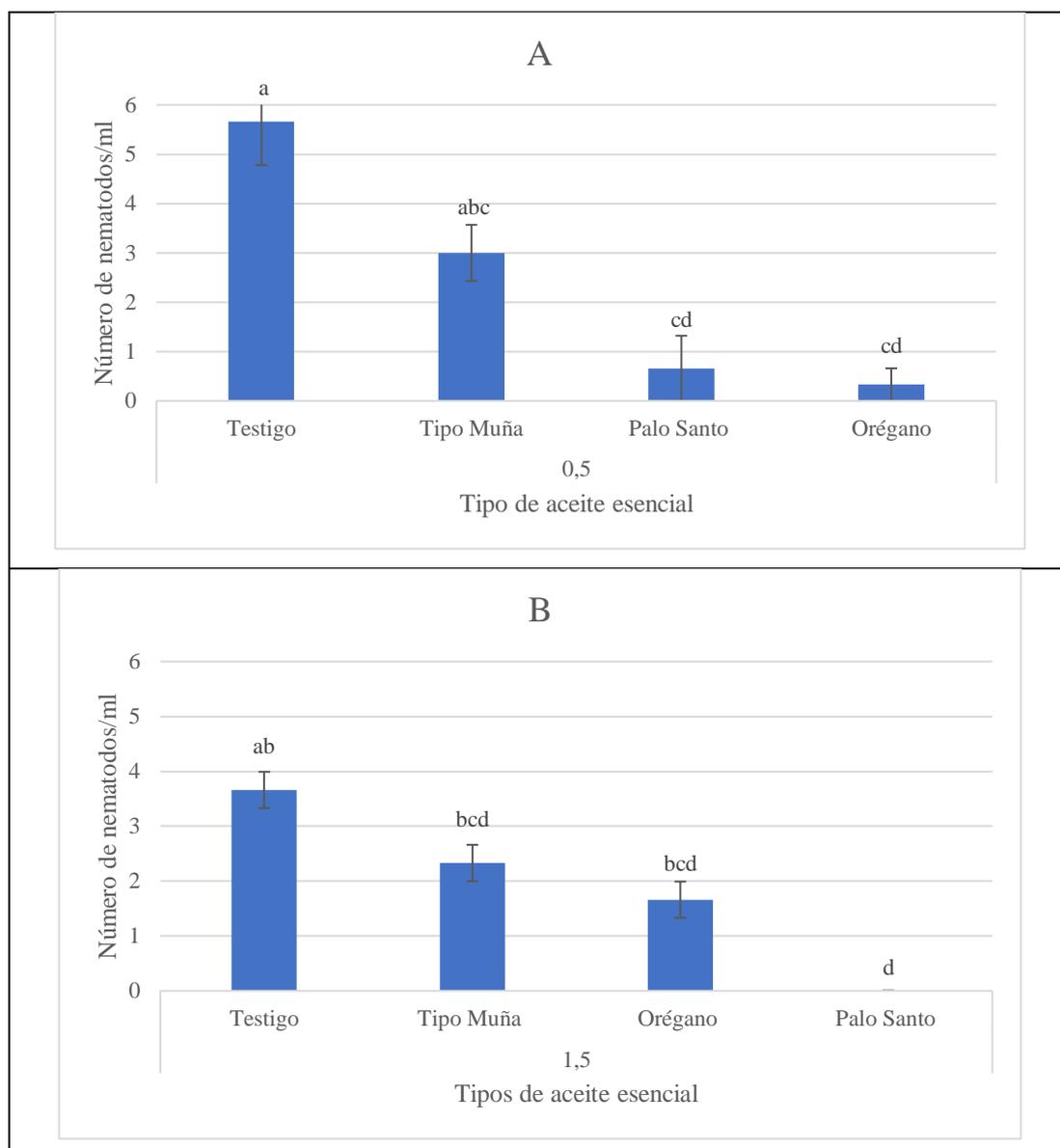


Figura 2. Efecto nematicida de aceites esenciales en la matriz polimérica semana 2.
A: Distancia de 0,5 cm de la matriz polimérica con la plántula. B: Distancia 1,5 cm de la matriz polimérica con la plántula.

En la semana 2 el aceite de orégano colocado a 0,5 cm provocó la mayor disminución en el número de nematodos alcanzando un 94,1% de control, seguido del aceite esencial de Palo Santo con un 88,3%. Por el contrario, el aceite esencial de Tipo Muña mostró un menor efecto, el cual fue 49,6% en comparación con el testigo. En el caso de las muestras de suelo tomadas a 1,5 cm de la matriz polimérica se observó que tanto el testigo como el aceite esencial Tipo Muña se comportaron de manera similar al caso anterior, no obstante, en cuanto los aceites esenciales de Orégano y Palo Santo mostraron comportamientos diferentes siendo el más efectivo Palo Santo.

