

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA
Moniliophthora roreri (Cif. y Par.) Evans et al., DE EXTRACTOS OBTENIDOS
DE *Justicia secunda* Vahl**

ANYELA VIVIANA CHACÓN ALMEYDA



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2014

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA
Moniliophthora roreri (Cif. y Par.) Evans et al., DE EXTRACTOS OBTENIDOS
DE *Justicia secunda* Vahl**

ANYELA VIVIANA CHACÓN ALMEYDA

**Trabajo de grado presentado como requisito
para optar el título de Bióloga**

Director:

Ph.D Herminul Cano Calle

Codirectora:

Qca. Johanna Flórez Castillo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2014

Dedicatoria

Doy gracias a Dios por la vida, la salud, la sabiduría y la fortaleza, que me permitió llegar hasta este punto, además de su incalculable bondad, amor y guía.

A mi madre Rosalba, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, su cariño y especialmente por su amor incondicional, siendo un pilar para poder alcanzar con firmeza mis logros.

A mi hermano con mucho cariño gracias.

A Julián por la motivación, el apoyo constante en los momentos difíciles, amor y compañía.

A Maribel por su compañía y motivación constante a lo largo de mi carrera.

A mis compañeros y amigos, Nicolás, Diego, Priscila, Jessika y Gloria por su compañía y apoyo constante.

A FEDECACAO por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones, aportándome nuevos conocimientos y experiencia a nivel personal.

A la Universidad Industrial de Santander en especial al profesor Herminul y Johanna por haberme brindado los medios para mi formación profesional.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	18
1.1 GENERALIDADES DE THEOBROMA CACAO.....	18
1.1.1. Taxonomía Y Descripción.....	18
1.1.2 Producción Nacional De Cacao	19
1.2 GENERALIDADES DE MONILIOPHTHORA RORERI.....	20
1.2.1 Etiología.....	21
1.2.2 Taxonomía.....	21
1.2.3 Distribución Geográfica.....	21
1.2.4 Morfología De Moniliophthora roreri.....	22
1.2.5 Fase Reproductiva Sexual Y Asexual De Moniliophthora roreri.....	22
1.2.6 Características De Moniliophthora roreri In Vitro.....	23
1.2.7 Síntomas De La Enfermedad Y Ciclo De Vida	23
1.2.8 Control De La Enfermedad	24
1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS	25
1.4 GENERALIDADES DE JUSTICIA SECUNDA.....	27
1.4.1 Taxonomía Y Descripción.....	28
1.5 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	29
1.5.1 Extracción Por Soxhlet.....	30
1.5.2 Extracción Por Maceración	30
1.6. SELECCIÓN DE SOLVENTE.....	31
1.6.1 Hexano.....	31
1.6.2 Diclorometano.....	31
1.6.3 Metanol	31
1.6.2 Agua	32
1.7 IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS	32

1.7.1 ESPECTROMETRIA DE MASAS CON IONIZACIÓN POR ELECTRO SPRAY ESI-MS MEDIANTE TRAMPA IÓNICA.....	32
1.7.2 Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-VIS).....	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	35
3.1.1 Maceración Del Material Vegetal.....	35
3.1.2 Soxhlet.....	36
3.2 AISLAMIENTO DE MONILIOPTHORA RORERI Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	36
3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.....	37
3.3.1 Metodo De Microdilución.....	37
3.3.2 Cultivo En Micro-Placa.....	37
3.3.3 Macrodilución.....	37
3.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y LOS DIFERENTES SOLVENTES SOBRE CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE MONILIOPTHORA RORERI.	38
3.4.1 Variables Cuantitativas.....	38
3.4.2 Variables Cualitativas.....	39
3.5 DETERMINACIÓN PRELIMINAR DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS DE JUSTICIA SECUNDA.....	40
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>Moniliophthora roreri</i>	42

4.1.1 Determinación De La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	42
4.2. EFECTO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y LOS DIFERENTES SOLVENTES SOBRE CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE MONILIOPTHORA RORERI.	50
4.2.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL.	50
4.2.2 Producción De Esporas	52
4.2.3 Tamaño De Las Esporas	55
4.2.4. Día De Esporulación	57
4.2.5 Tipo De Esporulación De Los Aislados	59
4.2.6. Determinación Preliminar De Los Compuestos Presentes En Los Extractos De Justicia secunda.	59
5. DISCUSIÓN	67
6 CONCLUSIONES	72
7. RECOMENDACIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	89

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa de dispersión de <i>Moniliophthora roreri</i> Fuente: Jaimes y Aránzazu, 2010.	22
Figura 2. Esquema de la biosíntesis de Metabolitos secundarios Fuente: Taiz y Zeiger, 2002.	25
Figura 3. Estructura química del isopreno (unidad fundamental de los terpenos) Fuente: Avalos y Pérez, 2009 [66].	26
Figura 4. Estructura química del fenol. Fuente: Avalos y Pérez, 2009 [66].	27
Figura 5. Estructura química de la cafeína. Fuente: Avalos y Pérez, 2009 [66].	27
Figura 6. <i>Justicia secunda</i> (parque tecnológico Guatiguará)	28
Figura 7. Sistema de extracción soxhlet. Fuente: González et al, 2009.	30
Figura 8. Aislados obtenidos posteriormente a la purificación, a) aislado con crecimiento más rápido, b) aislado con crecimiento rápido y menor producción de esporas, c) aislado con mayor diámetro y producción de esporas.	42
Figura 9. Método de macrodilución, aislados de <i>M. roreri</i> a) Aislado control negativo, sin presencia de extractos. b) Aislado control positivo con oxiclورو de cobre a concentración 100 µg/mL. c) Aislado con extracto obtenido con método soxhlet y solvente metanol a concentración 500 µg/mL.	44
Figura 10. Gráfico de barras, media del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para cada solvente y control, n=144, Desviación estándar=7,21; varianza=51,98.	45
Figura 11. Micrografía con una magnificación de 5X, micro-placa con extractos obtenidos con agua y método maceración 1:6 a concentración 200µg/mL. Se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas maduras (em).	46
Figura 12. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con agua y método maceración 1:6 a concentración 300µg/mL. Se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas inmaduras adheridas a las hifas (ei.).	46
Figura 13. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con agua y método soxhlet a concentración 400µg/mL, se observa hifas completamente desarrolladas (h), presencia de esporas maduras (em) y esporas inmaduras adheridas a las hifas (ei).	47
Figura 14. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con hexano y método maceración 1:6 a concentración 200µg/mL se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas maduras (em).	47

Figura 15. Micrografía con una magnificación de 5X, micro-placa con extractos obtenidos con hexano y método maceración 1:10 a concentración 300µg/mL se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas maduras (em).	48
Figura 16. Micrografía con una magnificación de 10X y 40X, micro-placa con extractos obtenidos con hexano y método de maceración 1:6 a concentración 200µg/mL.; a) se observa presencia de esporas inmadura adheridas a las hifas (ei); b) hifas hialinas septadas completamente desarrolladas (hs).	48
Figura 17. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con diclorometano y método maceración 1:6 a concentración 300µg/mL se observa tubo germinal incipiente (t).	49
Figura 21. Producción de esporas con diferentes concentraciones de tratamientos 1= concentración 100µg/mL, 2=concentración 200µg/mL, 3=concentración 500µg/mL 4=control carente de extractos.	54
Figura 22. Tamaño de esporas con diferentes solventes de extracción 1=soxhlet, 2= maceración 1:10, 3=maceración 1:6 y 4=control carente de extractos.	55
Figura 23. Tamaño de espora con diferentes solventes de extracción 1=hexano, 2= diclorometano, 3=metanol, 4=agua y 5=control carente de extractos.	56
Figura 24. Tamaño de espora con diferentes concentraciones de tratamientos, 1= concentración 100µg/mL, 2=concentración 200µg/mL, 3=concentración 500µg/mL 4=control carente de extractos.	57
Figura 25. Primer día de esporulación en el control y los tratamientos, a) Solvente de extracción utilizado. b) Método de extracción utilizado.	58
Figura 26. Tipo de esporulación, a) uniforme tipo 0; b) anillos en toda la colonia tipo 1; c) uniforme con anillos centrales tipo 3.	59
Figura 27. Espectros de masas ESI-MS obtenidos del extracto de <i>J. secunda</i> con el solvente metanol.	60
Figura 28. Espectros de masas ESI-MS obtenidos del extracto de <i>J. secunda</i> con el solvente diclorometano.	62
Figura 29. Espectro de masas ESI-MS obtenidos del extracto de <i>J. secunda</i> con el solvente hexano.	64
Figura 30. Espectro de UV-Vis, obtenido del extracto de <i>J. secunda</i> con el solvente metanol.	64
Figura 31. Espectro de UV-Vis, obtenido del extracto de <i>J. secunda</i> con el solvente hexano.	65
Figura 32. Espectro de UV-Vis, obtenido del extracto de <i>J. secunda</i> con el solvente diclorometano.	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental general del trabajo con concentraciones: 100, 200, y 500 µg/ml , n = 4	38
Tabla 2. Codificación de la variable tipo de esporulación	39
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria, método de microdilución, n=4	43
Tabla 4. Extractos que presentaron inhibición ≥ 50% del crecimiento micelial, en el método de macrodilución, Concentración mínima inhibitoria CMI50.	44
Tabla 5. Variables e interacciones estadísticamente significativas, en la inhibición de crecimiento micelial.	51
Tabla 6. Test de tukey, variable inhibición de crecimiento micelial vs. Solventes.	51
Tabla 7. Variables e interacciones estadísticamente significativas en la producción de esporas.	53
Tabla 8. Test de tukey, variable Producción de esporas vs. Solventes.	53
Tabla 9. Test de tukey, variable Producción de esporas vs. Métodos de extracción.	54
Tabla 10. Variables e interacciones estadísticamente significativas en el tamaño de espora.	55
Tabla 11. Prueba de X^2 para el primer día de esporulación.	57

ABREVIATURAS

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados).

ISSR: Interspread Single Sequence Repeats (secuencias intercaladas entre microsatelites).

ITS: Internal transcribed spacer (Espaciador Interno transcripto)

PDA: Potato dextrose agar (Agar Papa Dextrosa).

CMI: concentración minima inhibitoria.

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE *Justicia secunda* Vahl

AUTOR: ANYELA VIVIANA CHACÓN ALMEYDA**

PALABRAS CLAVES: MONILIOPHTHORA RORERI, JUSTICIA SECUNDA, CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA, SOXHLET, BIOFUNGICIDAS, FUNGIESTATICOS.

DESCRIPCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao*) en Colombia es de gran importancia económica y social, en el sistema agroforestal campesino de muchas regiones del país; sin embargo, existen varias enfermedades como la moniliasis, que afectan la calidad y producción de los granos de cacao, generando grandes pérdidas. La moniliasis es ocasionada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, este ataca los frutos en sus diferentes estados de desarrollo.

Por lo anterior en el presente estudio, se evaluó la actividad antifúngica de extractos obtenidos de *Justicia secunda* con dos métodos de extracción y cuatro solventes diferentes, sobre aislados de *M. roreri*. La actividad antifúngica de los extractos obtenidos por los métodos maceración y Soxhlet a diferentes concentraciones con solventes metanol, diclorometano, hexano y agua, fue evaluada contra el aislamiento que presento las mejores condiciones de germinación y crecimiento, para determinar la concentración mínima inhibitoria y evaluar la eficiencia del método de extracción y de los solventes utilizados.

Los extractos obtenidos con solventes orgánicos y los diferentes métodos de extracción, presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) \geq de 200 $\mu\text{g/ml}$; los extractos obtenidos con el solvente metanol y con el método soxhlet, presentaron la mejor actividad antifúngica, en comparación con los demás extractos. En el análisis de varianza se demostró que las variables solvente, método de extracción y la concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la que se aplica el extracto, y la interacción de estos factores, poseen efectos estadísticamente significativos sobre las variables de crecimiento. La actividad antifúngica encontrada en los extractos de *J. secunda* sobre el crecimiento y germinación de *M. roreri*, los convierte en buenos candidatos para ser usados como posibles biofungicidas o fungiestaticos, que vayan de la mano con los métodos de control utilizados en la actualidad; pero es necesario estudios futuros, orientados a determinar los componentes principales de los extractos evaluados.

* Trabajo De Grado. Modalidad Investigación.

** Facultad De Ciencias Basicas. Escuela De Biología. Director: Qco. - Ph.D. Herminul de Jesús Cano Calle. Tutora: Qca. Johanna Marcela Florez.

ABSTRACT

TITLE: EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE *Justicia secunda* Vahl

AUTHOR: ANYELA VIVIANA CHACÓN ALMEYDA**

KEYWORDS: *Moniliophthora roreri*, *Justicia secunda*, minimum inhibitory concentration, soxhlet, biofungicides, fungistatic.

DESCRIPTION

Cocoa (*Theobroma cacao*) in Colombia is of great economic and social importance, for the peasant agroforestry system in many regions of the country, but, there are several diseases such as thrush, which affect the quality and production of cocoa beans, generating large losses. The thrush is caused by the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri*, it attacks the fruits in different stages of the development.

Therefore in the present study, the antifungal activity of extracts from *Justicia secunda* was evaluated with two different extraction methods and four solvents on an isolated *M. roreri*. antifungal activity of extracts obtained by maceration and Soxhlet methods at different concentrations with methanol solvent, dichloromethane, hexane and water, was evaluated against the isolation that present the best conditions for germination and growth, to determine the minimum inhibitory concentration and evaluate the efficiency of the extraction method and solvent used

The extracts obtained with organic solvents and different extraction methods, showed a minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 200 mg / ml, the extracts obtained with the solvent methanol and the soxhlet method showed the best antifungal activity compared to the other extracts. The analysis of variance showed that the solvent variables, method of extraction and concentration (mg / mL) in the extract is applied, and the interaction of these factors have statistically significant effects on the growth variables. The antifungal activity found in extracts of *J. secunda* on the growth and germination of *M. roreri*, makes them good candidates for use as potential biofungicides or fungistatic, which go hand in hand with the control methods used today, but it is necessary future studies aimed at determining the main components of the extracts evaluated.

* Project of Grade. Modality Investigation.

** Faculty of Basic Sciences Basicas. School of Biology. Directed: Qco. - *Ph.D.* Herminsul de Jesús Cano Calle. Tutor: Qca. Johanna Marcela Florez.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del Cacao (*Theobroma cacao* L.) es de origen tropical, del cual se obtienen las semillas productoras de chocolate, siendo el tercer producto agrícola más importante en los países tropicales, después del té y el café; el 68% de la producción mundial anual de cacao proviene del continente Africano, el 12 % de Indonesia, seguido por Latinoamérica (8%) y otros países tropicales (10%) [1,2].

El cacao en Colombia es de gran importancia económica y social, constituyéndose en una especie primordial del sistema agroforestal campesino de muchas regiones del país [2]. Santander es el primer productor de cacao a nivel nacional y es el responsable de alrededor del 50% de la producción del país con un total de 45.000Ha sembradas, lo que convierte al cacao en el segundo renglón productivo agrícola en Santander después de la palma aceitera [3].

Sin embargo, existen varias enfermedades que afectan la calidad y producción de los granos de cacao que generan pérdidas hasta del 100% de las cosechas [4]; de las enfermedades más importantes que afectan al cacao se encuentran la “escoba de bruja” ocasionada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*), la pudrición negra causada por varias especies de *Phytophthora* y la pudrición acuosa o moniliasis producida por *Moniliophthora roreri* (Cif.) [4,5].

El principal problema fitosanitario que presenta el cultivo del cacao en Colombia es la moniliasis, la cual ataca el fruto en cualquier estado de desarrollo [3, 10,11]. En el 2010 Colombia perdió más del 40% de su cosecha anual, equivalente en términos de grano comercial a 28.000 t de una producción total de 42.294 t [12], razón por la cual, la industria nacional ha tenido que recurrir a la importación de

cacao desde países vecinos, como Ecuador [2, 12]; las pérdidas dependen de la severidad del ataque del patógeno, las condiciones medio ambientales y las condiciones de manejo del cultivo [2].

En la actualidad los métodos de control de moniliasis más utilizados son el control químico, cultural y genético. No obstante, cada uno de estos métodos posee sus limitaciones [12,13] lo que obliga a una búsqueda de estrategias más eficientes y efectivas que ayuden a controlar este fitopatógeno.

Diversas investigaciones indican el potencial de los extractos de plantas en el manejo de problemas fitosanitarios ocasionados por hongos [14, 15, 16]. Actualmente se tiene conocimiento de la importancia de las plantas, sus virtudes toxicológicas, farmacológicas y alucinógenas [17]; además de sus mecanismos de defensa que son complejos, variados y dinámicos. 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 [18]. Las defensas inducidas son un sistema que parte desde una señal química que desencadena la producción de enzimas del metabolismo *secundario*, cuyo resultado final sería la síntesis de compuestos antimicrobianos [19, 20].

Los plaguicidas naturales constituyen una alternativa para el manejo de problemas fitosanitarios y son ventajosos ya que son biodegradables y no afectan la salud ni el medio ambiente [17]. En nuestro país *Justicia secunda Vahl*, comúnmente conocida como singamochila [21], es usada en la medicina tradicional como diurético, hipoglucemiante y en afecciones pulmonares [22]; en previos estudios realizados, el extracto metanólico obtenido de la especie *J. secunda* ha presentado actividad frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* [23].

Por lo antes expuesto en el presente estudio, se evaluó la actividad antifúngica de extractos obtenidos de *J. secunda* con dos métodos diferentes de extracción y cuatro solventes diferentes sobre aislados de *M. roleri*, para ser usados a futuro como posibles biofungicidas en el control de la moniliasis del cacao.

1. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 GENERALIDADES DE *Theobroma cacao*

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es un árbol nativo del trópico americano, hace más de 2000 años fue domesticado por poblaciones mesoamericanas, siendo alimento y fuente de riqueza para los indígenas mayas y aztecas [24]. Después de la colonización cuando Hernán Cortés reporto la bebida amarga usada por los aztecas enviando semillas y recetas a Europa [30], para poder satisfacer la alta demanda europea se hizo necesario dispersar el cultivo del cacao por Suramérica [25].

1.1.1. Taxonomía Y Descripción.

La especie vegetal *Theobroma cacao* L fue descrita por el botánico Carlos Linneo y publicado en Species Plantarum en 1753 [6]. El cacao es un árbol leñoso originario de sotobosque, crece en una franja geográfica tropical con un rango de temperatura entre los 20°C y los 30°C [7], con una humedad relativa entre 70% y 80% [9], ubicada desde los 18° norte hasta los 20° sur de la línea ecuatorial [28, 29]. El cacao pertenece al género *Theobroma*, clasificado en la subfamilia Sterculioidea de la familia Malvaceae; *Theobroma cacao* es una de las 22 especies del género *Theobroma* de las cuales *T. cacao* es el cultivo de mayor importancia comercial a nivel mundial [31].

El árbol de *T. cacao* es de talla pequeña, presenta un marcado dimorfismo de ramas con brotes ortotropicos, alcanza de 1 a 2 m de altura, en la parte superior emite de 3 a 6 ramas laterales, posee copa baja densa y extendida con hojas grandes, alternas elípticas u oblongas, de margen liso [35].

Es una especie cauliflora, es decir las flores aparecen insertadas en el tronco o ramificaciones, las cuales se presentan en racimos sostenidas por un pedicelo de 1 a 3 cm; la flor es en forma de estrella con ovario súpero con 5 lóculos. El cáliz tiene 5 pequeños sépalos carnosos de color rosado o blanco de 7 a 11 mm de largo, pubescentes, que en la flor abierta se expanden formando ángulo recto con el peciolo. La corola consiste de 5 pétalos blancos de 6 a 8 mm de largo que alternan con los sépalos formando una envoltura característica. La base de cada pétalo es cóncava, de color rosado y alberga una antera; la parte superior consiste de una conexión angosta en la base y termina en una expansión rectangular amarilla que se dobla hacia afuera y hacia atrás [32, 33, 34].

El fruto es una baya grande comúnmente denominada "mazorca", carnosa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda, cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial [32].

1.1.2 Producción Nacional De Cacao

Para el año 2007 el consumo nacional de cacao en grano en Colombia fue de 44.872 toneladas [35]. Este consumo es realizado por la industria nacional de derivados del cacao, en donde la Compañía Nacional de Chocolates y Casa Luker compraron en conjunto, aproximadamente el 82% del grano de cacao en el mercado nacional; el restante 18% se destinó al consumo de pequeñas empresas procesadoras; supliendo el 74,6 % de los requerimientos de la industria en el país (33.481 toneladas) siendo el resto suplido mediante importaciones, como fue antes descrito [35].

La producción nacional de cacao es permanente a lo largo del año, con dos picos productivos: noviembre-diciembre-enero y abril-mayo- junio [36]. El cacao se cultiva en casi todo el territorio nacional, pero se concentra básicamente en cuatro

zonas: montañas Santandereanas (Santander y Norte de Santander), Valles interandinos secos (Huila, Tolima y norte del Magdalena), Bosque húmedo tropical (Tumaco, Catatumbo, Arauca y Meta) y Zona Cafetera Marginal (Caldas y Antioquia) [35,36]. En Colombia la producción de Cacao es variable en los diferentes departamentos, siendo Santander el de mayor producción a nivel Nacional. El principal problema del cultivo ha sido que en Colombia más de la mitad del cacao sembrado en los últimos treinta años no es híbrido. Son variedades comunes que presentan baja densidad y son propensos a los problemas fitosanitarios.

1.2 GENERALIDADES DE *Moniliophthora roreri*.

Actualmente las enfermedades que ocasionan más daño en el cultivo del cacao, son las causadas por hongos basidiomicetes del genero *Moniliophthora*, siendo estas la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) [2]. La moniliasis afecta las plantaciones de cacao de centro y sur América, representa una gran amenaza para los productores de cacao, debido a la agresividad del patógeno, su capacidad de adaptación y su rápida dispersión; el daño causado por esta enfermedad varía desde 25% hasta la pérdida total de la producción [2,10,36].

La patogenicidad de la enfermedad ha sido atribuida a la capacidad de penetración y multiplicación del hongo en el parénquima cortical de la planta, lo que causa necrosis de los tejidos; el inóculo de frutos infectados es muy abundante y puede conservar su alta capacidad infectiva hasta por nueve meses [10].

El inicio de la moniliasis en nuestro país se dio en el departamento de Norte de Santander, siendo posiblemente Colombia el sitio de origen de la enfermedad en Mesoamérica según reportes en 1832, 1850, y 1956 [9], además esta hipótesis es corroborada por estudios moleculares, mediante polimorfismo de la longitud de

fragmentos amplificados (AFLP), perfiles de ISSR y secuencias ITS, los que indican gran diversidad de *M. roreri* en nuestro país; asimismo Phillips-Mora et al., 2007, encontraron cinco grupos genéticos de *M. roreri* de los cuales en Colombia se encuentran los grupos Co-East y Co-Central, localizados en la región del Magdalena Medio como los de mayor variabilidad genética [9, 10].

1.2.1 Etiología

Originalmente el patógeno fue denominado *Monilia roreri* por Ciferri y Parodi (1933) y clasificado dentro del filum Ascomycota, describiéndolo como un hongo anamórfico, debido a la aparente ausencia de un estado meiótico o de estructuras sexuales [38]. Sin embargo, Evans et al., 1979 [39], mediante estudios de microscopia, encontraron la presencia de septo doliporo, característico de hongos homobasidiomicetos y la secuenciación de varios genes de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*, lo que motivó a la creación del nuevo género *Moniliophthora*, dentro del orden Agaricales [38,40,41].

1.2.2 Taxonomía

Moniliophthora roreri es un organismo del dominio Eukaryota, reino Fungi, filum Basidiomycota, clase Basidiomycetes, subclase Agaricomycetidae, orden Agaricales, familia Tricholomataceae, género *Moniliophthora* y especie *M. roreri* [2,41].

1.2.3 Distribución Geográfica

La moniliasis del cacao ha sido reportada 11 países de Centro y Suramérica (figura 1); el primer reporte del brote fue en 1909 en el suroccidente de Ecuador [44], sin embargo en 1817 en Colombia se reportó un brote de la enfermedad en el oriente del país [45, 46]; posteriormente se reportó en Venezuela en el estado Zulia (1941), Perú en el Departamento de Cuzco (1950), Panamá (1956), Costa Rica (1978), Nicaragua (1980), Honduras (1997), Guatemala (2002) y Belice (2004) [10, 47, 48, 49, 50, 51]. En México en el 2005 indican la presencia de la enfermedad

mostrando como el hongo alcanzo el límite norte de las zonas productoras en América [52].

Figura 1. Mapa de dispersión de *Moniliophthora roreri*



Fuente: Jaimes y Aránzazu, 2010.

1.2.4 Morfología De *Moniliophthora roreri*

Posee hifas hialinas y septadas, las septas con doliporo, de 1.5 a 5 μm de ancho; las esporas, se producen en cadenas con maduración basipétala y se desprenden fácilmente del micelio; su pared es gruesa, cuando forman masa de esporas, su forma varía de globosa a elipsoidal, y miden de 7 a 14 μm [5,44, 43].

1.2.5 Fase Reproductiva Sexual Y Asexual De *Moniliophthora roreri*.

Evans en 1981, especuló que *M. roreri* presentaba un estado reproductivo teleomorfo y podría ser una especie del género *Crinipellis*, dado que el inusual ciclo vital pleomórfico-hemibiotrófico observado en *M. roreri* también se presenta en *Crinipellis pernicioso* [5].

Posteriormente Evans et al., 2002, proponen que durante la esporogénesis y germinación ocurre la meiosis, la cual da lugar a la formación de hifas infectivas monocarióticas; la fase parasítica haploide se presenta sólo en el tejido vivo (biotrófico), en la cual el hongo crece y se alimenta intercelularmente; seguidamente pasa a la fase diploide necrotrófica en la que hifas diferenciadas producen esporas asexuales, esta fase induce los síntomas característicos de la moniliasis [5, 40].

Las esporas son multifuncionales, sirven no sólo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, infección y la supervivencia [94], tienen dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared celular [95].

1.2.6 Características De *Moniliophthora roreri* In Vitro

M. roreri, crece sobre agar PDA temperatura entre los 25 a 33 °C, las colonias alcanzan un diámetro de 9 cm 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 café lanoso; ocasionalmente, el tapete es de inicio suave, de color blanco a crema o con matices ocráceos, no produce olor [5, 9, 53]. En la zona avanzada, la hifa es hialina, de pared delgada, septada y algunas veces es levemente irregular con hinchamientos. 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, el esqueleto raramente ramificado [53]. Las esporas heteromorfas con una forma predominantemente esferoide, elipsoide y ovoide elíptica y un tamaño entre 5-10 μm [5, 9].

1.2.7 Síntomas De La Enfermedad Y Ciclo De Vida

En la naturaleza se encuentra la enfermedad sólo sobre frutos; la penetración e infección puede ocurrir en cualquier fase de desarrollo del fruto, la infección en los frutos es inversamente proporcional a su edad, es decir que a mayor edad del fruto menor probabilidad de infección [42]. La aparición de síntomas depende de la

edad del fruto infectado, en frutos con más de cuatro meses de edad la infección queda generalmente limitada a la corteza [53].

El ciclo de vida de *Moniliophthora* inicia por la dispersión de esporas infectivas en la estación seca, estas se encuentran en el ambiente en una alta; pero la infección inicia en condiciones ideales para su desarrollo tales como 25°C y 30°C, humedad relativa por encima del 80%, precipitación entre 40-100mm por año; siendo nuestro país un territorio con condiciones favorables para la infección y desarrollo de la moniliasis, debido a la distribución de lluvias durante todo el año [42].

Después de penetrar el fruto, el hongo se desarrolla intercelularmente en las células del parénquima cortical; los síntomas externos pueden estar completamente ausentes, hasta la formación de lesiones entre 45 y 90 días después de la penetración del hongo, momento en el que el mismo se encuentra en la fase biotrófica [39]. Entre los principales mecanismos de dispersión para la especie se cuentan el viento, los humanos, insectos y el agua [37, 43].

1.2.8 Control De La Enfermedad

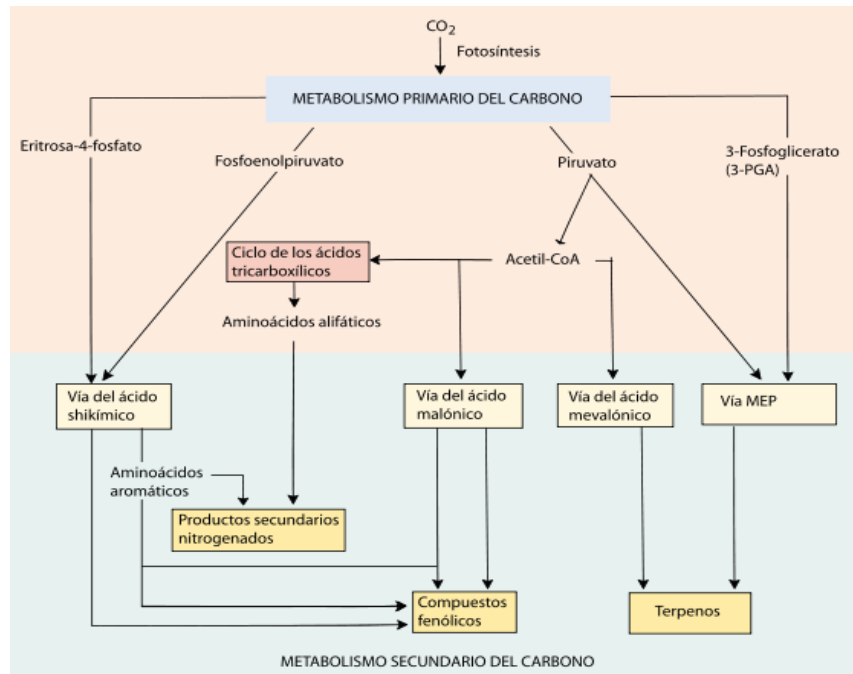
Los métodos de control están orientados a evitar la dispersión de la enfermedad y la implementación de buenas prácticas; las medidas de control utilizadas para controlar la moniliasis son el control químico, cultural y genético; la implementación del control cultural mediante el drenaje, poda y remoción de frutos enfermos [54]; el control químico como el uso de productos elaborados con cobre, no son adoptados por los pequeños agricultores por sus costos y los efectos secundarios para el ambiente y la salud; el control genético como la utilización de clones de cacao (CCN51, FEC2 y CAU39) moderadamente resistentes a la moniliasis es una alternativa útil, aunque a largo plazo [41].

1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS

Los metabolitos *secundarios* son compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales, algunas aún desconocidas; las plantas emplean los metabolitos *secundarios* para defenderse en su hábitat natural de las bacterias, virus, hongos, nematodos, insectos y herbívoros; además intervienen en otras interacciones ecológicas como atrayentes de insectos en el proceso de polinización y dispersión de semillas, como agentes en la competencia planta-planta o el trabajo simbiótico [63, 64].

El hecho de encontrar propiedades biológicas importantes de muchos metabolitos *secundarios* ha incentivado el desarrollo de este campo de investigación, para buscar nuevas drogas, antibióticos, insecticidas o herbicidas. Los metabolitos *secundarios* pueden ser divididos químicamente en 3 grupos: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados o alcaloides (Figura 2).

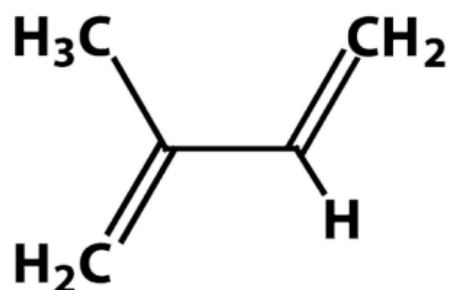
Figura 2. Esquema de la biosíntesis de Metabolitos secundarios



Fuente: Taiz y Zeiger, 2002.

Terpenos. Son derivados del compuesto del isopreno, que se forman por la vía del ácido mevalónico, es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante, están distribuidos ampliamente en las plantas y suelen ser insolubles en agua [65]. Los terpenos de las plantas incluyen hormonas (gibberelinas), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol) y derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos). Poseen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalarías, antimicrobianas, entre otras [66].

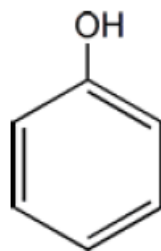
Figura 3. Estructura química del isopreno (unidad fundamental de los terpenos)



Fuente: Avalos y Pérez, 2009 [66].

Compuestos fenólicos. Conocidos como fenilpropanoides o polifenoles, son más de 8.000 compuestos fenólicos, están formados por la vía del ácido shikímico o por la vía del malonato /acetato, entre los compuestos fenólicos se encuentran cumarinas, flavonoides, lignanos y taninos [66], los cuales actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación de esporas de microorganismos [131].

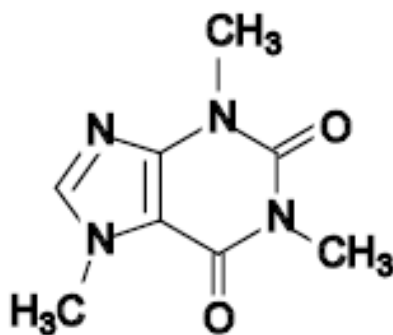
Figura 4. Estructura química del fenol.



Fuente: Avalos y Pérez, 2009 [66].

Compuestos nitrogenados o alcaloides. Existen alrededor de 12.000 alcaloides conocidos, biosintetizados y biológicamente muy activos, principalmente a partir de aminoácidos. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que se usan ampliamente en medicina, pudiendo dar lugar a problemas de toxicidad aun en cantidades muy bajas [66].

Figura 5. Estructura química de la cafeína.



Fuente: Avalos y Peréz, 2009 [66].

1.4 GENERALIDADES DE *Justicia secunda*

Justicia secunda Vahl (familia Acantáceas), conocida como singamochila, sangrito o sangre de cristo [21], es usada en la medicina tradicional como diurético, hipoglucemiante, hipotensivo, en la desinfección de heridas de escorpión y en afecciones pulmonares, entre otros [22, 75]. En estudios anteriores en especies

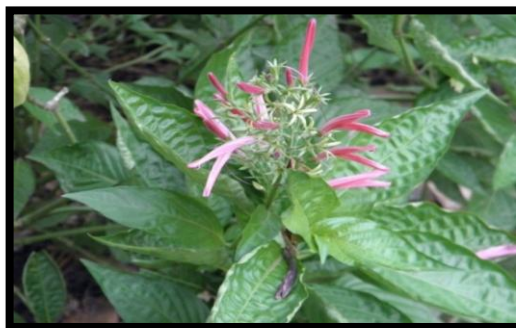
del genero *Justicia*, se ha reportado actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*, gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, y hongos como *Candida albicans* [65, 66, 67]. El extracto metanólico obtenido de la especie *J. secunda* ha presentado actividad frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* [23,61].

En otros estudios realizados de *J. secunda*, la proyección de la composición química de las hojas y tallos revelo la presencia de polifenoles tales como flavonoides, taninos, leuco-antocianinas, antocianinas, terpenoides como iridoides, diterpenoides y triterpenoides [23,61, 62, 63, 77]. Adicionalmente, se encontraron ácidos grasos como ácido docosanoico; esteroides como campesterol, estigmasterol, beta-sitosterol, sitosterol y sitosterol-D-glucósido [74, 76]; asimismo, cumarina como umbeliferona, glucósidos triterpenoides; lignanos y alcaloides de base indolica [75,77].