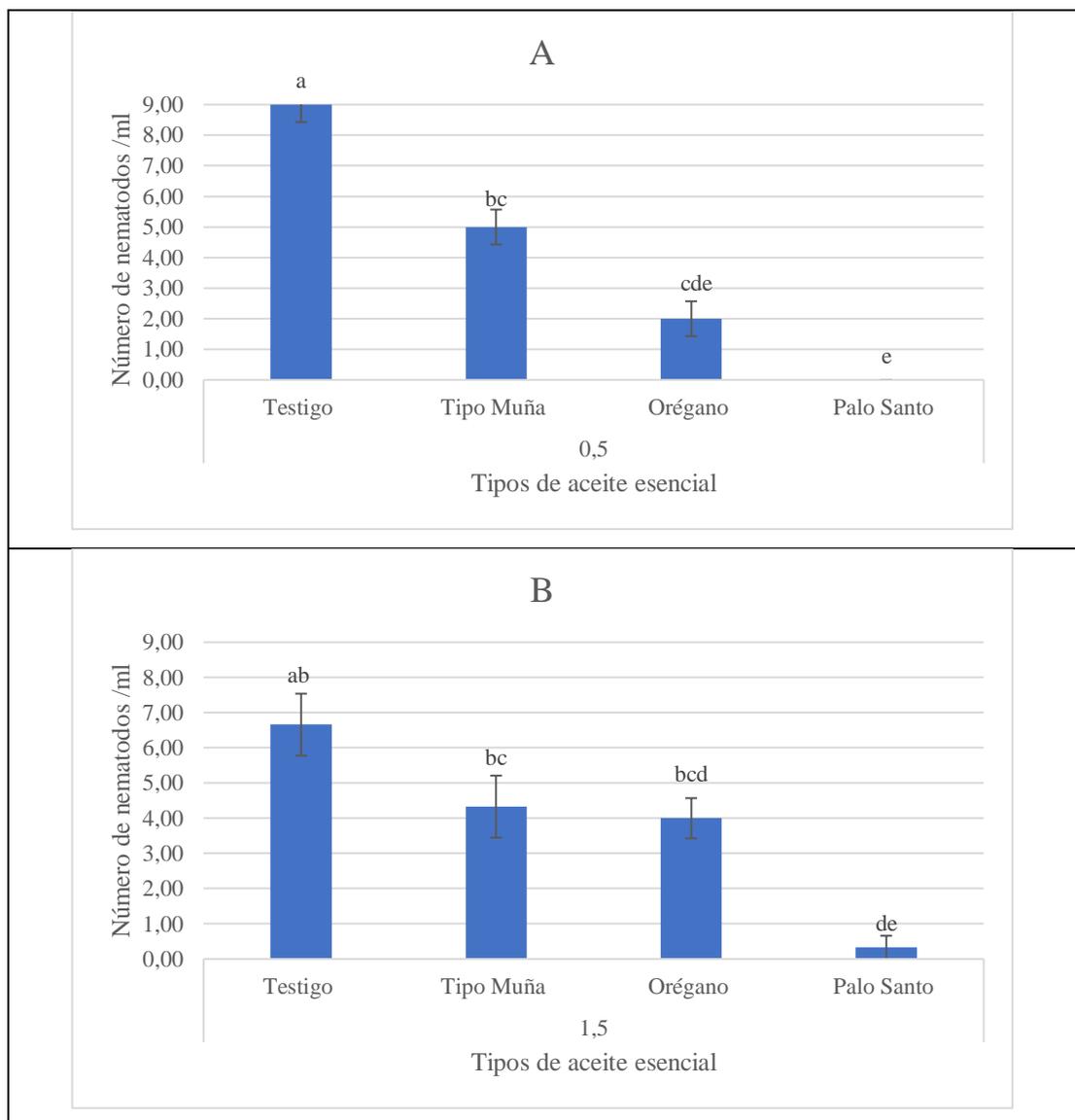


Figura 3. Efecto nematicida de aceites esenciales en la matriz polimérica semana 3. A: Distancia de 0,5 cm de la matriz polimérica con la plántula. B: Distancia 1,5 cm de la matriz polimérica con la plántula.

En cuanto a la semana 3, en muestras tomadas a 0,5 cm se observó control total de nematodos cuando se usó aceite esencial de Palo Santo (100%), seguido de Orégano con el 77,7%, mientras que el aceite de Tipo Muña continuó mostrando ser menos efectivo como nematicida con valores de control de 44,4%. En cuanto a la distancia de 1,5 cm se mantiene el mayor control con Palo Santo (95,0%), no obstante, los aceites esenciales de Orégano y Tipo Muña tienen efectos similares con el 39,9% y 34,9% respectivamente.