Cabe resaltar que el extracto metanólico parcial de *J. secunda* (extracto con residuos de solvente) es un buen blanco terapéutico para estudios farmacológicos posteriores, con los cuales se pueden aprovechar las propiedades terapéuticas que se le adjudican por su baja toxicidad frente *Artemia franciscana* y una casi nula actividad hemolítica in vitro[62].

1.4.1 Taxonomía Y Descripción

Figura 6. *Justicia secunda* (parque tecnológico Guatiguará)



El género *Justicia* es de distribución pantropical, fue descrito por Carlos Linneo en *Species Plantarum* en 1753, *J. secunda* es una de las 600 especies del género *Justicia*. Es un organismo del dominio Eukaryota, reino Plantae, filum Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Lamiales, familia Acanthaceae, género *Justicia* y especie *J. secunda* [2,41, 55].

J. secunda es una hierba o sub-arbusto perenne de 1- 1,5 m de altura, tallo articulado muy ramificado, nudos prominentes; hojas enteras, simples opuestas y sin estipulas. Posee flores de color morado-rojo, agrupadas en inflorescencias terminales erectas, tipos espiga de 8 cm de longitud, brácteas espatuladas, cáliz formado por cinco sépalos, libres casi hasta la base, lanceolados; corola formada por cinco pétalos. Fruto tipo capsula [21, 56, 57].

1.5 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para aprovechar las sustancias activas de la plantas, es común recurrir a sus extractos. El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente, generalmente agua o alcohol, se puede realizar en frío o en caliente [67].

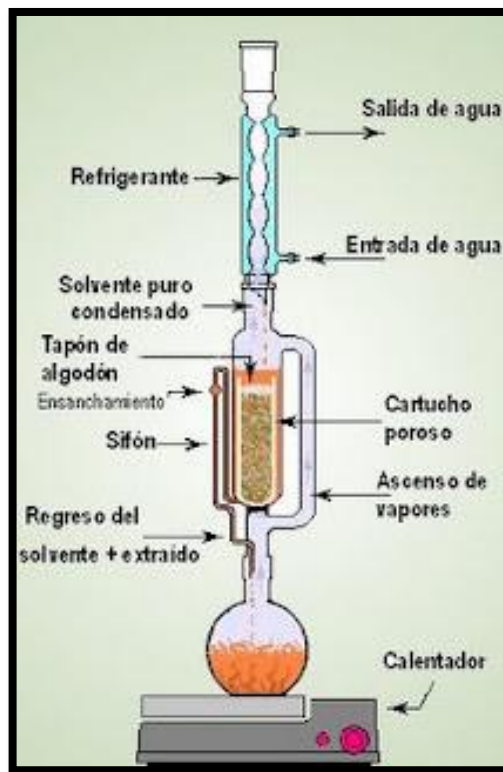
Los procesos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

- ✚ Agua procesos de extracción por infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción.
- ✚ Solventes orgánicos procesos de extracción por maceración, lixiviación o percolación, extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico.

1.5.1 Extracción Por Soxhlet

Es un método en caliente, se compone de un balón donde se encuentran solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra, posee un tubo soxhlet donde es colocada la muestra, la cual va contenida en un cartucho de celulosa y un condensador, es un método conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas [67].

Figura 7. Sistema de extracción soxhlet.



Fuente: González et al, 2009.

1.5.2 Extracción Por Maceración

Se realiza a temperatura ambiente, consiste en remojar el material vegetal, debidamente macerado en un solvente (agua o etanol), hasta que atraviese y

disuelva las porciones solubles del material vegetal; es necesario realizarlo en un recipiente con tapa y dejar en reposo por un periodo de 2 a 14 días con agitación esporádica, posteriormente se filtra el líquido y se recupera el solvente en un rota-evaporador para poder obtener el extracto crudo de la planta [68].

1.6. SELECCIÓN DE SOLVENTE

Entre los solventes más utilizados para obtener metabolitos del material vegetal son el agua, hexano, metanol, etanol, tolueno, éter de petróleo y la acetona, ya que logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés, siendo los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos [99], como es el caso de *J. secunda*.

1.6.1 Hexano

Es un disolvente orgánico apolar aprótico, incoloro, insoluble en agua, económico, relativamente fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia los lípidos neutros y apolares. Es útil para extraer terpenos de baja polaridad, carotenoides de baja polaridad [67] y compuestos fenólicos como flavonoides de baja polaridad [72].

1.6.2 Diclorometano

El diclorometano también conocido como cloruro de metileno, es un solvente orgánico de baja polaridad aprótico, incoloro y de leve aroma dulce. Se utiliza para extraer componentes volátiles como alcaloides, carotenoides, triterpenos, lípidos neutros y esteroides [78].

1.6.3 Metanol

El metanol es un solvente orgánico prótico de alta polaridad a temperatura ambiente se presenta como un líquido ligero de baja densidad, es incoloro, inflamable y toxico; se utiliza para extraer compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides de alta polaridad como aglicona, glicosidos, entre otros [78].

1.6.2 Agua

El agua es una molécula polar, con un elevado índice de tensión superficial. Es un disolvente muy potente, al que se ha catalogado como el disolvente universal, es útil para extraer glicosidos, antocianinas y flavonoides.

1.7 IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA PRELIMINAR DE LOS EXTRACTOS

Con el objeto de comprobar que la extracción resultó eficaz y que realmente se obtuvieron los metabolitos secundarios, responsables de un posible efecto fungicida, se procedió a realizar la identificación cualitativa preliminar de los metabolitos presentes en cada uno de los extractos, sometiéndolos a 2 pruebas, las cuales no requerían patrones químicos previos y se contaba con una base de datos para comparación.

1.7.1 Espectrometría De Masas Con Ionización Por Electro Spray Esi-Ms Mediante Trampa Iónica.

Es un método de análisis rápido y sensible que permite obtener la máxima cantidad de información estructural con la cantidad mínima de muestra (10^{-6} - 10^{-14} g). El espectro de masas es una gráfica que relaciona las masas de los iones específicos (más exactamente, valores de la relación masa/carga del ion, m/z) con sus respectivas concentraciones en la corriente iónica total (TIC) producida por la ionización y la fragmentación de las moléculas del analito en la cámara de ionización.

El espectro de masas suministra información sobre la masa molecular, composición elemental de una sustancia (cuando se utiliza MS de alta resolución) y, en algunos casos, permite establecer la estructura espacial de la molécula.

1.7.2 Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-VIS)

Es una espectroscopia de emisión de fotones y una espectrofotometría; utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e

infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, involucra la absorción de radiación ultravioleta–visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm. Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV, como es el caso del β -caroteno [132].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de *Justicia secunda* sobre aislados de *Moniliophthora roreri*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✚ Obtener extractos de la planta de *Justicia secunda* por dos diferentes métodos de extracción.
- ✚ Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos de *Justicia secunda* sobre aislados del hongo *Moniliophthora roreri*.
- ✚ Comparar los efectos de los métodos de extracción y los solventes utilizados para obtener los extractos de J. secunda, sobre las características de crecimiento de los aislados de M. roreri.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

La recolección y tratamiento del material vegetal de *J. secunda* se realizó en los alrededores de la sede del parque tecnológico de Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander, donde previamente se sembraron esquejes de *J. secunda* entre los meses de febrero y marzo del 2012. Se tomaron 1300 gramos de material vegetal que constituían las partes aéreas (hojas y tallos), secados a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco, durante 28 horas, hasta alcanzar una humedad relativa de 15 % [69]. La obtención de los extractos se realizó por los métodos de maceración y soxhlet.

3.1.1 Maceración Del Material Vegetal

El material vegetal recolectado se maceró con etanol al 99% y agua destilada y se dejó en reposo durante 5 días; la mezcla obtenida se filtró por gravedad y se dividió en cuatro volúmenes iguales, cada uno de los cuales fue sometido a extracción líquido-líquido utilizando como solventes hexano, diclorometano, metanol y agua destilada, en proporciones 1:6 y 1:10 muestra-solvente respectivamente, durante 72 horas a temperatura ambiente. La muestra obtenida se filtró por gravedad y el disolvente se eliminó al vacío en un rota- evaporador tipo HEIDOLPH hasta obtener un volumen aproximadamente de 2 mililitros y posteriormente se sometió a proceso de liofilización en un equipo marca

LABCONCO lyph-lock para obtener los extractos sólidos y concentrados, libre de solventes [61].

3.1.2 Soxhlet

El material vegetal recolectado se sometió a extracción por soxhlet, utilizando como solventes hexano, diclorometano, metanol y agua destilada durante 12 horas. El disolvente se eliminó al vacío en un rota-evaporador tipo HEIDOLPH, hasta obtener un volumen aproximadamente de 2 mililitros y posteriormente se sometió al proceso de liofilización, en un equipo marca LABCONCO lyph-lock, para obtener los extractos sólidos y concentrados, libre de solventes [69].

3.2 AISLAMIENTO DE *Moniliophthora Roreri* Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Siguiendo el protocolo utilizado en Afanador et al. 2008 y Barros 1979 [53,70], con algunas modificaciones, se aislaron y purificaron diferentes aislados de *M. roreri*, de mazorcas enfermas donadas por la Federación nacional de cacaoteros FEDECACAO, provenientes del municipio San Vicente de Chucuri localizadas entre 720 y 1200 m.s.n.m.

Los aislados obtenidos de *M. roreri* presentaron diferentes diámetros y coloraciones, por lo que se utilizó únicamente el aislado que presento mayor diámetro y producción de esporas, característica indispensable para la realización de los ensayos de la actividad antifúngica. Posteriormente se realizó la siembra directa del aislado de *M. roreri* en cajas de Petri con el medio de cultivo acidificado Agar Glucosado de Patata (PDA) especial para hongos fitopatógenos incubando, a 28 °C en oscuridad [71].

3. 3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA

La actividad antifúngica se evaluó por tres métodos diferentes: el método utilizado por Lozada et al., 2012 [1], la técnica de cultivo en micro-placa de Rojas, 2002 [81] y a nivel macroscópico la inhibición del crecimiento micelial [1, 16, 80].

3.3.1 Metodo De Microdilución.

Se utilizó el método de microdilución de Lozada et al., 2012; con el fin de estandarizar este protocolo para *Moniliophthora roreri*, se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos de fondo plano. En cada pocillo se adicionó una solución de esporas *M. roreri*, con concentración de 2×10^6 esporas/ml y diferentes diluciones de extracto entre 10 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Se incubaron a 28°C durante 8 días, observando la mínima concentración de extracto en la cual no fue visible el crecimiento, se realizaron cuatro repeticiones por cada ensayo [79, 82].

3.3.2 Cultivo En Micro-Placa

Se realizó la técnica de cultivo en micro-placa descrita en Rojas, 2011 [81]; una solución de esporas de *M. roreri* en concentración 2×10^6 esporas/ml, fue colocada sobre una lámina porta-objetos con agar PDA con diferentes concentraciones de los extractos entre 200 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, la germinación se determinó por observación microscópica cada 6 horas durante 48 horas [1]. La presencia o ausencia de tubo germinal incipiente o hifas desarrolladas determinó el crecimiento del hongo. Se realizaron cuatro repeticiones para cada concentración de extractos.

3.3.3 Macrodilución

De un cultivo en PDA de *M. roreri* de 10 días de crecimiento, se tomó un fragmento de la colonia de 5 mm de diámetro y se colocó en el centro de cajas de Petri con agar PDA, que contenía diluciones de 100, 200, y 500 $\mu\text{g/ml}$ de los extractos [1, 16, 80]. Se realizaron cuatro repeticiones para cada concentración de extractos de la planta; como controles negativos se realizaron preparaciones sin extracto y como controles positivos, se realizaron preparaciones con oxiclورو de

cobre, fungicida comercial. Se estableció la actividad antifúngica determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), definida como la concentración más baja de extracto, capaz de inhibir el crecimiento visible en el agar (inhibición del crecimiento micelial) [82].

3.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y LOS DIFERENTES SOLVENTES SOBRE CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE *Moniliophthora roreri*.

A cada aislamiento en agar PDA en cajas de Petri, se le evaluaron las siguientes variables cualitativas y cuantitativas, descritas por Afanador 2008 y Phillips 2003 [43,53], con algunas modificaciones: inhibición del crecimiento micelial, producción de esporas, tamaño de la espora, día de esporulación y tipo de esporulación.

Se realizó un diseño de experimentos, en el cual se emplearon diferentes métodos de extracción de extractos de *J. secunda* y concentraciones de 100, 200, y 500 µg/ml, para los extractos obtenido con los diferentes solventes.

Tabla 1. Diseño experimental general del trabajo con concentraciones: 100, 200, y 500 µg/ml, n = 4

Diseño experimental				
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Agua
Soxhlet	T1	T4	T7	T10
Maceración 1:6	T2	T5	T8	T11
Maceración 1:10	T3	T6	T9	T12

3.4.1 Variables Cuantitativas

- ✚ La inhibición del crecimiento micelial, se realizó midiendo la longitud de la colonia, sobre un radio prefijado en cada una de las cajas de Petri y se calculó usando la fórmula de Saldarriaga y Pineda 2001, asumiendo que el

máximo crecimiento, es el observado en el control negativo (sin extractos).

Para el cálculo se procede de la manera siguiente:

$$100 - \frac{Tx100}{C} = \%inhibición$$

Donde T son los valores del tratamiento y C son los valores del control negativo.

- ✚ La producción de esporas por cm² se determinó a los 15 días de edad de los cultivos, preparando una suspensión de esporas del hongo en solución salina; se realizó el conteo con ayuda de una cámara de Neubauer.
- ✚ Para medir el tamaño de las esporas (longitud para las esporas de forma alargada, diámetro para las esporas globosas), se tomó 500 µL de la suspensión de esporas preparada y se depositó en un portaobjetos. Se observó al microscopio óptico y se tomaron micrografías con ayuda de una cámara digital, para ser medidas posteriormente con el programa image J Basics versión 1.38.

3.4.2 Variables Cualitativas

- ✚ La variable día de esporulación se determinó, por observación visual de las colonias cada 24 horas, en un periodo de 10 días, determinando el primer día de esporulación por cambios en el color de la colonia.
- ✚ La variable tipo de esporulación de las colonias de *M. roreri*, se codificó bajo el formato utilizado en Afanador 2008 (Tabla 2).

Tabla 2. Codificación de la variable tipo de esporulación

Variable	Categoría	Valor asignado
Tipo de esporulación	Uniforme	0
	Anillos en toda la colonia	1
	Uniforme con anillos terminales	2
	Uniformes con anillos centrales	3

3.5 DETERMINACIÓN PRELIMINAR DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS DE *Justicia secunda*.

Los extractos obtenidos con los solventes orgánicos que presentaron mayor actividad antifúngica, se utilizando un espectrómetro de masas Amazon X de Bruker, con ionización por electro spray ESI-MS mediante trampa iónica.

El método de análisis usado, fue en modo negativo con voltaje de capilar de 4500 voltios, usando como gas secante nitrógeno con un flujo de 5L por minuto y presión de 8 psi a una temperatura de 20°C.

A su vez se cualificaron, los extractos obtenidos con solvente orgánicos que presentaron mayor actividad antifúngica, verificando una exploración de UV-vis completa 190-900nm, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis marca Jenway modelo 6405.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron las pruebas *a priori* de Shapiro-Wilk, para determinar la normalidad y Levene para determinar la homogeneidad de varianzas (Zar, 1999), en cada variable. Para identificar si existían diferencias significativas entre los métodos de extracción, los solventes utilizados en la extracción y las concentraciones en las que se emplearon los extractos obtenidos, se utilizó una ANOVA factorial, siendo los factores, los métodos de extracción, solventes de extracción y concentraciones.

Se realizó una prueba *a posteriori*, de Tukey, para las variables que reportaron diferencias significativas en el ANOVA ($p > 0,05$). Se realizaron pruebas de X^2 para evaluar si los días de esporulación eran independientes del método, solvente de extracción y concentración a la cual se empleó cada extracto. La variable cualitativa tipo de esporulación, se le realizó estadística descriptiva. Todas las

pruebas estadísticas se ejecutaron con el software STATISTICA V. 7.0 (Statsoft Inc, 2004).

4. RESULTADOS.

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS DE *Moniliophthora roreri*

Posteriormente a la purificación de *M. roreri*, se obtuvo tres diferentes aislados, los cuales se diferenciaron por características de crecimiento in vitro fenotípicas como color, textura y formación de anillos de esporulación; además de características de crecimiento como diámetro del micelio, producción de esporas y crecimiento, se tomó el aislado que presentó las mejores características de crecimiento como control negativo (carente de extractos) y para realizar los bioensayos (figura 8, c).

Figura 8. Aislados obtenidos posteriormente a la purificación, a) aislado con crecimiento más rápido, b) aislado con crecimiento rápido y menor producción de esporas, c) aislado con mayor diámetro y producción de esporas.



4.1.1 Determinación De La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Todos los extractos mostraron actividad antifúngica, inhibiendo el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* en porcentajes mayores o iguales a 7,5%, se encontraron concentraciones mínimas inhibitorias requeridas para reducir el 90% y 50% del crecimiento de *Moniliophthora roreri* (CMI₉₀ y CMI₅₀).