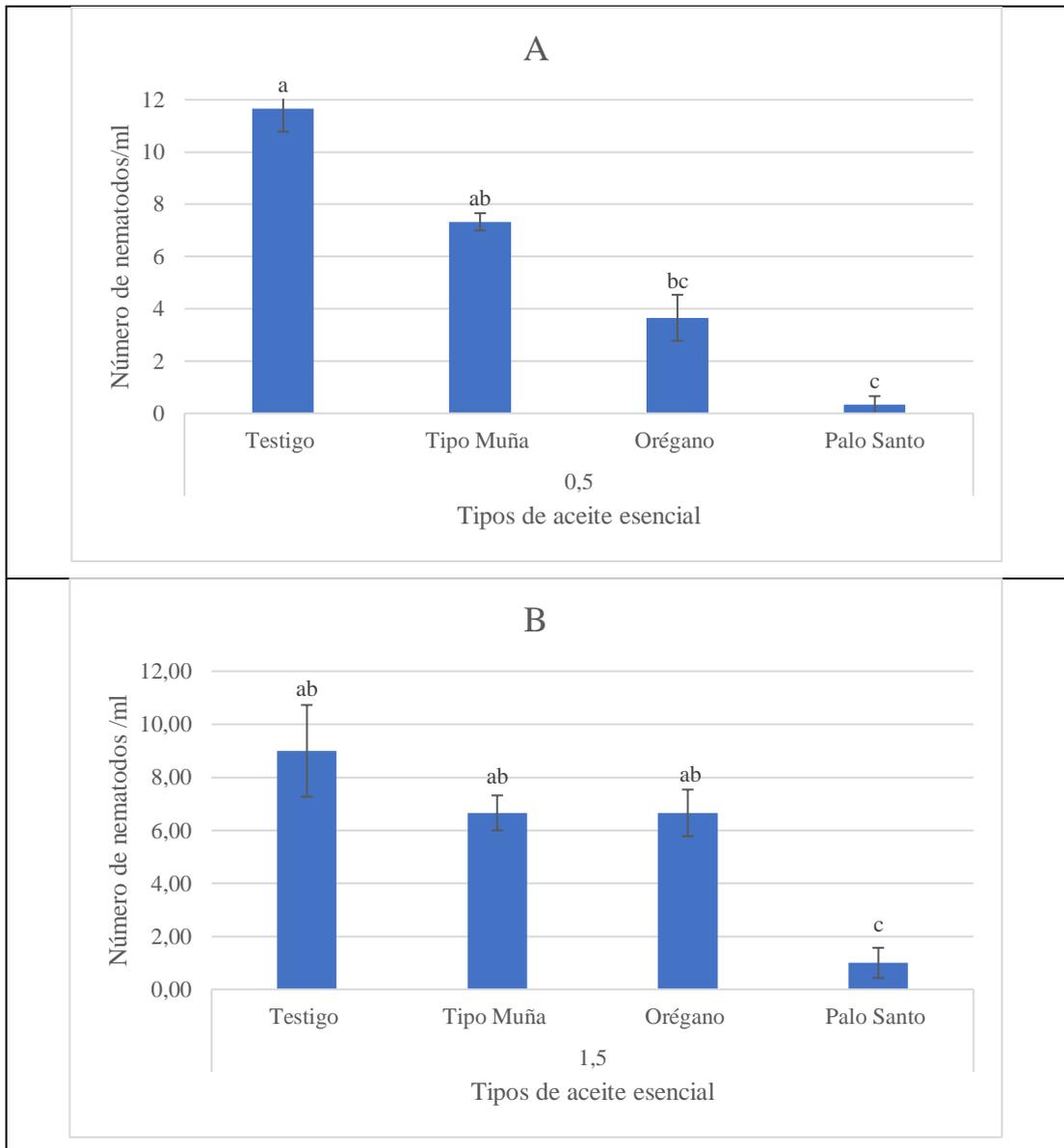


Figura 4. Efecto nematicida de aceites esenciales en la matriz polimérica semana 4. A: Distancia de 0,5 cm de la matriz polimérica con la plántula. B: Distancia 1,5 cm de la matriz polimérica con la plántula.

Por lo que se refiere a la semana 4, en general se observó un alto número de nematodos en el suelo de los diferentes tratamientos, lo cual sugiere una disminución de la actividad nematocida de los aceites evaluados. Sin embargo, se evidenció que la tendencia observada durante las semanas anteriores se mantuvo, notándose que a la distancia de 0,5 cm el aceite de Palo Santo y orégano controlaron en 97,1 y 63,6%, respectivamente. Concomitantemente, el aceite esencial Tipo Muña con el 37,1% es el que menos impacto presentó ante los nematodos. Un comportamiento similar se observó en muestras tomadas a 1,5 cm.

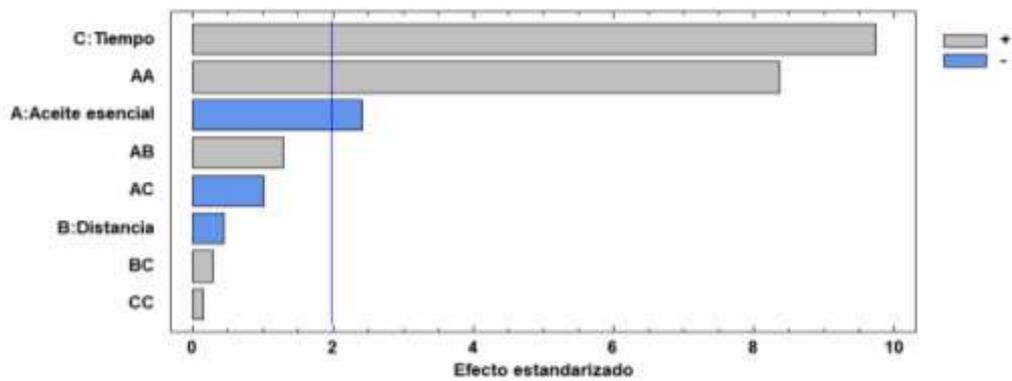


Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizada para Nematodos.

Por otro lado al realizar el estudio de los efectos estandarizados en el diagrama de Pareto, donde se evidencia que los factores que se localizan por debajo del cero no presentan significancia en el estudio, mientras que son significativos aquellos que están sobre el cero (Figura 5), así pues se visualiza que los factores más significativos son C, AA y A, por lo que se contribuye al factores C y AA como los más influyentes en el estudio de mortalidad de nematodos, el signo positivo indica relación tiempo- aceite esencial son factores determinantes en la baja cantidad de nematodos.

Con respecto a las gráficas de superficie de respuesta para este estudio se ilustran en las Figuras 6-8, el diseño se compone de tres factores, para las gráficas se selecciona dos en cada eje mientras que el restante toma su valor medio.