En la determinación de la actividad antifúngica con el método utilizado por Lozada et al, 2012 [1]; se observaron CMI₉₀ ≥ 200 µg/mL, para los extractos obtenidos con

todos los solventes orgánicos, a excepción del solvente hexano que presentó $CMI_{90} \geq 600 \mu\text{g/mL}$ y $CMI \geq 1000 \mu\text{g/mL}$, en el método de extracción maceración 1:10 y maceración 1:6 respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria, método de microdilución, n=4

concentración mínima inhibitoria CMI90		
Método	Solvente	Concentración
Soxhlet	Diclorometano	$\geq 200 \mu\text{g/mL}$
Soxhlet	Metanol	$\geq 200 \mu\text{g/mL}$
Soxhlet	Hexano	$\geq 200 \mu\text{g/mL}$
Soxhlet	Agua	
maceración 1:10	Diclorometano	$\geq 200 \mu\text{g/mL}$
maceración 1:10	Metanol	$\geq 200 \mu\text{g/mL}$
maceración 1:10	Hexano	$\geq 600 \mu\text{g/mL}$
maceración 1:10	Agua	
maceración 1:6	Diclorometano	$\geq 200 \mu\text{g/mL}$
maceración 1:6	Metanol	$\geq 200 \mu\text{g/mL}$
maceración 1:6	Hexano	$\geq 1000 \mu\text{g/mL}$
maceración 1:6	Agua	

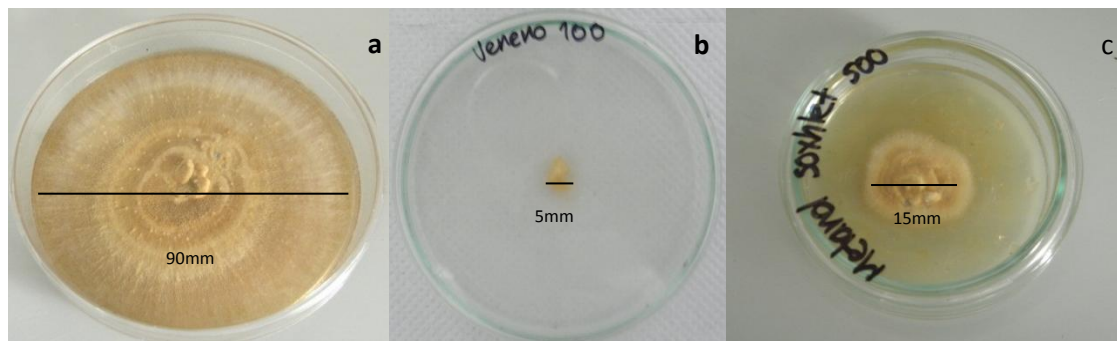
Para el método de macrodilución, se consideraron activos los extractos que presentaron porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mayores o iguales al 50%; tomando este valor como la CMI_{50} . De los doce extractos evaluados en concentraciones $100\mu\text{g/mL}$, $200\mu\text{g/mL}$ y $500\mu\text{g/mL}$, seis presentaron una inhibición en el crecimiento micelial de *M. roreri* mayor al 50% (Tabla 4).

Tabla 4. Extractos que presentaron inhibición $\geq 50\%$ del crecimiento micelial, en el método de macrodilución, Concentración mínima inhibitoria CMI50.

Método de extracción	Solvente	Concentración	% inhibición del crecimiento micelial	Desviación estándar
Maceración 1:10	Diclorometano	500	54,08	2,24
Soxhlet	Diclorometano	500	63,14	1,56
Soxhlet	Hexano	500	63,52	1,93
Maceración 1:10	Metanol	200	65,15	2,54
Maceración 1:10	Metanol	500	70,44	2,82
Soxhlet	Metanol	500	81,76	1,21

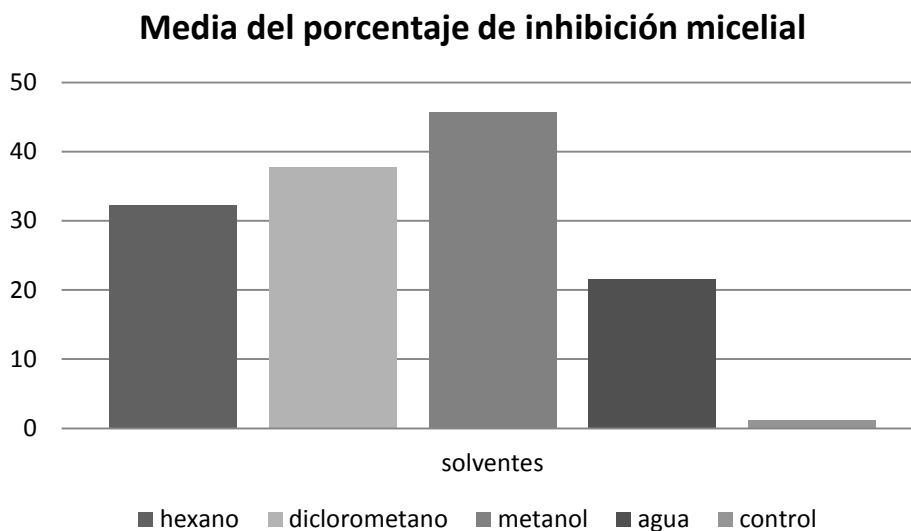
El extracto obtenido, con el método de extracción soxhlet y solvente metanol a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue el más activo, presentó una inhibición media del 81,25% como se observa en la figura 9.

Figura 9. Método de macrodilución, aislados de *M. roreri* **a)** Aislado control negativo, sin presencia de extractos. **b)** Aislado control positivo con oxiclóruo de cobre a concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **c)** Aislado con extracto obtenido con método soxhlet y solvente metanol a concentración 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



La media más baja de porcentaje de inhibición micelial, fue del extracto obtenido con el solvente agua (figura 10).

Figura 10. Gráfico de barras, media del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para cada solvente y control, n=144, Desviación estándar=7,21; varianza=51,98.



4.1.2 Cultivo En Micro-Placa

En la técnica de cultivo en micro-placa, se observaron colonias completamente desarrolladas (hifas, esporas inmaduras adheridas a las hifas, tubos germinales incipiente y esporas maduras), en presencia de los extractos obtenidos con agua con los dos métodos de extracción, a concentraciones iguales e inferiores a 500 µg/mL (figura 11, figura 12, figura 13). Por otra parte, los extractos obtenidos con hexano con el método de extracción por maceración, presentaron colonias desarrolladas a concentraciones iguales e inferiores a 400 µg/mL (figura 14, figura 15, figura 16).

Figura 11. Micrografía con una magnificación de 5X, micro-placa con extractos obtenidos con agua y método maceración 1:6 a concentración 200µg/mL. Se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas maduras (em).

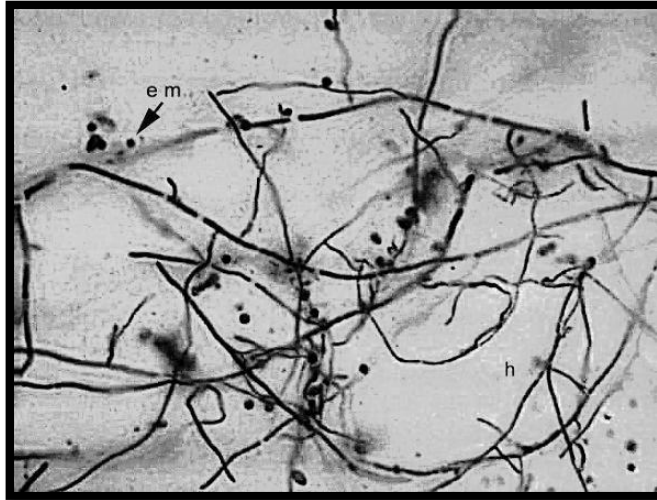


Figura 12. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con agua y método maceración 1:6 a concentración 300µg/mL. Se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas inmaduras adheridas a las hifas (ei.).

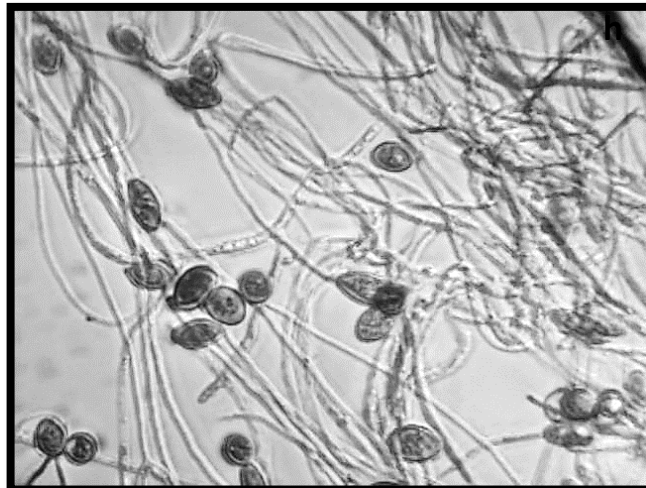


Figura 13. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con agua y método soxhlet a concentración 400µg/mL, se observa hifas completamente desarrolladas (h), presencia de esporas maduras (em) y esporas inmaduras adheridas a las hifas (ei).

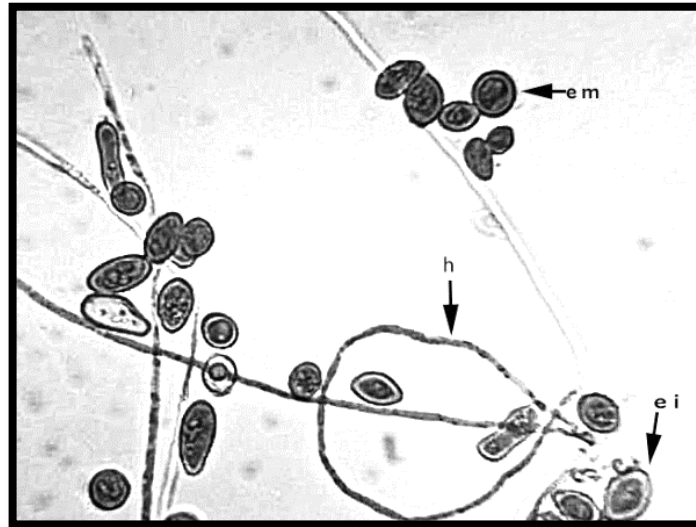


Figura 14. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con hexano y método maceración 1:6 a concentración 200µg/mL se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas maduras (em).

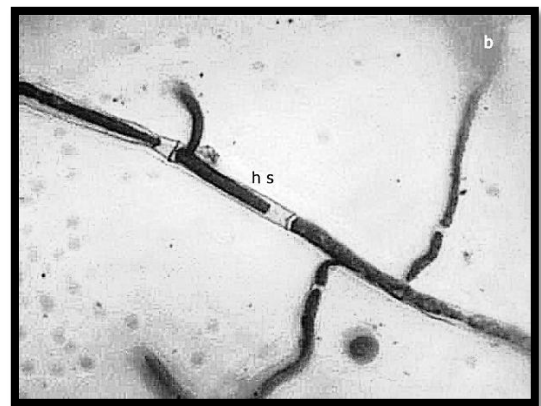
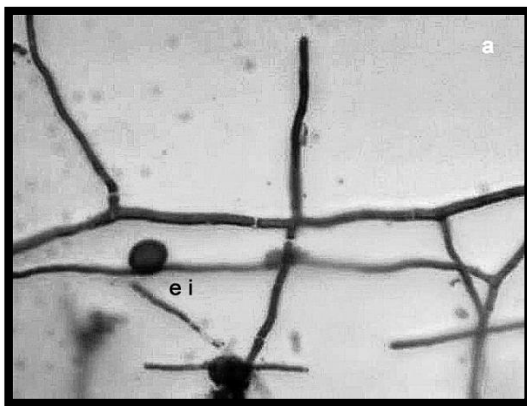


Figura 15. Micrografía con una magnificación de 5X, micro-placa con extractos obtenidos con hexano y método maceración 1:10 a concentración 300µg/mL se observa hifas completamente desarrolladas (h) y presencia de esporas maduras (em).



Figura 16. Micrografía con una magnificación de 10X y 40X, micro-placa con extractos obtenidos con hexano y método de maceración 1:6 a concentración 200µg/mL.; a) se observa presencia de esporas inmadura adheridas a las hifas (ei); b) hifas hialinas septadas completamente desarrolladas (hs).

;



En las micro-placas con extractos obtenidos del solvente diclorometano y método de extracción maceración 1:6, en concentraciones inferiores e iguales a 500 µg/mL, se observó presencia de tubo germinal incipiente (figura 17, figura 18). En

cuanto a los extractos obtenidos con el metanol, no se observó germinación de esporas (formación de tubo germinal incipiente o hifas desarrolladas) en el periodo de observación de 48 horas (figura 19).

Figura 17. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con diclorometano y método maceración 1:6 a concentración 300µg/mL se observa tubo germinal incipiente (t).



Figura 18. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con diclorometano y método maceración 1:6 a concentración 200µg/mL se observa tubo germinal incipiente (t)

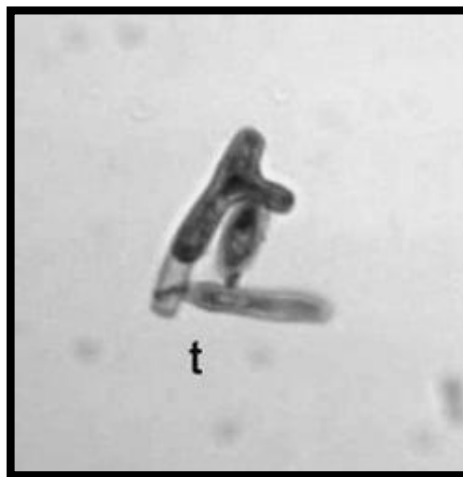
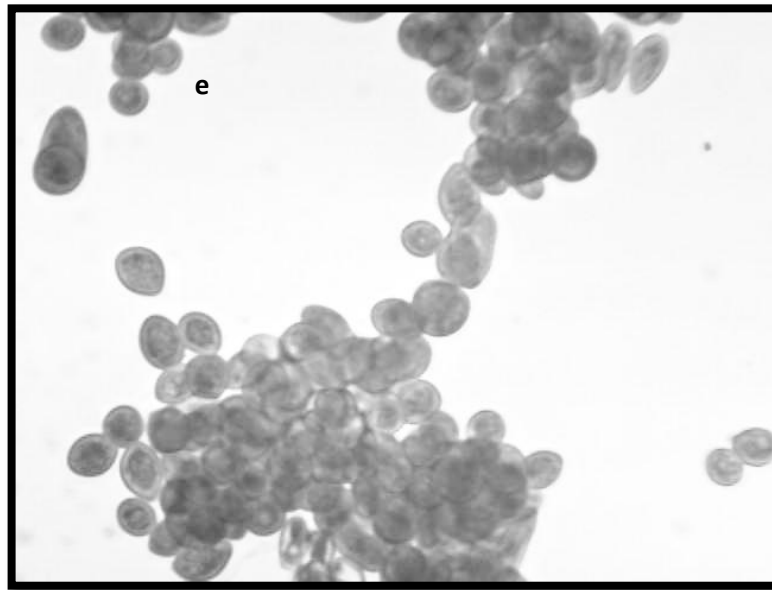


Figura 19. Micrografía con una magnificación de 40X, micro-placa con extractos obtenidos con metanol y método maceración 1:10 a concentración 300µg/mL; se observa esporas maduras sin germinar (**e**).



4.2. EFECTO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y LOS DIFERENTES SOLVENTES SOBRE CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE *Moniliophthora roreri*.

4.2.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL.

Las variables e interacciones que influyeron significativamente en la inhibición micelial se muestran en la Tabla 5. No se observan diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial, entre los tratamientos obtenidos con los diferentes métodos de extracción (soxhlet, maceración 1:6 y 1:10).

Tabla 5. Variables e interacciones estadísticamente significativas, en la inhibición de crecimiento micelial.

Variables	N	gl	F	p
Concentración	148	2	87,05	0,000000
Solvente	148	3	40,00	0,000000
Método	148	2	0,70	0,560572
Concentración * Solvente	148	6	2,53	0,023648
Concentración * Método	148	4	7,52	0,062400
Solvente * Método	148	6	5,62	0,000032
Concentración* Solvente * Método	148	12	15	0,000000

En cuanto a los solventes, se encontró diferencias estadísticamente significativas $F=40,0$ $p=0,00$; para la variable inhibición del crecimiento micelial, se observó que el tratamiento obtenido con el metanol, produjo una mayor inhibición del crecimiento micelial con relación a los otros solventes (media= 1,602). Asimismo se evidenció una tendencia de agrupación entre los solventes orgánicos (Tabla 6), hexano-diclorometano (grupo 1); diclorometano-metanol (grupo 2) y Agua (grupo3).

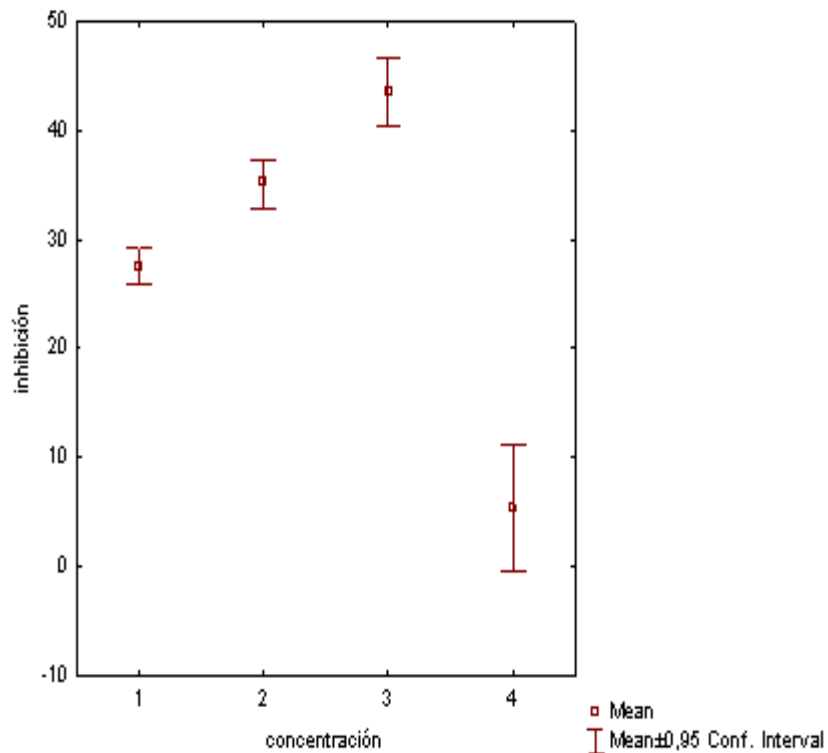
Tabla 6. Test de tukey, variable inhibición de crecimiento micelial vs. Solventes.