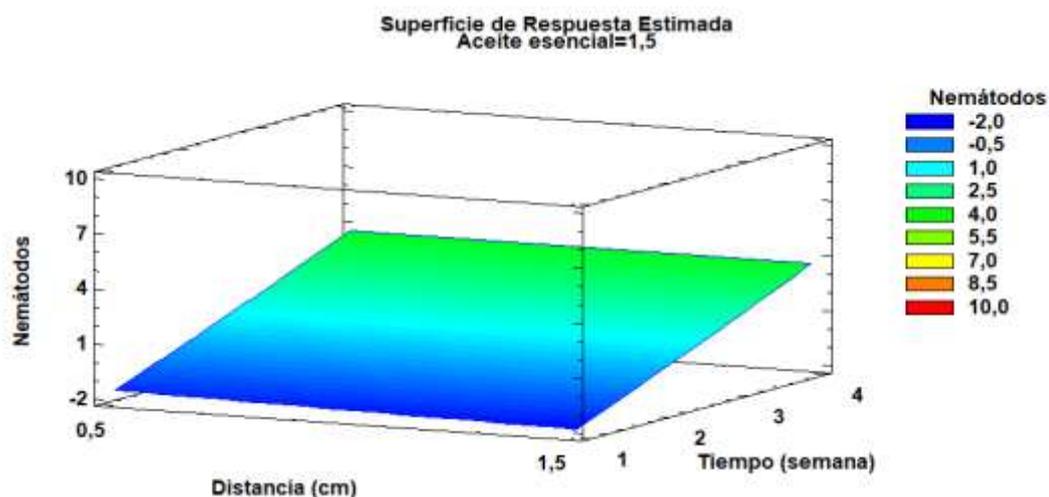


Figura 6. Superficie de respuesta estimada Distancia vs Tiempo

En la Figura 6, se indica el efecto de la distancia y tiempo de análisis, se contempla que la cantidad de nematodos tiene una tendencia creciente, al final del análisis de la semana 4 se observa una mayor cantidad de nematodos que la semana 2, además se observa que la distancia no es un factor significativo en el presente estudio.

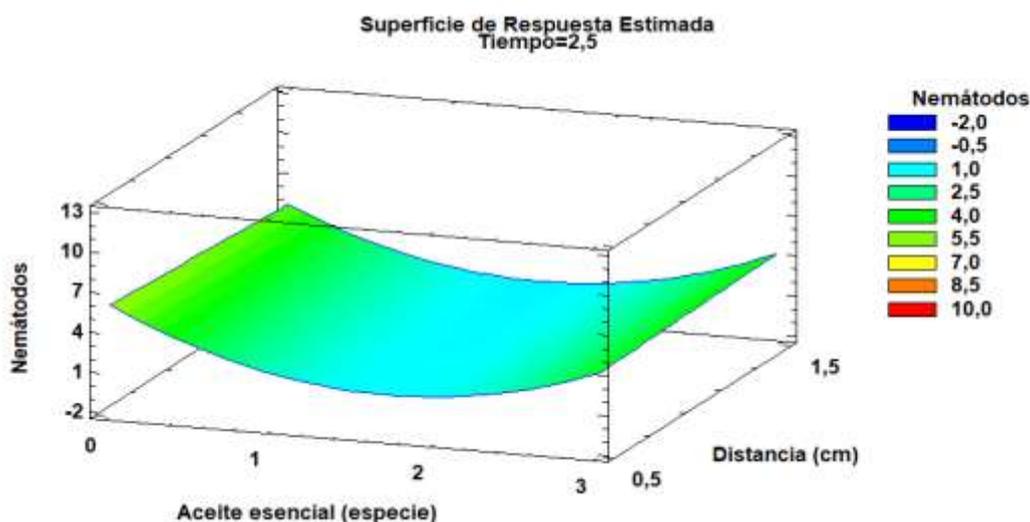


Figura 7. Superficie de respuesta estimada Aceite esencial vs Distancia

Con relación a la Figura 7, se indica el efecto del tipo de aceite esencial y la distancia de muestreo, se observa que para los aceites de Palo Santo (1) y Orégano (2) donde existe un bajo número de nematodos es decir el porcentaje de mortalidad es mayor, mientras que para Tipo Muña (3) tiene un alto número de nematodos siendo el que menor porcentaje de mortalidad tiene, una vez más la distancia con tendencia lineal

convirtiéndolo en un factor que no influye, siendo así la distancia indistinta a la que este el aceite esencial evaluado.