Solventes	Hexano (1,527)	Diclorometano (1,566)	Metanol (1,602)	Agua (1,426)
Hexano (1,527)		0,432556	0,018109	0,000531
Diclorometano (1,566)	0,432556		0,488716	0,000008
Metanol (1,602)	0,018109	0,488716		0,000008
Agua (1,426)	0,000531	0,000008	0,000008	

Between MS =0,01187 df = 140,00. Los valores entre paréntesis corresponden a la media.

La variable concentración mostró diferencias estadísticamente significativas $F=87,05$ $P=0,000$, observándose tres grupos, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (grupo 1), 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (grupo 2) y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (grupo 3), también se presentó que a mayor concentración hubo mayor inhibición del crecimiento micelial (Figura 20).

Figura 20. Inhibición del crecimiento con diferentes concentraciones 1=concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2=concentración 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3=concentración 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4=control carente de extractos.



4.2.2 Producción De Esporas

Existen diferencias significativas entre los tratamientos, se observa que las variables método de extracción, solventes de extracción y concentración tienen efecto sobre la producción de esporas (Tabla 7).

Tabla 7. Variables e interacciones estadísticamente significativas en la producción de esporas.

Variables	N	gl	F	p
Concentración	148	2	859,92	0,00
Solvente	148	3	534,10	0,00
Método	148	2	104,75	0,00
Concentración * Solvente	148	6	119,24	0,00
Concentración * Método	148	4	51,997	0,00
Solvente * Método	148	6	308,27	0,00
Concentración* Solvente * Método	148	12	207,65	0,00

Se observa que hay una menor producción de esporas, en los tratamientos obtenidos con diclorometano (media=1826000), respecto al control y los demás solventes (Tabla 8); de igual manera se observa que los tratamientos obtenidos con el agua difieren de los solventes orgánicos, mostrándose dos grupos: hexano-diclorometano-metanol (grupo 1) y agua (grupo2).

Tabla 8. Test de tukey, variable Producción de esporas vs. Solventes.

Solventes	Hexano (2039000)	Diclorometano (1826000)	Metanol (2160000)	Agua (2799000)
Hexano (2039000)		0,68446	0,92237	0,000450
Diclorometano (1826000)	0,68446		0,30372	0,000010
Metanol (2160000)	0,92237	0,303723		0,000479
Agua (2799000)	0,00045	0,000010	0,000479	

Between MS =6619E8 df =140,00. Los valores entre paréntesis corresponden a la media.

Por otra parte para el método de extracción, se evidencian dos grupos: soxhlet-maceración 1:10 (grupo 1) y maceración 1:10-maceración1:6 (grupo 2). Se

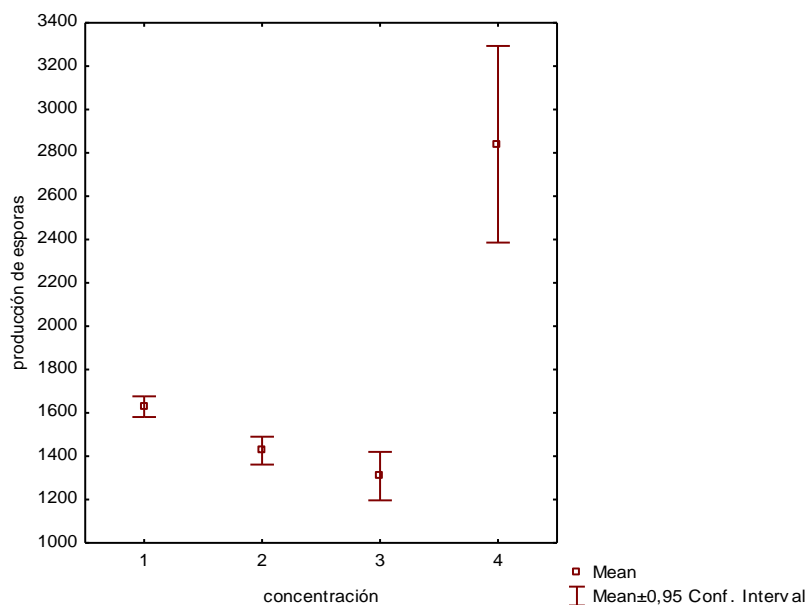
observa que los tratamientos obtenidos con el método soxhlet, tienen menor producción de esporas que los demás métodos de extracción (Tabla 9).

Tabla 9. Test de tukey, variable Producción de esporas vs. Métodos de extracción.

Métodos de Extracción	Soxhlet (2056000)	Maceración 1:10 (2106000)	Maceración 1:6 (2190000)
Soxhlet (2056000)		0,069621	0,001246
Maceración 1:10 (2052000)	0,069621		0,944376
Maceración 1:6 (2190000)	0,001246	0,944376	

Al igual que la variable anterior, la concentración mostró diferencias estadísticamente significativas $F=859,92$ $p=0,000$, siendo evidente que a mayor concentración de extractos empleada menor producción de esporas (figura 21).

Figura 18. Producción de esporas con diferentes concentraciones de tratamientos 1=concentración 100µg/mL, 2=concentración 200µg/mL, 3=concentración 500µg/mL 4=control carente de extractos.



4.2.3 Tamaño De Las Esporas

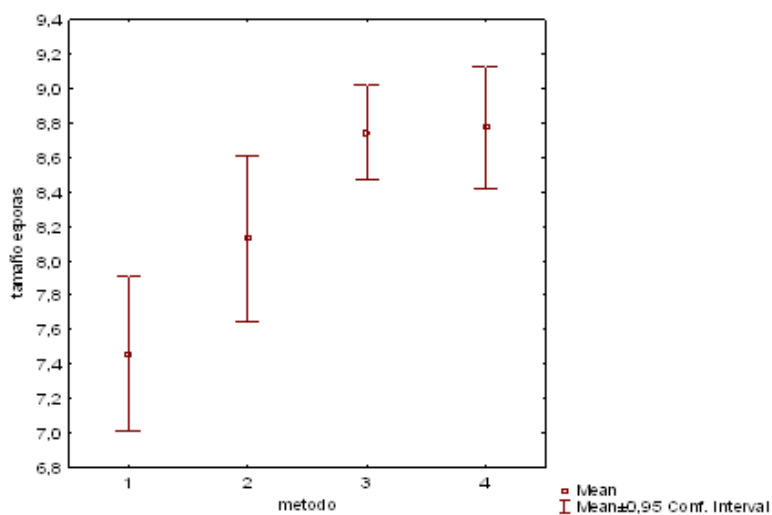
Se observa que las variables método de extracción, solventes de extracción y concentración influyen sobre el tamaño de esporas (Tabla 10).

Tabla 10. Variables e interacciones estadísticamente significativas en el tamaño de espora.

Variables	n	gl	F	P
Concentración	148	2	60,86	0,0000
Solvente	148	3	177,4	0,0000
Método	148	2	396,9	0,0000
Concentración * Solvente	148	6	166,1	0,0000
Concentración * Método	148	4	350,2	0,0000
Solvente * Método	148	6	62,08	0,0000
Concentración* Solvente * Método	148	12	179,7	0,0000

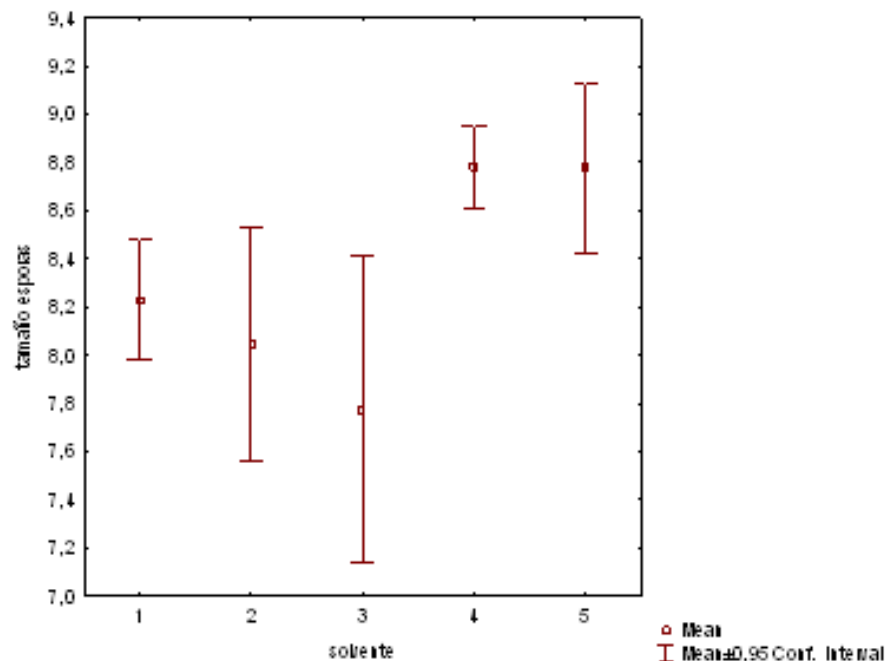
Los métodos de extracción en la variable tamaño de espora, presentaron dos grupos definidos soxhlet-maceración 1:10 (grupo 1) y maceración 1:10-maceración 1:6 (grupo 2). Se observa que el método de extracción soxhlet posee un rango de tamaño de esporas menor respecto al control y los demás métodos de extracción (figura 22), asimismo el tamaño de las esporas de los tratamientos obtenidos con el método maceración 1:6 presentaron un tamaño similar al control (figura 22).

Figura 19. Tamaño de esporas con diferentes solventes de extracción 1=soxhlet, 2=maceración 1:10, 3=maceración 1:6 y 4=control carente de extractos.



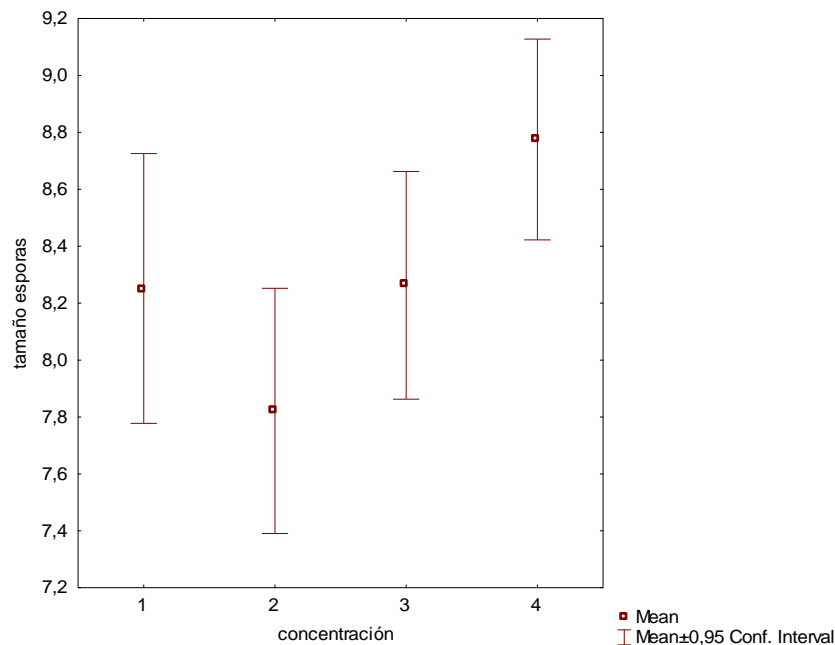
Respecto a los solventes de extracción el metanol mostró menor tamaño medio de esporas (media= 7,528), respecto al control y los demás solventes (figura 23); igualmente se observa diferencias significativas entre los solventes orgánicos y el agua (figura 23), presentándose dos grupos definidos: hexano-diclorometano-metanol (grupo 1) y agua (grupo 2).

Figura 20. Tamaño de espora con diferentes solventes de extracción 1=hexano, 2=diclorometano, 3=metanol, 4=agua y 5=control carente de extractos.



La concentración (100 µg/mL, 200 µg/mL y 500 µg/mL) a la cual se aplicó cada tratamiento no presentó un efecto significativo sobre el tamaño de esporas, como se observa en la figura 24, en la cual las barras se traslapan.

Figura 21. Tamaño de espora con diferentes concentraciones de tratamientos, 1=concentración 100µg/mL, 2=concentración 200µg/mL, 3=concentración 500µg/mL 4=control carente de extractos.



4.2.4. Día De Esporulación

El primer día de esporulación varía de acuerdo al método y solvente de extracción utilizado, lo cual no ocurre con la concentración ($p=0.11$). El día de esporulación depende de los solventes y el método de extracción utilizado.

Tabla 11. Prueba de X^2 para el primer día de esporulación.

	X^2	GI	P
Concentración	25,811	12	0.11
Solvente	133.613	16	0.00
Método	59.165	12	0.00

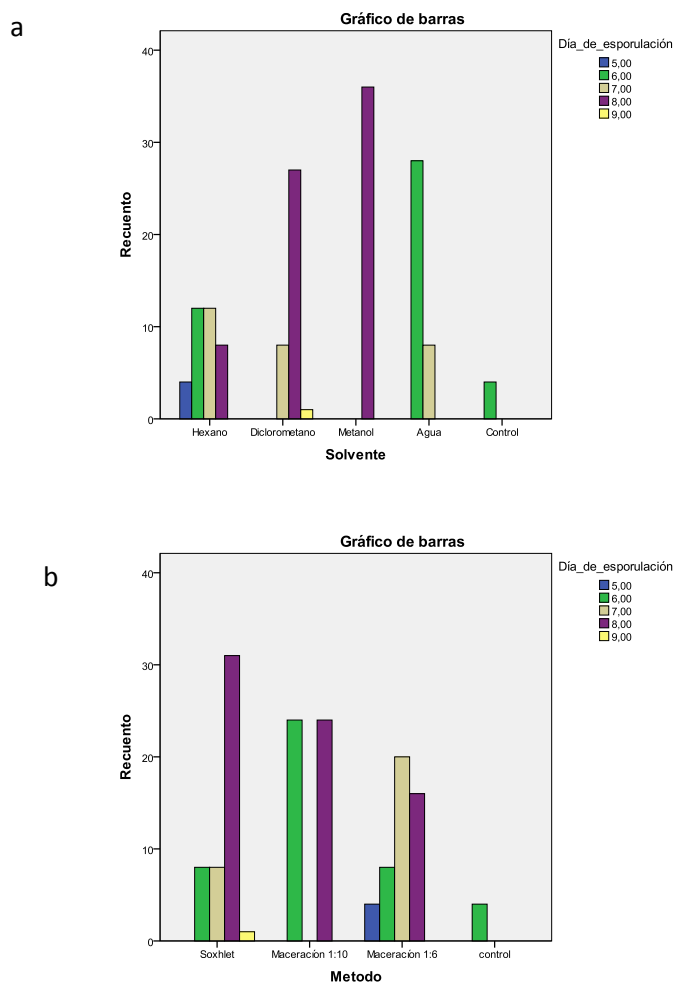
X^2 valor prueba de chi-cuadrado. **gi** grados de libertad. **P** probabilidad

Respecto a la concentración, los aislados a los que se le suministro los extractos en una concentración de 500 µg/mL, presentaron mayor número de casos con el primer día de esporulación más tardío en relación al control (día ocho).

Por otra parte se observa, que el día de esporulación de los aislados con extractos obtenidos con metanol fue posterior respecto al control y los demás extractos (figura 25, a).

Al comparar los métodos de extracción con el grupo control se observa, un retardo en el primer día de esporulación (figura 25, b); siendo el método soxhlet, el que presentó la mayoría de los aislados como primer día de esporulación el día ocho.

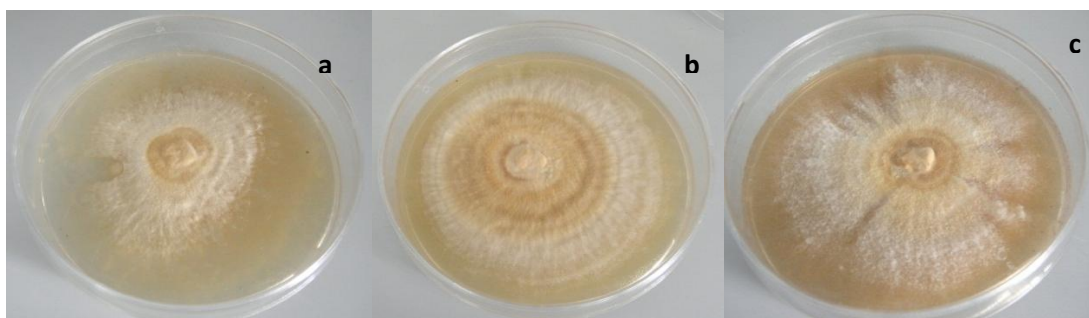
Figura 22. Primer día de esporulación en el control y los tratamientos, a) Solvente de extracción utilizado. b) Método de extracción utilizado.



4.2.5 Tipo De Esporulaci3n De Los Aislados

Aunque se utiliz3 un 3nico aislado de *M. roreri* en el presente estudio, es importante destacar la variabilidad de crecimiento observada. El tipo de esporulaci3n predominante fue el de anillos en toda la colonia (52,77%) tipo 1, seguido del tipo de esporulaci3n uniforme con anillos centrales (33,33%) tipo 3 y uniforme (13,88%) tipo 0, mientras la esporulaci3n uniforme con anillos terminales tipo 2 no se observ3 en los aislados trabajados (figura 26).

Figura 23. Tipo de esporulaci3n, a) uniforme tipo 0; b) anillos en toda la colonia tipo 1; c) uniforme con anillos centrales tipo 3.



4.2.6. Determinaci3n Preliminar De Los Compuestos Presentes En Los Extractos De *Justicia secunda*.

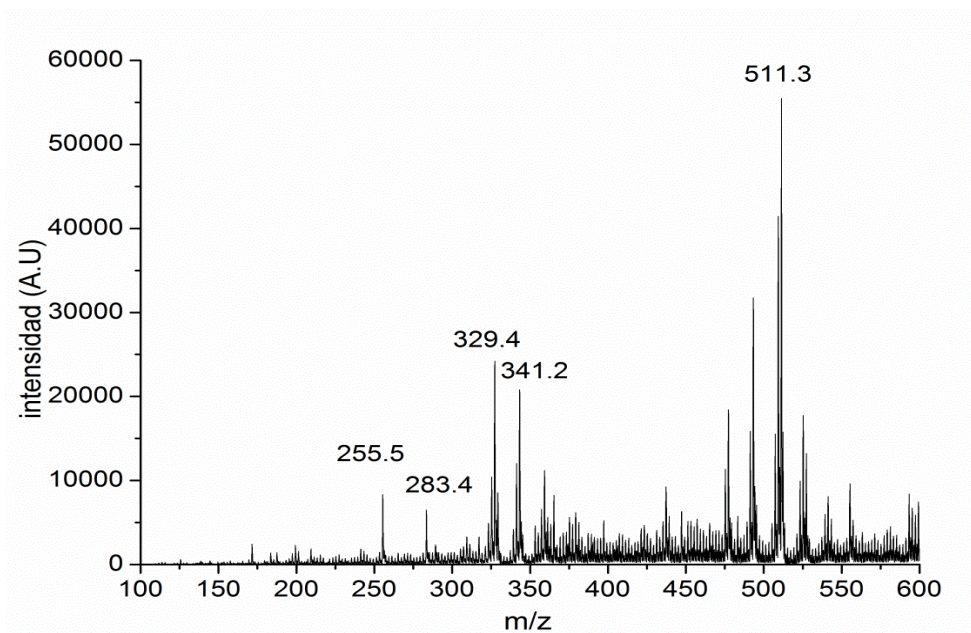
En la figura 27 se muestran los espectros de masas del extracto de *J. secunda* obtenido con el metanol, el cual mostr3 mayor actividad antif3ngica, en donde se observan claramente 5 picos relevantes.

En el espectro la intensidad de los picos con valores m/z 255.5 y m/z 341.2 son consistentes con la ruta de fragmentaci3n de los flavonoides ya que se observaron se1ales debidas a la perdida de mol3culas de H_2O , CH_3 , CO_2 y COH_2 caracter3sticas de este tipo de sustancias. Dichas se1ales coinciden con las mol3culas de liquiritigenin que es una flavona con peso molecular de 255g/mol y 3',4'- Dihidroxi flavonol con peso molecular cercano a 341.2g/mol [74].

El pico correspondiente al valor m/z 283.4 corresponde a una aglicona luteolina (luteolina-7-O-diglucuronida). Los estudios han demostrado la presencia de flavonoides de estructura simple, sin embargo se cree que en las plantas la mayoría de las veces estas moléculas se encuentran ligadas a carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glicosidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se les denomina agliconas flavonoides [74, 77].

El pico con valor m/z 511 corresponde probablemente a la molécula de lignano fenólico encontrada en la especie *Justicia purpuria* reportado por Kavitha *et al* 2013 y el pico m/z 329 es consistente al 9,10- Antracenodiol- 1,8-dihidroxi 4,5 dinitro, correspondiente a un polifenol también presente en *J. secunda*.

Figura 24. Espectros de masas ESI-MS obtenidos del extracto de *J. secunda* con el solvente metanol.



En la figura 28, se muestra el espectro de masas del extracto de *J. secunda* obtenido con diclorometano, donde se observan claramente 6 picos relevantes.

En el espectro la intensidad de los picos con valores m/z 156.02 y 426.7 son consistentes con ruta de fragmentación de los terpenos ya que se observaron señales debidas a la pérdida de moléculas de CO₂, OH, CO y OCH₃ características de este tipo de moléculas. En la literatura estas señales y el m/z 426,7 coinciden con el 13(18)-Oleanen-3-ol, el cual ha sido reportado para especies como *Cucurbita pepo*, *Derris laxiflora*, *Pistacia lentiscus* entre otras, al cual se le atribuye actividades antimicrobianas, antivirales y antitumorales [94, 95,96]. El pico con valor m/z 156.02 corresponde a monoterpenos los cuales son componentes primarios de los extractos esenciales de numerosas plantas, posiblemente al borneol o una mentona [97,98].

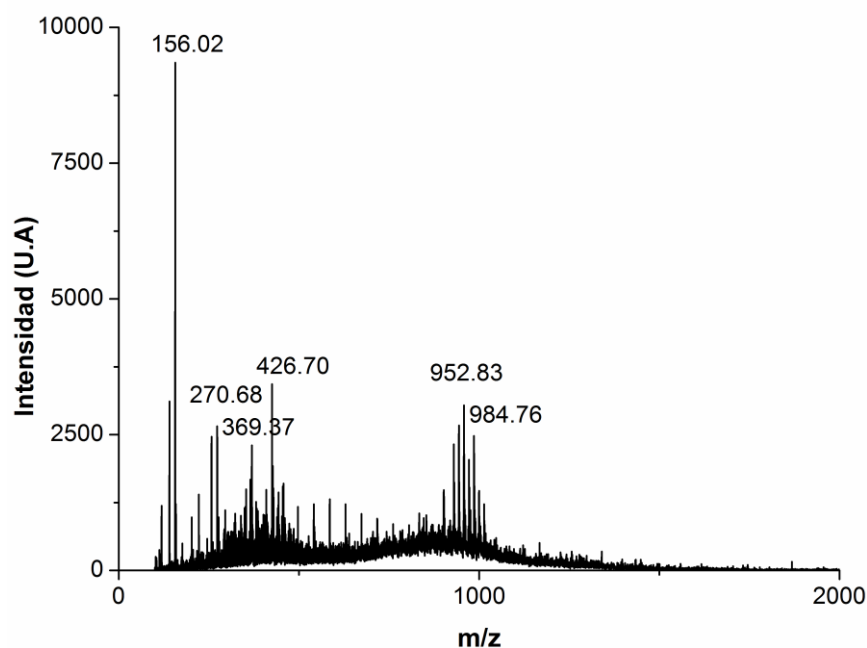
El pico con valor m/z 369.37 corresponde probablemente a un lignano, ya que en la ruta de fragmentación se observaron señales debidas a la pérdida de moléculas de OH, CH₃ y O características de este tipo de sustancias: en la literatura este pico coincide con el lignano kaerofilina, presente en la especie *Justicia hyssopifolia*, *Montrouziera sphaeroidea* y *Zanthoxylum hasslerianum*. El género Justicia es una fuente importante de lignanos, varios de los cuales poseen diferentes actividades biológicas (antitumoral, antifúngica, hipolipidémica, antidepresiva, antiviral) [99, 100,101]

En el espectro de masa de los extractos con valor m/z 270.68 es consistente con la ruta de fragmentación de los flavonoides ya que se observaron señales debidas a la perdida de moléculas de H₂O, CH₃, CO₂ y COH₂. Probablemente se trata de una apigenina que es una flavona la cual ha sido reportado en especies del género como *Justicia procumben*, *Justicia ciliata* y otras especies *Cephalotaxus wilsoniana* y *Echinops echinatus*, adjudicándole propiedades antimicrobianas y farmacológicas [102].

Los picos con valores m/z 952.83 y 984.76 no presentaron una ruta de fragmentación clara o evidente, por lo que no se realizó una búsqueda en la

literatur; estos pesos moleculares pudieron ser aductos formados por el método de ionización empleado (negativo).

Figura 25. Espectros de masas ESI-MS obtenidos del extracto de *J. secunda* con el solvente diclorometano.



En la figura 29, se muestra el espectro de masas del extracto de *J. secunda* obtenido con el hexano, donde se observan claramente 7 picos relevantes.

Los picos correspondientes a los valores m/z 301.1, 365.1 y 384.1, 615.1 presentaron señales debidas a la pérdida de moléculas H₂O, CH₃, CO₂ y COH₂, características de los flavonoides, además en los picos m/z 301.1 y 365.1 se observaron en la ruta de fragmentación señales de varios iones OH y CH₂CO por esta característica probablemente estos picos pertenecen a una peonidina y una malvidina respectivamente, que son antocianinas de tipo aglicona, estos pigmentos están ampliamente distribuidos en muchas plantas, los compuestos de esta familia presentan variados efectos beneficiosos para la salud: prevención contra cáncer, propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitumorales, antimicrobianas, vasorelajantes y antioxidantes. La malvidina presenta un abanico

de pigmentos característicos del color purpúreo, están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces; los pigmentos de la peonidina varían de rojo-azul dependiendo del pH [103, 104, 105, 106].

El pico con valor m/z 384.1 posiblemente corresponde a una artemetina, este flavonoide se encuentra ampliamente distribuido y se ha reportado en especies como *Artemisia annua*, *Cordia arassavica*, *Vitex rotundifolia*, *Viticis fructus*, *Achilea millefolium*, *Brickellia chlorolepis* entre otras. Este flavonoide ha sido estudiado en relación con sus efectos antioxidantes, propiedades anti-inflamatorias y su capacidad para inhibir el ciclo celular [107, 108, 109,110].

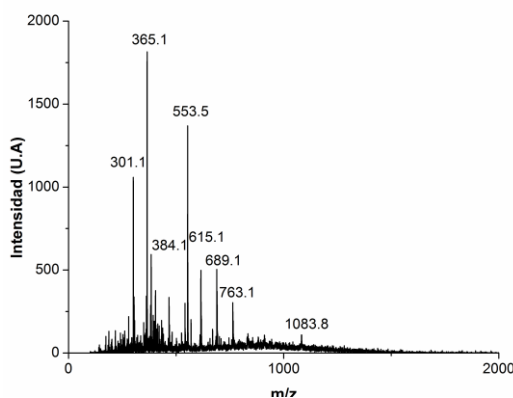
En el espectro de masa del extracto de *J. secunda* el pico con valor m/z 615.1 corresponde a un flavonoide llamado forsythoside A, a la cual se le adjudican bondades antiinflamatoria y antimicrobianas, este flavonoide está presente en *Forsythia suspens* y *Lippia citriodora* [111].

Los picos con valores m/z 553.5y 689.1 presentaron señales debidas a la fragmentación de la molécula para la formación de CO_2 , OH, CO y OCH_3 características de este tipo de los terpenos. En la literatura estas señales y el espectro de masa m/z 553.5 coinciden con el coumaroyl-shanzhiside, un terpeno de tipo iridoide, el cual ha sido reportado para especies como *Barleria Lupulina*, *Barleria prionitis* *Odontites verna* y *Eremostachys laciniata*, se le atribuyen bondades farmacológicas como antiinflamatoria, antimicrobiana y amebicida [112, 113, 114].

En el espectro de masas de los extractos de *J. secunda* el pico con valor m/z 689.1, corresponde al terpeno erythrodiol-3-palmitate, este compuesto ha sido reportado para las especies de plantas *Bumelia obtusifolia*, *Pouteria caimito*, *Pouteria torta* y *Erythroxyllum passerinum*, a este compuesto se otorga actividad antioxidante, antiinflamatoria, y antibacteriana [115,116,117].

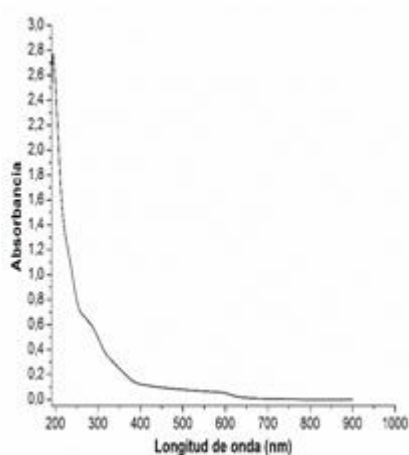
El pico con valor m/z 763.1 es propio de un flavonoide, pero el espectro de masas no coincide con lo encontrado en la literatura para este tipo de compuestos, posiblemente esto se debe a la presencia de hidratos de carbono que en la ruta de fragmentación no fue visible.

Figura 26. Espectro de masas ESI-MS obtenidos del extracto de *J. secunda* con el solvente hexano.



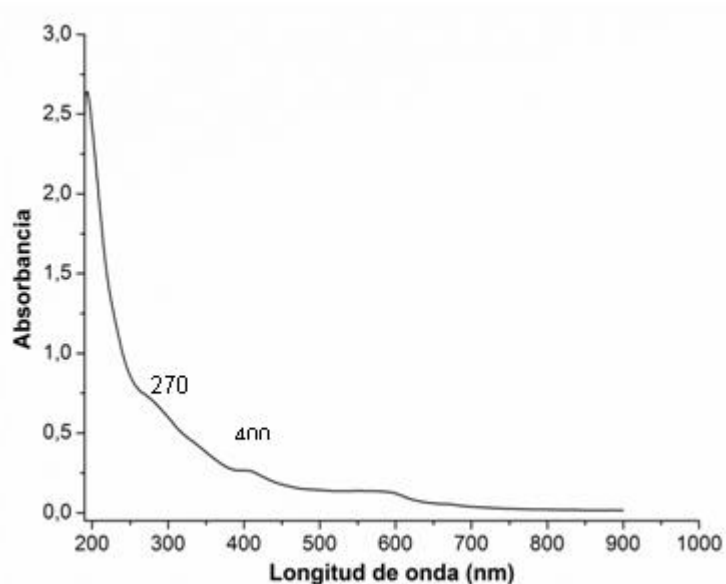
En cuanto a los picos máximos de absorbancia en el espectro del UV-vis, para los extractos obtenidos con el metanol fueron de 280 nm (figura 30); esta banda es característica de los compuestos polifenólicos que muestran una estructura química tipo flavonoides (240-285nm) [128].

Figura 27. Espectro de UV-Vis, obtenido del extracto de *J. secunda* con el solvente metanol.



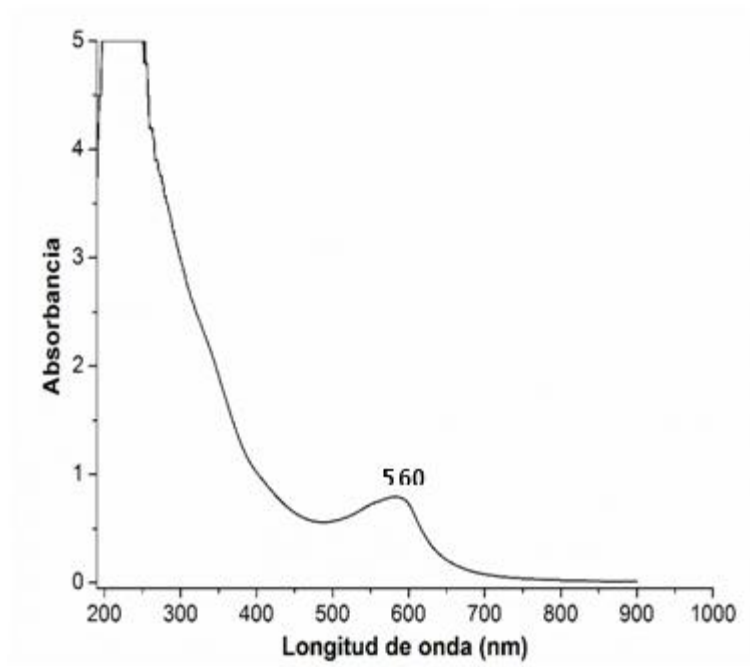
En el espectro de UV-Vis, para el extracto de *J. secunda* obtenido con el hexano, los picos máximos de absorbancia fueron entre los 270nm y los 400 nm (figura 31); los compuestos fenólicos especialmente los flavonoides en un espectro UV generalmente aparecen sus señales de intensidad entre los 240nm-280 nm [128]; en cuanto al pico con un valor de 400 nm, corresponde a un carotenoide, el espectro visible de estos pigmentos está en el rango de los 400-450 nm [129].

Figura 28. Espectro de UV-Vis, obtenido del extracto de *J. secunda* con el solvente hexano.



El extracto de *J. secunda* obtenido con diclorometano, en el espectro de UV-Vis, mostró un pico máximo de absorbancia de 560 nm (figura 32), el cual puede tratarse de un compuesto fenólico del grupo de las antocianinas, que generalmente tienen su máxima absorción en el espectro visible de los 500- 570 nm [130].

Figura 29. Espectro de UV-Vis, obtenido del extracto de *J. secunda* con el solvente diclorometano.



5. DISCUSIÓN

Las concentraciones a las cuales se presentó actividad antifúngica, son altas respecto a otros estudios hechos con diferentes tipos de plantas [16]; sin embargo, se debe tener en cuenta que se está trabajando con extractos crudos que contienen otros metabolitos o impurezas sin actividad antifúngica. Asimismo al comparar los extractos de *J. secunda* en términos de CMI con fungicidas comerciales como el oxiclورو de cobre (CMI=10 µg/mL) los extractos no son competitivos, pero cabe resaltar que el oxiclورو de cobre posee efectos a largo plazo para los seres humanos y el medio ambiente como la capacidad irritativa dérmica, irritativa ocular, genotoxicidad (aberraciones cromosómicas), efectos hepatotóxicos y a nivel ambiental se absorbe fuertemente a las partículas del suelo, matriz en la que es extremadamente persistente [123].