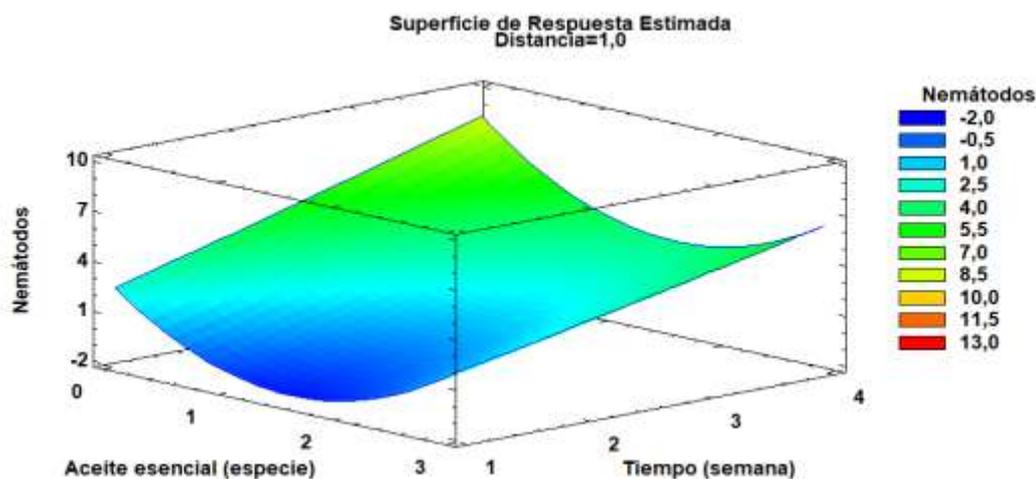


Figura 8. Superficie de respuesta estimada Aceite esencial vs Tiempo

Por otra parte, en la Figura 8, se observa el efecto del tipo de aceite esencial y el tiempo de análisis, se visualiza que el número de nematos aumenta conforme aumenta el tiempo de análisis, en la semana 2 Palo Santo (1) y Orégano (2) se comportan de manera similar con la menor número de nematodos y Tipo Muña (3) mantiene la tendencia con el mayor número de nematodos, asimismo cabe mencionar que el Control (0) tiene siempre el mayor número de nematodos, para la semana 4 existe una tendencia similar para todos los aceites esenciales ya que aumenta el número de nematodos en todos los tratamientos.

Este estudio constituye el primer reporte del empleo de una matriz polimérica (bolsas de agrocultivo biodegradables) para la aplicación de aceites esenciales para el control de *Meloidogyne*, por lo que los resultados no pueden ser comparados con estudios previos. Sin embargo, investigaciones sobre el efecto de estos aceites esenciales aplicados de manera *in vitro* han demostrado su actividad nematicida.

El efecto sobre la mortalidad de *Meloidogyne* podría ser debido a su composición química, principalmente carvacrol (ver Tabla 1). Con base en estudios *in vitro* realizados por **Iler (2017)** al estudiar aceites esenciales de orégano, tomillo, eucalipto y romero presentaron actividad nematicida frente a *Meloidogyne*, en el cual se logró un 100 % de mortalidad a una concentración 0,75% v/v, en 24 h con los aceites de orégano y tomillo. Asimismo, **Oka et al. (2000)** evaluaron la actividad nematicida de 25 especies de plantas aromáticas donde señalan que los aceites esenciales de *Carum*

carvi (comino de prado), *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Mentha rotundifolia* (menta) y *Mentha spicata* (hierba buena) mostraron la mayor actividad nematocida probados *in vitro*, mientras que el aceite de *Origanum vulgare* (orégano), *O. syriacum* (orégano sirio) y *Coridothymus capitatus* (tomillo) mezclados en suelos arenosos redujeron la irritación de la raíz de las plántulas de pepino en experimentos con macetas. Además, los componentes principales de estos aceites (Carvacrol, t-anetol, timol y carvona) inmovilizaron a los juveniles e inhibieron la eclosión *in vitro*.

Por lo que se refiere la estructura química y la actividad nematocida entre los principales componentes de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* (albaca), *Ocimum sanctum* (albaca morada), *Mentha piperata* (toronjil de menta) entre otros frente a *Meloidogyne javanica*, el compuesto más activo fue el eugenol fenólico. Además, no se observó una diferencia apreciable en la actividad entre los alcoholes alifáticos acíclicos (geraniol, alcohol primario y linalol, alcohol terciario), mientras el análogo saturado cíclico, el mentol fue mucho menos activo (**Sangwan, Verma, Vermab, & Dhindsa, 1990**).

Igualmente **Ntalli et al, (2010a)** evaluaron la actividad nematocida de los aceites esenciales de 8 plantas aromáticas (Lamiaceae) y 13 componentes terpénicos contra *Meloidogyne incognita*, durante tres periodos de inmersión (24, 48, 96 h). Los aceites esenciales de *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus*, *Mentha pulegium* y *Melissa officinalis* exhibieron una alta actividad nematocida contra *M. incognita*. Además, señalan que la actividad nematocida de los terpenos disminuye en orden l-carvona, pulegona, trans-anetol, geraniol, eugenol, carvacrol, timol. Los terpenos probados individualmente fueron más activos que como componentes en aceites esenciales, implementando acción antagonista.

Con respecto al aceite esencial de Palo Santo por sus componentes mayoritarios (ver Tabla 3) se le puede otorgar en el presente estudio su actividad nematocida.

Ochoa-Fuentes et al, (2019) realizaron sus estudios *in vitro* de la actividad nematocida de limoneno, isotiocianato de alilo, eucaliptol, β -citronelol y azadiractina sobre *M. incognita* observando que el compuesto que presentó mayor mortalidad fue el β -citronelol con un 87,90%, seguido por el compuesto eucaliptol y limoneno con un 83,6 y 83,2% respectivamente, los compuestos con menor porcentaje de mortalidad fueron los isotiocianatos de alilo con 75,7%.

En otros estudios **Echeverrigaray, Zacaria, & Beltrão, (2010)** probaron la actividad nematocida de 22 monoterpenoides *in vitro* e *in vivo*, de los cuales los compuestos con grupos hidroxilo y carbonilo exhibieron una mayor actividad nematocida que otros terpenoides. En ese sentido, de los monoterpenoides probados *in vitro* borneol, carveol, citral, geraniol, α -terpineol mostraron la mayor actividad nematocida, la cual fue dependiente de la dosis. Además, estos mismos compuestos redujeron la irritación de las raíces de las plantas de tomate.