En el método de microdilución de Lozada et al, 2012; en general los extractos obtenidos con solventes orgánicos mostraron $CMI_{90} \geq 200 \mu\text{g/mL}$. La extracción con metanol utilizando el método de extracción soxhlet, presentó mejor actividad antifúngica respecto a los demás tratamientos, mostrando $CMI_{50} \geq 200 \mu\text{g/mL}$ para el método de macrodilución. Ambos métodos coinciden en que el metanol y el diclorometano, presentaron mayor actividad antifúngica en relación a los demás tratamientos.

En los cultivos en microplaca se observó que el metanol tuvo un efecto fungistático, ya que disminuye el crecimiento y el desarrollo del hongo, pero no se observa reducción de las unidades formadoras de colonias (UFC).

El análisis de varianza demostró, que se presenta diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los solventes, los métodos de extracción y la concentraciones utilizadas, así como la interacción de estos factores.

En las variables de crecimiento evaluadas, el solvente a utilizar mostró un efecto significativo. Respecto a la comparación múltiple de medias, se puede observar una tendencia de agrupación, posiblemente se debe a la naturaleza polar y solubilidad de los mismos, puesto que el solvente extrae selectivamente cierta clase de compuestos. Solventes apolares disuelven moléculas apolares y viceversa, por consiguiente no es de extrañar que los solventes más polares como el agua no tiendan a agruparse con los menos polares como el hexano [89].

La producción de esporas y el tamaño de esporas se vieron influenciadas por el método de extracción y se observaron agrupaciones entre los métodos, las cuales no eran las esperadas, ya que ambos son métodos diferentes. El método soxhlet es un método en caliente, que ha presentado mejores rendimientos para realizar la extracción de analitos volátiles, en cuanto a otros métodos [67] y la maceración es una extracción con solvente químicos a temperatura ambiente.

Se observaron tamaños de esporas más pequeñas y una menor producción de las mismas, respecto al control en los aislados con extractos de *J. secunda*, posiblemente este sea un mecanismo metabólico en respuesta a condiciones menos favorables en el medio, causadas por la presencia de los extractos, ya que el tamaño de esporas es una variable que influye en el mecanismo de sobrevivencia del hongo. Las esporas de mayor tamaño resisten a estrés hídrico, condiciones adversas y poseen mayor capacidad de adaptación [43, 83].

Se evidenció que a mayor concentración de extractos de *J. secunda*, hubo menor producción de esporas y mayor inhibición del crecimiento micelial de los aislados de *M. roreri*.

Aunque se utilizó un único aislado de *M. roreri* y bajo las mismas condiciones de incubación, es importante destacar la variabilidad de crecimiento observada, en el tipo de esporulación y el primer día de esporulación al aplicar los extractos de *J. secunda*. Probablemente, esta situación pudo deberse a la presencia de los analitos extraídos de *J. secunda*; cabe resaltar que *M. roreri* se ha caracterizado

por ser un microorganismo muy versátil, con una alta variabilidad genética y capacidad adaptativa [43, 53, 89]

Se ha mostrado que las plantas poseen agentes protectores o inductores de resistencia como son la gran mayoría de metabolitos secundarios, los cuales presentan actividad antialérgica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas, confiriendo resistencia frente al ataque de microorganismos [74, 85, 86, 87]. Entre estos agentes pueden mencionarse los compuestos fenólicos, lignanos, terpenoides, saponinas y quinonas, los cuales intervienen en la protección de la planta contra microorganismos [74].

Estudios realizados sobre los compuestos presentes en los extractos de *J. secunda*, mostraron como constituyentes principales, fenoles, saponinas, taninos, lignanos, triterpenos, entre otros [73, 84, 85]. Los espectros de masas y UV-VIS obtenidos de los extractos de *J. secunda* mostraron, de manera preliminar la presencia de algunos de estos metabolitos secundarios, coincidiendo con lo reportado por otros autores [74, 77], por consiguiente la actividad antifúngica observada podría ser atribuida a la presencia de estos compuestos.

Los compuestos fenólicos poseen grupos hidroxilo que pueden formar enlaces de hidrógenos con los sitios activos de ciertas enzimas (hidrolasas, cAMP fosfodiesterasas, ATP-asas, oxidoreductasas, entre otras) [119], logrando su inactivación. Adicionalmente, pueden ocasionar cambios en la estructura celular, inhibir la respiración y alterar la permeabilidad del fitopatógeno. En altas concentraciones ocasionan daños severos en las membranas citoplasmáticas como la pérdida de la capacidad selectiva, lo que permite el flujo de componentes intracelulares y extracelulares, ocasionado la pérdida de la homeostasis, conduciendo a la muerte celular [120, 121, 122].

Específicamente la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos tipo flavonoides, que son la clase más grande de compuestos fenólicos encontrados y

están ampliamente distribuidos en el reino vegetal [124], se deben a que estas sustancias actúan generando complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, inhibiendo la girasa del DNA, impidiendo la función de la membrana citoplasmática e inhabilitando el metabolismo energético de las células [118].

Respecto a los terpenos estos incrementan las concentraciones de peróxidos lipídicos como los radicales hidroxil, alcoxil y alcoperoxil en las células fúngicas, además pueden provocar la salida de compuestos del citoplasma de las células fúngicas, provocando pérdida de rigidez e integridad de la pared celular, conduciendo a la muerte celular del patógeno [122].

En la familia Acanthaceae los lignanos son componentes químicos típicos, especialmente los de los tipos aryl-naphthaleno y aryl-naphthalido [125]. Los lignanos exhiben actividades biológicas diversas, tales como la inhibición de la cAMP fosfodiesterasa [126], entre otras.

Por otra parte a los lignanos se les ha propuesto como antifúngicos por su capacidad para inhibir la germinación de las esporas de patógenos en plantas [87], además se ha reportado actividad antifúngica sobre microorganismos pertenecientes al género *Aspergillus*, *Ceratocystis pilifera*, *Penicillium spp*, *Rhizopus spp*, *Botrytis cinérea*, *Mycosphaerella fijiensis* entre otros [87, 88, 91, 92, 93].

Por lo expuesto anteriormente la presencia de flavonoides, lignanos y terpenos encontradas en la caracterización química de especies del género *Justicia* y en base a la determinación preliminar de *J. secunda* realizada, se le puede adjudicar posiblemente actividad antifúngica sobre el fitopatógeno *M. royeri*.

Cabe señalar que es difícil estandarizar un procedimiento para el estudio de las plantas como antimicrobianos, ya que existen diversos factores que están involucrados y que pueden influir de manera importante en los resultados

obtenidos; se puede mencionar como el método de extracción, pH, solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, y el microorganismo en cuestión [127].

No fue posible caracterizar el extracto obtenido con agua, ya que eran necesarios pasos adicionales de purificación, que redujeran el número de picos encontrados en el espectro de masas. Por lo anterior no se realizó una caracterización preliminar de dichos extractos.

6 CONCLUSIONES

El extracto obtenido con el solvente metanol, presentó la mejor actividad antifúngica en comparación con los demás solventes utilizados, el extracto obtenido con el método soxhlet, presento mejor actividad antifúngica en comparación con los otros métodos utilizados.

En el análisis de varianza se demostró que las variables solvente, método de extracción y la concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la que se aplica el extracto, y la interacción de estos factores, poseen efectos estadísticamente significativos sobre las variables de crecimiento.

Los elevados valores de CMI_{50} y CMI_{90} observadas para los extractos obtenidos con hexano pueden deberse a la poca cantidad de metabolitos secundarios extraídos con este tipo de solvente; el hexano es un solvente apolar que no puede extraer metabolitos con polaridades altas.

Los extractos obtenidos con diclorometano y metanol, solventes polares, presentaron las mejores actividades antifúngicas contra *M. roreri*, esto pudo deberse a que en *J. secunda* posiblemente hay mayor presencia de metabolitos de alta polaridad.

Los extractos obtenidos con agua, presentaron una baja actividad antifúngica. Lo cual puede deberse a la poca capacidad de interacción del solvente con los metabolitos secundarios presentes en *J. secunda*.

La actividad antifúngica encontrada en los extractos de *J. secunda* sobre el crecimiento y germinación del hongo fitopatógeno *M. royeri*, los convierte en buenos candidatos para ser usados como posibles biofungicidas o fungiestáticos que vayan de la mano con los métodos de control utilizados en la actualidad.

7. RECOMENDACIONES

Un inconveniente que se presentó en el método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria, es que no permite una visualización clara del comportamiento de los aislados; debido a que los hongos filamentosos no crecen de forma uniforme dentro del pozo, y no se mezcla de manera homogénea los extractos para lograr una total difusión de los metabolitos, lo que puede llevar a una conclusión errónea.

Se recomienda realizar pruebas de patogenicidad a los aislados de *M. roreri* previamente antes de realizar los bioensayos.

Se recomienda realizar una caracterización química a los extractos de J. secunda, más profunda que incluya un aislamiento de los metabolitos obtenidos con metanol o diclorometano solventes que demostraron mayor actividad biológica, utilizando diferentes técnicas instrumentales para conocer la totalidad de sus componentes y su concentración individual; aportando más datos de orden químico de la especie J. secunda.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Lozada, B. Herrera, L. Perea, A. Stashenko, E. y 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.). Revista Acta Agronómica. 61 (2):102-110 p.
2. Jaimes, Y. y Aranzazu, F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Colombia. Informe a Corpoica. p. 90.
3. Espinal, C. Martínez, H. y Ortiz, L. 2005. La cadena del cacao en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia.
4. Hebbbar, P. K. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. Phytopath. 97:1658 – 1663 p.
5. Evans, H. Satlipers, J. Samson, R. y Benny, G. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany. 56: 2528–2532 p.
6. Schnell, R. Olano, C. Brown, J. Meerow, A. Cervantes, C. 2005. Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L.) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. Journal of the American Society Horticultural Science. 130(2):181-190 p.
7. Enríquez, G. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. CATIE. Turrialba Costa Rica. 240 p.
8. Ramos, G. Ramos, P. y Azocar, A. 2004. Manual del productor de cacao. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Fondo Intergubernamental para la Descentralización (FIDES). Venezuela. 78 p.

9. Phillips, W. Aime, M. y Wilkinson, M. 2007. Biodiversity and biogeography of the Cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56 (6):911-922 p.
10. Phillips, W. y Wilkinson, M. 2007. Frosty pod of Cacao: A disease with limited geographic range but limited potential for damage. *Phytopathology* 97:1644-1647 p.
11. Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO). 2010. Estadísticas de la producción nacional registrada de cacao en grano., <http://www.fedecacao.com.co/cw/index.php?secinfo=15>. 1 p.
12. Parra, D. y Sanchez, L. 2005. El control de la moniliasis del cacao. INIA Divulga. Venezuela.
13. Rey, M. Delgado, J. Rincón, A. Limón, M. y Benítez, T. 2006. *Revista iberoamericana de micología*.17: 31-36 p.
14. Hernández, L. Bautista, B. y Velázquez, V. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en Pos cosecha. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30 (2): 119-123 p.
15. Ramírez, G. 2008. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. *Tecnología en Marcha*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 21(1):97-110 p. ISSN 0379-3982.
16. Barrera, N. y Bautista, B. 2008. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:27-31p.
17. Vergara, R. 1997. De la agricultura tradicional a la agricultura biológica. *Memorias Seminario Regional*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
18. Verpoorte, R. 2000. Secondary metabolism. In: Verpoorte, R. and Alfermann, A. W. (eds.). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 1-29 p.

19. Krischik, V. y Denno, R. 1983. Individual, population, and geographic patterns in plant defense. In: Denno, R. F., M. McClure (eds.), *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. New York University Press. 463–512 p.
20. Montes, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología* 29: 73-82 p.
21. Fonnegra, R. y Villa, J. 2008. Uso de las plantas medicinales en algunas veredas del oriente cercano antioqueño, Colombia. Informe final de investigación presentado a la Universidad de Antioquía y al Instituto Politécnico “Jaime Isaza Cadavid”, Medellín.
22. Vanaclocha, B. y Cañigual, S. 2006. Posible hepatotoxicidad del rizoma de cimiçífuga. *Revista de Fitoterapia* 6(2): 129-135 p.
23. Herrera, H. Rosas, A. y Crescente, O. 2002. Biological Activity of “Sanguinaria” (*Justicia secunda* Vahl) Extracts. *Pharmaceutical Biology*. 40:206-212 p.
24. Motamayor, J. Risterucci, A. Lopez, P. Ortiz, C. Moreno, A. y Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-386 p.
25. Marcano, M. Pugh, T. Cros, E. Morales, S. Páez, E. y Courtiois, B. 2007. Adding value to Cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theoretical Applied Genetic* 114:877-884 p.
26. Cheesman, E. y Pound, F. 1934. Further Notes on Criterion of Selection in Cacao. I.C.T.A. Trinidad Annual Report on Cocoa Research.
27. Ploetz, R. 2007. Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *Phytopathology*. 97(12):1634-1639 p.
28. Scarpari, L. Meinhardt, L. Mazzafera, P. Pomella, A. Schiavinato, M. Cascardo, J. y Pereira, G. 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany*. 56(413):865-877 p.

29. De Almeida, A. y Valle, R. 2008. Ecophysiology of the Cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19:425-448 p.
30. Bhattacharjee, R. y Kumar, P. 2007. Cacao. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Technical crops*. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, 6 (7):127-142 p.
31. *Theobroma cacao* L. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. International union for the protection of new varieties of plants. 2010.
32. León, J. 2000. *Botánica de los Cultivos Tropicales*. Costa Rica, San José, IICA. 678 p
33. Hardy, F. 1961. *Manual de Cacao*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, Costa Rica. 380 p.
34. Wood, G. y Lass, R. 1985. *Cacao*. Longman Group Limited. New York Cuarta edición. 265-365 p.
35. Perfil de Producto. Cacao. Corporación Colombia Internacional, sistema de inteligencia de mercados SIM, ministerio de agricultura y desarrollo rural boletín N° 16, ISSN 0124-1338.
36. Situación actual y perspectivas del mercado de cacao en grano colombiano. Economic Research Service – ERS – ABCUSAID/MIDAS.
37. Evans, H. 1986. A reassessment of *Moniliophthora roreri* (Monilia) pod rot of cocoa. *Cocoa Grower's Bulletin* 37:34-43 p.
38. Evans, H. Holmes, K. y Reid, A. 2003. Phylogeny of the frosty pod pathogen of cocoa. *Plant Pathology*. 52: 476-485 p.
39. Evans, H. y Bastos, C. 1979. Una reevaluación del ciclo de vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) de cacao. *Fitopatología Brasileira*. 4:104 p.
40. Griffith, G. Nicholson, J. Nenninger, A. y Birch, R. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of Cacao. *New Zealand Journal of Botany*. 41:423-435 p.

41. Aime, M. y Phillips, 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 p.
42. Merchán, V. 1981. Avances de la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. *El Cacaotero Colombiano*. 16:26-41p.
43. Phillips, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao*) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al., as determined using molecular, phytopathological and morphophysiological evidence. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Department of Agricultura Botany, School of Plant Science.
44. Evans, H. 1981. Pod rot of Cacao caused by *Moniliophthora roreri* (Monilia). *Phytopathological*. England. Commonwealth Mycological Institute 44 p.
45. Ancízar, M. 1956. Peregrinación de Alpha. Por las provincias del norte de Nueva Granada, en 1950-51. Bogotá, Colombia. Empresa Nacional de Publicaciones.
46. Anónimo. 1932. El cacao. El cultivador cundinamarqués. *Periódico de la Industria Agrícola y de la Economía Doméstica*, 7.
47. Muller. 1941. El reconocimiento de las enfermedades de las plantas cultivadas en Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales* 8:99-113 p.
48. McLaughlin, H. 1950. Observation on Cacao in Peru. *Cacao Inform. Bulletin* 2:3-4 p.
49. Enríquez, G. y Suárez, C. 1978. Monilia disease of Cacao in Costa Rica. *Turrialba* 28: 339-340 p.
50. López, M. y Enríquez, V. 1980. Presencia de *Monilia roreri* Cif y Par. en el cacao, *Theobroma cacao* L. en la frontera de Costa Rica, Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Managua, Nicaragua.
51. Porras, V. y Enríquez, V. 1998. Spread of monilia pod rot of cococa through Central America. IICA, San José, Costa Rica.

52. Phillips-Mora, W. Coutiño, A. Ortiz, C. López, A. Hernández, J. y Aime, M. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of Cacao in Mexico. *Plant Pathology* 55:584 p.
53. Afanador, L. Bolivar, S. Arbeláez, L. Trillos, O. y Echevarría, H. 2008. Moniliasis del Cacao en Antioquia: Diversidad morfológica en poblaciones del agente causante *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans et al. *Revista Fitopatología Colombiana* 32(2):1-9 p.
54. Sánchez, F. Gamboa, E. y Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el Estado Barinas. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 20: 188-194 p.
55. Izco, J. 2004. Botánica. McGraw-Hill Interamericana de España, 2a ed., Madrid.
56. Galeano, M. y Bernal, G. 1993. Guía de Plantas del Parque Regional Natural de Ucumari. Tomo I, Editorial Carder. 26.
57. Daniel, T. 2002. New and reconsidered Mexican Acanthaceae. *Justicia*. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 9: 37-49 p.
58. George, M. Venkatraman, P. y Pandalai, K. 1947. Investigation on plant antibiotics: A search for antibiotic substances in some Indian medicinal plants. *Journal Scientific Industrial Research*. 2: 42-46 p.
59. Quershi, S. Rai, M. y Agrawal, S. 1997. In vitro evaluation of inhibitory nature of extracts of 18-plant species of Chhindwara against 3-keratinophilic fungi. *Hindus Antibiot. Bull.* 39: 56-60 p.
60. Upadhyaya, S. Khatiwora, E. y Saikia, R. 2010. Comparison of total phenol and flavonoid content in *Adhatodavasica* Nees. : Grown using different organic manure. *Journal of Pharmacy Research*. 10: 2408-2409 p.
61. Rojas, J. Ochoa, V. Ocampo, S. y Muñoz, J. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:2 doi:10.1186/1472-6882-6-2.