En cuanto a la baja mortalidad presentada por el aceite obtenido de tipo muña en las 4 semanas evaluadas se toma en cuenta su composición química (neomentol, mentol y mentona) (Tabla 2). De acuerdo con los resultados mostrado por **Al-Banna, Darwish, & Aburjai, (2003)**, el cineol, el mentol, mentona y el pineno no fueron efectivos contra *Meloidogyne javanica* J2, mientras que en *M. incognita* J2, los componentes oleosos más efectivos fueron carvacrol, timol y gerniol, con mortalidades de 100, 90 y 74%, respectivamente luego de 72h, asimismo el mentol y mentona causaron una mortalidad significativa, siendo el cineol fue el menos efectivo. Por el contrario, el uso de geraniol, timol y el alcanfor causaron tasas de mortalidad en *M. javanica* J2 de 91, 60, 56%, respectivamente después de 72 h de exposición. Estos resultados coincidieron con hallazgos anteriores en los que carvacrol, el geraniol y el timol realizados por **Oka, (2001)** mostrando una alta actividad nematocida contra *M. javanica*.

Por otra parte estudios realizados por **Seydim & Sarikus, (2006)** acerca de las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales de orégano, romero y ajo (1.0-4.0%) provistos en forma de películas biodegradables obtenidas de proteína de suero mostraron que la película que contenía aceite esencial de orégano al 2% fue la más efectiva en el control de bacterias en comparación con las que contenían aceites esenciales de ajo y romero.

Con relación a las diferencias observadas en el porcentaje mortalidad de *Meloidogyne* causada por los diferentes aceites evaluados durante las cuatro semanas de análisis, se pueden atribuir a diferencias en la velocidad de difusión según señala Jácome (datos no publicados) quien observó que la tendencia de liberación de aceites esenciales desde la bolsa de agrocultivo biodegradables obtenidas a partir de cáscara de plátano de rechazo fue AE Palo Santo > AE Orégano > AE Muña. Además, a la distancia 0,5 cm existe una mayor concentración de compuesto activo e indica que la concentración de los aceites esenciales disminuye conforme pasa el tiempo de análisis.

3.1.2. Verificación de la Hipótesis

Mediante el respectivo análisis de los datos obtenidos en los distintos ensayos *in vivo* se acepta la hipótesis alternativa señalando que los aceites esenciales de orégano, tipo muña y palo santo analizados a dos distancias presentan efecto nematicida *in vivo*.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El empleo de aceites esenciales de *Bursera graveolens* (Palo Santo), *Minthostachys mollis* (Tipo Muña), *Origanum vulgare* (Orégano) difundidos en una matriz polimérica a partir del plátano verde de rechazo presentaron actividad nematicida frente a *Meloidogyne*.

El porcentaje de mortalidad frente a *Meloidogyne* en la semana 3 de los aceites esenciales a 0,5 cm de distancia fueron: Palo Santo 100%, seguido de Orégano con el 77,7%, mientras que el aceite de Tipo Muña con 44,4%. En cuanto a la distancia de 1,5 cm: Palo Santo 95,0%, no obstante, los aceites esenciales de Orégano y Tipo Muña tienen efectos similares con el 39,9% y 34,9% respectivamente.

El aceite esencial que presentó mayor actividad nematicida fue *Bursera graveolens* (Palo Santo), no obstante, *Origanum vulgare* (Orégano) también presentó actividad nematicida significativa, mientras que *Minthostachys mollis* (Tipo Muña) fue el menos efectivo frente *Meloidogyne*.

4.2 Recomendaciones

Evaluar el efecto nematicida in vivo de aceites esenciales difundidos en una matriz polimérica en invernaderos convencionales, con plántulas y con cultivos infestados por nematodos.

Evaluar la concentración efectiva (CE₅₀) de la matriz polimérica con aceites esenciales, para determinar la concentración óptima del film.

Desarrollar un estudio de factibilidad económica, acerca de la utilización de bolsas de agrocultivo biodegradables a partir del plátano verde de rechazo con actividad nematicida.

MATERIALES DE REFERENCIA

5.1.Referencias Bibliográficas

- Al-Banna, L., Darwish, R. M., & Aburjai, T. (2003). Effect of plant extracts and essential oils on root-knot nematode. *Phytopathologia Mediterranea*, 42(2), 123-128. <https://doi.org/10.1400/14541>
- Alkire, B., Tucker, A., & Maciarelo, M. (1994). Tipo, *minthostachys mollis* (Lamiaceae): an Ecuadorian Mint. *Economic Botany*, 48(1), 60-64. <https://doi.org/10.1007/bf02901380>
- Amaguaña, C. (2015). *Universidad Técnica De Ambato. Repo.Uta.Edu.Ec.*
- Andrés, M. F. (2002). Estrategias en el control y manejo de nematodos fitoparasitos. *Ciencia y Medio Ambiente -CCMA-CSIC*, 221-227. Recuperado de [http://digital.csic.es/bitstream/10261/128310/1/Estrategias en el control392%28M^aF Andrés%29.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/128310/1/Estrategias%20en%20el%20control%20de%20nematodos%20fitoparasitos.pdf)
- Arancibia, M. Y., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2014). Release of volatile compounds and biodegradability of active soy protein lignin blend films with added citronella essential oil. *Food Control*, 44, 7-15. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.025](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.025)
- Atamian, H. S., Roberts, P. A., & Kaloshian, I. (2012). High and Low Throughput Screens with Root-knot Nematodes *Meloidogyne*, (March), 2-7. <https://doi.org/10.3791/3629>
- Bargmann, C. I., Hartwig, E., & Horvitz, H. R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-H)
- Bolechowski, A., Moral, R., Bustamante, M., Paredes, C., Agulló, E., Bartual, J., & Carbonell, Á. (2011). Composition of oregano essential oil (*origanum vulgare*) as affected by the use of winery-distillery composts. *Journal of Essential Oil Research*, 23(3), 32-38. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700454>
- Borja, N. (2012). *Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en Tomate Bajo Invernadero*. Quito: The Black Rider Editorial.

- Burt, S. A. (2007). *Antibacterial activity of essential oils : potential applications in food*. *International journal of food microbiology*. Utrech University, Alemania.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* «Muña». *Ciencia e Investigación*, 25(3), 298-301. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n3/a08v25n3.pdf>
- Castillo, J. (2014). *IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE Meloidogyne spp. PRESENTES EN EL MUNICIPIO DE PATZICÍA*. UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR. Recuperado de <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/06/14/Castillo-Jose.pdf>
- Cueto, M. (2010). *Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de Orégano (Lippia berlandieri Schauer) sobre el crecimiento de Fusarium oxyspor tanto In Vitro como en Plántula de tomate*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/2099/1/1080177206.pdf>
- Driesche, R., Hoddle, M., & Center, T. (2007). *Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales*. USA.
- Echeverrigaray, S., Zacaria, J., & Beltrão, R. (2010). Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 100(2), 199-203. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0199>
- Escobar, H., & Lee, R. (2009). *Manual de producción de tomate bajo invernadero*. *Manual de producción de tomate bajo invernadero*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2000). Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch/Staerke*, 52(4), 118-124. [https://doi.org/10.1002/1521-379X\(200006\)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-379X(200006)52:4<118::AID-STAR118>3.0.CO;2-0)
- Guzmán, Ó., Castaño, J., & Villegas, B. (2012). PRINCIPALES NEMATODOS FITOPARÁSITOS Y SÍNTOMAS OCASIONADOS EN CULTIVOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA. *Agron*, 20(1), 38-50.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.005>

Hinojosa, W. (2011). *Eficiencia de Cinco Productos Orgánicos para el Control de Nemátodos Fitoparásitos de HYPÉRICUM (Hypericum inodorum)*. Escuela Politécnica del Ejército. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/5210/T-ESPE-IASA I-004594.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ibrahim, S. K., Traboulsi, A. F., & El-Haj, S. (2006). Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathologia Mediterranea*. Recuperado de <http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view/1828>

Iler, D. (2017). *Evaluación de la actividad nematocida in vitro de aceites esenciales frente a Meloidogyne*. Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14639947.2011.564813>
<http://dx.doi.org/10.1080/15426432.2015.1080605>
<https://doi.org/10.1080/15426432.2015.1080605>
http://heinonline.org/HOL/Page?handle=hein.journals/baj102&div=144&start_page=26&collectio

Jaramillo, J., Rodríguez, V. ., Guzmán, M., Zapata, M., & Rengifo, T. (2007). *Manual Técnico de Buenas Prácticas Agrícolas para la producción de tomate bajo condiciones protegidas* (Primera). Colombia. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s00.pdf>

Koch, K. (2017). *Starch-Based Films. Starch in Food: Structure, Function and Applications: Second Edition*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00019-6>

Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic Int*.

López, L. (2017). *Manual técnico del cultivo de tomate*. Recuperado de <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/3143/1/BVE17079148e.pdf>

Lu, D. R., Xiao, C. M., & Xu, S. J. (2009). Starch-based completely biodegradable polymer materials. *Express Polymer Letters*. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2009.46>

- Luján, M. C., Gutiérrez, F., Ventura, Lucía Dendooven, L., Mendoza, M., Cruz, S., García, O., & Abud, M. (2012). Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. *Gayana - Botanica*.
- Malagón, O., Vila, R., Iglesias, J., Zaragoza, T., & Cañigüeral, S. (2003). Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 527-531. <https://doi.org/10.1002/ffj.1262>
- Monzote, L., Hill, G., Cuellar, A., Scull, R., & Setzer, W. (2012). Chemical Composition and Anti-proliferative Properties of *Bursera graveolens* Essential Oil, 7(11), 1531-1534. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701130>
- Mora, F., Araque, M., Rojas, L., Ramírez, R., & Silva, B. (2009). Chemical Composition and in vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes, 4(7), 997-1000. <https://doi.org/10.1177/1934578x0900400726>
- Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010a). Phytochemistry and nematocidal activity of the essential oils from 8 greek lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7856-7863. <https://doi.org/10.1021/jf100797m>
- Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010b). Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematocidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest Management Science*, 67(3), 341-351. <https://doi.org/10.1002/ps.2070>
- Ochoa-Fuentes, Y., Rojas, G., Cerna, E., Delgado, J., Aguirre, L., Landeros, J., & Cepeda, M. (2019). Evaluación in vitro de la actividad nematocida de limoneno, isotiocianato de alilo, eucaliptol, β -citronelol y azadiractina sobre *Meloidogyne incognita* (Nematoda, Meloidogynidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(9), 1689-1699.
- Oka, Y. (2001). Nematocidal activity of essential oil components against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology*, 3(2), 159-164.

<https://doi.org/10.1163/156854101750236286>

- Oka, Yuji, Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.710>
- Park, I. K., Kim, J., Lee, S. G., & Shin, S. C. (2007). Nematicidal activity of plant essential oils and components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*) and Litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus Xylophilus*). *Journal of Nematology*, 39(3), 275-279. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586506/>
- Pérez, E. (2012). RESUMEN PLAGUICIDAS BOTÁNICOS: UNA ALTERNATIVA A TENER.
- Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. (2009). *Root-knot nematodes. Root-knot Nematodes*.
- Regnault-Roger, C., & Vincent, C. (2004). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=MT3b54tBHckC>
- Riascos Ortíz, D. H. (2014). Los nematodos fitopatógenos como inductores de estrés biótico en plantas. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5, 10. <https://doi.org/10.22490/21456453.1341>
- Ryan, M. F., & Byrne, O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*. <https://doi.org/10.1007/BF01013489>
- Saito, M. L. (2004). As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura. *Embrapa*, 4. Recuperado de https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf
- Salgado, L. (2009). Óleos Essenciais no Controle Fitossanitário Introdução Substâncias Provenientes do Metabolismo Secundário (pp. 139-152). Brasil. Recuperado de

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144196/1/2009CL-08.pdf>

Sandoval, C., & Calipa, A. (2015). *Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para Tomate Riñón (Lycopersicon esculentum Mill.)* (Primera). Ecuador: AGROCALIDAD. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/Guía-de-BPA-para-tomate-de-riñón.pdf>

Sangwan, N. K., Verma, B. S., Vermab, O. K. K., & Dhindsa, K. S. (1990). Nematicidal Activity of Some Essential Plant Oils, 331-335. <https://doi.org/10.1002/ps.2780280311>

Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano , rosemary and garlic essential oils, 39, 639-644. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.013>

Sijmons, P. (1997). *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions*. (C. Fenoll, S. Grundler, & S. Ohl, Eds.) (U.S.A).

Stirling, G. (2014). *Biological Control os Plant-parasitic Nematodes* (2nd ed.). London, UK.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., ... Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707-2714. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6089>

Velasco, R., Enriquez, M., Torres, A., Palacios, L., & Ruales, J. (2012). Caracterización morfológica de películas biodegradables a partir de almidón modificado de yuca, agente antimicrobiano y plastificante. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 10(2), 152-159.

Villada, H. S., Acosta, H., & Velasco, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 12(2), 5-13. <https://doi.org/10.21897/rta.v12i2.652>

Villavicencio, A., & Vásquez, W. (2008). *Guía Técnica de Cultivos*. Quito.

Young, D. G., Chao, S., Casablanca, H., Bertrand, M. C., & Minga, D. (2007). Essential oil of *Bursera graveolens* (kunth) triana et planch from Ecuador. *Journal*

of Essential Oil Research, 19(6), 525-526.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699322>

Yukawa, C., Iwabuchi, H., Komemushi, S., & Sawabe, A. (2005). Mono- and sesquiterpenoids of the volatile oil of *Bursera graveolens*, 1(July), 653-658.
<https://doi.org/10.1002/ffj.1523>

ANEXOS

Anexo 1.- Análisis de Varianza para las mediciones de la Semana 2

Fuente	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Rep	2	3,0833	1,5417		
Distancia	1	1,5000	1,5000	2,36	0,1472
Tratamiento	3	67,3333	22,4444	35,24	0,000
Distancia*Tratamiento	3	8,5000	2,8333	2,45	0,0215
Error	14	8,9167	0,6369		
Total	23	89,3333			

Anexo 2.- Análisis de Varianza para las mediciones de la Semana 3

Fuente	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Rep	2	1,583	0,7917		
Distancia	1	0,167	0,1667	0,14	0,7118
Tratamiento	3	184,833	61,6111	52,54	0,0000
Distancia*Tratamiento	3	14,833	4,9444	4,22	0,0255
Error	14	16,417	1,1726		
Total	23	217,833			

Anexo 3.- Análisis de Varianza para las mediciones de la Semana 4

Fuente	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Rep	2	3,583	1,7917		
Distancia	1	0,042	0,0417	0,02	0,8983
Tratamiento	3	292,458	97,4861	39,66	0,0000
Distancia*Tratamiento	3	25,458	8,4861	3,45	0,0458
Error	14	34,417	2,4583		
Total	23	355,958			

Anexo 4. Análisis de Varianza para Nematodos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrad Medio	Razón-F	Valor-P
A: Aceite esencial	23,8521	1	23,8521	5,90	0,0173
B: Distancia	0,84375	1	0,84375	0,21	0,6491
C: Tiempo	383,419	1	383,419	94,76	0,0000
AA	283,594	1	283,594	70,09	0,0000
AB	6,788775	1	6,76875	1,67	0,1994
AC	4,25042	1	4,25042	1,05	0,3083
BC	0,352083	1	0,352083	0,09	0,7687
CC	0,09375	1	0,09375	0,02	0,8794
Bloques	5,39583	2	2,69792	0,67	0,5160
Error total	343,92 85	85	4,04612		
Total (corr.)	1052,49	95			

R-cuadrada = 67,3232 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 63,4788 porciento

Error estándar del est. = 2,0115

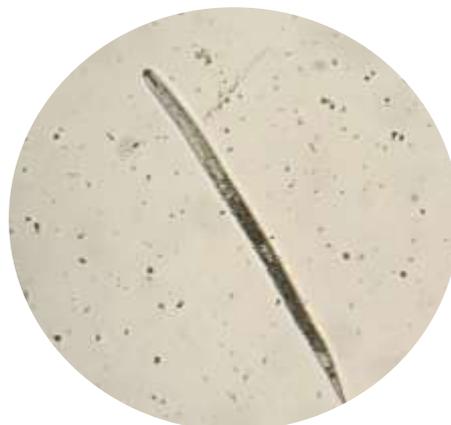
Error absoluto medio = 1,56029

Estadístico Durbin-Watson = 1,8768 (P=0,2096)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,0339964



Anexo 5. Raíces de tomate de riñón infectadas de nematodos (nodulación).



Anexo 6. Nematodo (*Meloidogyne*) visto en el microscopio (10x).



Anexo 7. Nematodos vistos en el microscopio (5x).



Anexo 8. Conteo de Nematodos vistos en el microscopio (5x).



Anexo 9. Juego de tamices con raíces licuadas.



Anexo 10. Prototipo de mini invernadero