62. Márquez, R. y Torres, C. 2005. Química toxicidad preliminar con Artemia salina y efecto del extracto acuoso de las hojas de *Justicia secunda* (Acanthaceae) sobre la germinación en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Revista Dugandia. 2(1) 257-258 p.
63. Swain, T. 1973. Chemistry in evolution and systematics. Butterworth, Londres. 353-672 p.
64. Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 317-343 p.
65. Croteau, R. Kutchan, T. y Lewis, N. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan, Gruissem, Jones (editores). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.
66. Ávalos, A. y Pérez, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas; Universidad Complutense; R. educa (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145 p.
67. Gonzalez, A. Kafarov, V. y Guzmán, A. 2009. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Prospect, 7 (2): 53-60 p.
68. Bruneton, J. 2001. Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales. 2ª edición. Acribia, S.A. España.
69. Balcinde, Y. Hung, B. Marrero, A. Tirado, S. Perez, C. Falero, A. Martí, E. Aguila, B. Fonseca, M. y Lightbourne, E. 2005. Comparación de diferentes métodos de extracción para la obtención de una fracción rica en fitoesteroles a partir de la cachaza de caña de azúcar. Revista Ciencias Químicas, 36 (1).
70. Barros, N. y Sánchez, J. 1979. Un método de aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* Cif y Par. El Cacaotero Colombiano 11: 27-40 p.
71. Saldarriaga, Y. y Pineda, F. 2001. Aislamiento de Hongos Fitopatógenos. Manual de Micología aplicada. Medellín: Universidad de Antioquia. 65–74 p.
72. Pérez, A. Jarén, M. y Mínguez, I. 2006. Processing of red pepper fruits (*Capsicum annum* L.) for production of paprika and paprika oleoresin en

Hui, Y. Barta, J. Cano, M. Gusek, T. Sidhu, J. y Sinha, N. (Eds.) Handbook of fruits and fruit processing 30, 565-579. Blackwell Pub., Oxford, UK.

73. Pius, M. KotoTe, N. Matthieu, B. Teddy, K. Emmanuel, A. Damien, T. y Virima, M. 2010. In vitro effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. Blood Transfus 8:248-54 p. DOI 10.2450/2009.0120-09.
74. Correa, G. y Alcantara, A. 2012. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* a review. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 22(1): 220-238 p.
75. N'guessan, K. Kouassi, K. Ouattara, D. 2010. Plants used to treat anaemia, in traditional medicine, by Abbey and Krobou populations, in the South of Côte-d'Ivoire. Journal of Applied Sciences Research. 6 (8):1291–1297 p.
76. Mpiana, P. Ngbolua, K. Bokota, M. Kasonga, T. Atibu, E. Tshibangu, D. y Mudogo, V. 2010. In vitro effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. Blood Transfusion 8:248–254 p.
77. Koffia, E. Le-Guernevéc, C. Lozanoa, P. Meudecc, E. Adjéd, F. Bekrob, Y. y Lozanoa, Y. 2013. Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses. Industrial Crops and Products 49:682– 689 p.
78. Birynek, V. 1975. Extration of Caléndula influorescences. Farm Zh Journal. 30(3):75-76 p.
79. Cantón, E. Mazuelos, E. y Espinel, A. 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberoamericana de Micología.
80. García, E. Quezada, M. Moreno, J. Sánchez, G. Moreno. E, y Perez, M. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de Aflatoxinas en Nuez pecanera (*Caria illinoensis*). Revista mexicana de Fitopatología 24 (1):8-12 p.
81. Rojas, A. 2011. Conceptos y prácticas de microbiología general. Universidad nacional de Colombia, sede Palmira. 111-112 p.

82. Navarro, V. Gonzalez, A. y Fuentes, M. 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal Ethnopharmacol.* 87(1):85-88 p.
83. Campuzano, L. 1976. Fluctuación de población de esporas de *Monilia roreri* Cif y Par y viabilidad durante un ciclo completo de afección. *Noticias fitopatológicas (Colombia)* 5:107 p.
84. Budel, J. Duarte, M. Santos, C. Farango, P. y Matzenbacher, N. 2005. O progresso da pesquisa sobre o genero *Baccharis*, Asteraceae: Estudos botânicos, *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 15(3):268-271 p.
85. Márquez, R. De la rosa, C. y Mercado, A. 2007. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L.Poit (Ultimorrial), revista *Scientia et Técnica* 8(33):155 p.
86. Villagrán, C. Romo, M. y Castro, V. 2003. Etnobotánica del Sur de los Andes de la Primera Región de Chile: Un enlace entre las Culturas Altiplánicas y las de Quebradas Altas del Loa Superior. *Revista de Antropología Chilena.* 35(1):73-124 p.
87. Tim, T. y Lamb, A. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 26:343–356 p.
88. Vasilev, N. y Lonkova, I. 2005. Cytotoxic activity of extracts nfrom *Linum* cell cultures. *Fitoterapia* 76: 50-53 p.
89. Casabo, J. 2007. Estructura atómica y en lace químico. Editorial Revérte. España.157-160 p.
90. Lastra, J. y Bachiller, LI. 1997. Plantas medicinales en Asturias y la Cornisa Cantábrica. Gijón: Ediciones Trea, 291 p.
91. Litter, M. 1998. Compendio de farmacología. Buenos Aires: Editorial El Ateneo, 932 p.
92. Fuentes, C. Roque, M. y Tristan, M. 1998. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* c. p. smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación.* 1(2)

93. Niño, J. Ospina, J. Correa, Y. y Mosquera, M. 2007. Determinación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Scientia Et Technica, Universidad Tecnológica de Pereira. (33) 425-426 p.
94. Sherif, A. Badra, Mohamed, S. Yehya, M. Maher, H. Akila, S. Hamzaa, S. y Mounir, M. 2011. Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. 25(16):1524-1539 p.
95. Assimopoulou, A. y Papageorgiou, V. 2005. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Biomedical Chromatography. 19:285–311 p. doi: 10.1002/bmc.454.
96. Hsi, C. Jyh, W. Yu, T. Tzong, L. Shing, C. y Yueh, K. 2008. Triterpenoids and Aromatics from *Derris laxiflora*. Journal of natural products. 71(11):1829-1832 p.
97. Renee, E. Granger, E. Campbell, L. y Graham, A. 2005. Efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors. Biochemical Pharmacology. Australia. 69:1101–1111 p.
98. Tabanca, N. Kirimer, N. Demirci, B. Demirci, F. y Başer, K. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. Journal Agricultural Food Chemical. 49(9):4300–4303 p.
99. Boluda, C. Trujillo, J. López, H. y Pérez, J. 2004. Aislamiento, estudio, actividad biológica y síntesis de metabolitos de origen vegetal. Ciencias y tecnologías, tesis doctoral.
100. Carlos H. Silva, V. Carvalho, M. de Sousa, P. y Dall'Oglio, E. 2005. Lignanias das cascas do caule de *Zanthoxylum hasslerianum* (Chodat) Pirani (Rutaceae). Sociedade Brasileira de Química.
101. Ribeiro, P. Cruz, y Guaré, F. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas de *Clusia burlemarxii*. 2011. Tesis de maestría, Universidad federal dabahia instituto de química Programa de Pós graduação em Química.

102. Singh, U. Pandey, V. Singh, K. y Singh, R. Antifungal activity of some new flavones and flavone glycosides of *Echinops echinatus*. 1988. Canadian Journal of Botany. 66(9): 1901-1903 p.10.1139/b88-260.
103. Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal Natural Product.63(7): 1035-1042 p.
104. Escribano, M. Beulga, C. y Rivas, J. 2004. Anthocyanins in Cereals. Journal Chromatography, 1054:129-141p.
105. Lawrence, W. Price, J. Gertrude, R. y Robinson, R.1939. The Distribution of Anthocyanins in Flowers, Fruits and Leaves. 1939. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 230 (567):149-178 p.
106. Badui, D. 2006. Química de los Alimentos. Editorial Pearson Educación, México.
107. Kobayakawa, J. Sato-Nishimori, F. Moriyasu, M. y Matsukawa, Y. G2-M arrest and antimitotic activity mediated by casticin, a flavonoid isolated from *Vitex Fructus* (*Vitex rotundifolia* Linne fil.). 2004. Elsevier Ireland Ltd. 208:59–64 p.
108. Baraldi, R. Isacchi, B. Predieri, S. Marconi, G. Vincieri, F. Bilia, R. 2008. Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. Biochemical Systematics and Ecology 36: 340-348 p.
109. 117. Wen, L. Cheng, Cui. Bing, C. Hai, W. y Xin, Y. 2005. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells, Journal of Asian Natural Products Research, 7:4, 615-626 p. DOI: 10.1080/10286020310001625085
110. Souza, P. Gasparotto, A. Crestania, S. Alves, M. Andrade, M. Silva, J. y Leite, C. 2011. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. Phytomedicine. 18:819– 825 p.

111. Quirantes, R. Funes, L. Micol, V. Segura, A. y Fernández. A. 2009. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A*, 1216: 5391–5397 p.
112. Athar, A. Kosmulalage, S. y Radhika, S. 2009. Chemical constituents of *Barleria prionitis* and their enzyme inhibitory and free radical scavenging activities. *Phytochemistry*. 2(1):37-40 p.
113. Tuntiwachwuttikul, P. Pancharoen, O. y Taylor, W. 1998. *Phytochemistry*. Iridoid Glucosides of *Barleria Lupulina*. 49(1):163–166 p.
114. Güvenc, A. Armagan, M. Koyuncu, M. Gotfredsen, C. y Jensen, S. 2008. Secondary metabolites from *Eremostachys laciniata*. *Natural Products Communications*. (2):117-124 p.
115. Nakano, T. y Hasegawa, M. Isolation of erythrodiol 3–palmitate from *Bumelia obtusifolia*. *Planta médica*. 27(1):89-92 p.
116. Silva, C. Simeoni, L. y Silveira, D. 2009. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2a):501-509 p.
117. Barreiros, M., David, J., Pereira, P., Guedes, M., y David, J. (2002). Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13(5):669-673 p.
118. 126. Stepanovic, S. Antic, N. Dakic, I. y Svabic-Vlahovic, M. 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*.158(4): 353-357 p.
119. 127.Lin, L. Gil, R. Cordell, G. Ramesh, M. Srilatha, B. Reddy, B. y Appa, A. 1995. Pregnane glycosides from *Caralluma umbellata*. *Phytochemistry*.35(6):1549-1553 p.
120. Farag, K. 1989. Enhancing ethephon effectiveness by modifying cuticular transport or stimulating ethylene production in cranberry fruit. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin - Madison. 216 p.
121. Nychas, J. 1995. Natural antimicrobials from plants. En: Gould G W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. London. Capítulo 4: 59-89 p.

122. Viuda, M. Ruiz, Y. Fernández, J. y Pérez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. 19:1130-1138 p.
123. El Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas (IRET). Universidad Nacional Heredia, Costa Rica. 2010. <http://www.ftm.una.ac.cr/plaguicidasdecentroamerica/index.php/base-de-datos/ingredientes-activos/423-oxicloruro-de-cobre>
124. Gattuso, G. Barreca, D. Gargiulli, C. Leuzzi, U. y Caristi, C. 2007. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* 12 (8):1641–1673 p.
125. Liu, G. Wu, J. Si, J. Wang, J. y Yang, M. 2008. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR data for three new arylnaphthalene lignan from *Justicia procumbens*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 46:283–286 p.
126. Ukita, T. Nakamura, Y. Kubo, A. Yamamoto, Y. Takahashi, M. Kotera, J. y Ikeo, T. 1999. 1-Arylnaphthalene lignan: a novel scaffold for type 5 phosphodiesterase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 42:1293–1305 p.
127. Ríos, J. Recio, M. y Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2-3):127-149 p.
128. Malesev, D. y Kunti, V. 2007. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 72 (10):921–939 p.
129. Gatti, R. Gioia, M. Di Pietra, A. y Cini, M. 2001. Determination of retinoids in galenicals by column liquid chromatography with fluorescence and diode-array detection. *Journal of Chromatography*. 905:345-350 p.
130. Woodall, G. y Stewart, G. 1998. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*? *Journal of Experimental Botany*. 49(325):1447–1450 p.

131. Nychas G. 1995. Natural Antimicrobials from plants. In: New Methods of Food Preservation, Editorial Gould, Blackie Academic. 4: 58-89 pp.
132. Jentoft, F. 2004. Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft.

BIBLIOGRAFÍA

- Afanador, L. Bolivar, S. Arbeláez, L. Trillos, O. y Echevarría, H. 2008. Moniliasis del Cacao en Antioquia: Diversidad morfológica en poblaciones del agente causante *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans et al. Revista Fitopatología Colombiana 32(2):1-9 p.
- Aime, M. y Phillips, 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 p.
- Ancízar, M. 1956. Peregrinación de Alpha. Por las provincias del norte de Nueva Granada, en 1950-51. Bogotá, Colombia. Empresa Nacional de Publicaciones.
- Anónimo. 1932. El cacao. El cultivador cundinamarqués. Periódico de la Industria Agrícola y de la Economía Doméstica, 7.
- Assimopoulou, A. y Papageorgiou, V. 2005. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Biomedical Chromatography. 19:285–311 p. doi: 10.1002/bmc.454.
- Athar, A. Kosmulalage, S. y Radhika, S. 2009. Chemical constituents of *Barleria prionitis* and their enzyme inhibitory and free radical scavenging activities. Phytochemistry. 2(1):37-40 p.
- Ávalos, A. y Pérez, E. 2009. Metabolismo *secundario* de plantas; Universidad complutense; R. educa (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145 p.

- Badui, D. 2006. Química de los Alimentos. Editorial Pearson Educación, México.
- Balcinde, Y. Hung, B. Marrero, A. Tirado, S. Perez, C. Falero, A. Martí, E. Aguila, B. Fonseca, M. y Lightbourne, E. 2005. Comparación de diferentes métodos de extracción para la obtención de una fracción rica en fitoesteroles a partir de la cachaza de caña de azúcar. *Revista Ciencias Químicas*, 36 (1).
- Baraldi, R. Isacchi, B. Predieri, S. Marconi, G. Vincieri, F. Bilia, R. 2008. Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua L.* during plant growth. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 340-348 p.
- Barreiros, M., David, J., Pereira, P., Guedes, M., y David, J. (2002). Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxyllum passerinum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13(5):669-673 p.
- Barrera, N. y Bautista, B. 2008. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum L.* sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:27-31p.
- Barros, N. y Sánchez, J. 1979. Un método de aislamiento del hongo *Moniliophthora roreri* Cif y Par. *El Cacaotero Colombiano* 11: 27-40 p.
- Bhattacharjee, R. y Kumar, P. 2007. Cacao. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Technical crops. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, 6 (7):127-142 p.
- Birynek, V. 1975. Extration of Caléndula influorescences. *Farm Zh Journal*. 30(3):75-76 p.

- Boluda, C. Trujillo, J. López, H. y Pérez, J. 2004. Aislamiento, estudio, actividad biológica y síntesis de metabolitos de origen vegetal. Ciencias y tecnologías, tesis doctoral.
- Bruneton, J. 2001. Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales. 2ª edición. Acribia, S.A. España.
- Budel, J. Duarte, M. Santos, C. Farango, P. y Matzenbacher, N. 2005. O progresso da pesquisa sobre o genero Baccharis, Asteraceae: Estudos botânicos, Revista Brasileira de Farmacognosia. 15(3):268-271 p.
- Campuzano, L. 1976. Fluctuación de población de esporas de *Monilia roleri* Cif y Par y viabilidad durante un ciclo completo de afección. Noticias fitopatológicas (Colombia) 5:107 p.
- Cantón, E. Mazuelos, E. y Espinel, A. 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberoamericana de Micología.
- Carlos H. Silva, V. Carvalho, M. de Sousa, P. y Dall'Oglio, E. 2005. Lignanas das cascas do caule de *Zanthoxylum hasslerianum* (Chodat) Pirani (Rutaceae). Sociedade Brasileira de Química.
- Casabo, J. 2007. Estructura atómica y en lace químico. Editorial Revérte. España.157-160 p.
- Cheesman, E. y Pound, F. 1934. Further Notes on Criterion of Selection in Cacao. I.C.T.A. Trinidad Annual Report on Cocoa Research.

- Correa, G. y Alcantara, A. 2012. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(1): 220-238 p.
- Croteau, R. Kutchan, T. y Lewis, N. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan, Grisse, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.
- Daniel, T. 2002. New and reconsidered Mexican Acanthaceae. *Justicia*. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 9: 37-49 p.
- De Almeida, A. y Valle, R. 2008. Ecophysiology of the Cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19:425-448 p.
- El Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas (IRET). Universidad Nacional Heredia, Costa Rica. 2010. <http://www.ftm.una.ac.cr/plaguicidasdecentroamerica/index.php/base-de-datos/ingredientes-activos/423-oxicloruro-de-cobre>
- Enríquez, G. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. CATIE. Turrialba Costa Rica. 240 p.
- Enríquez, G. y Suárez, C. 1978. Monilia disease of Cacao in Costa Rica. *Turrialba* 28: 339-340 p.
- Escribano, M. Beulga, C. y Rivas, J. 2004. Anthocyanins in Cereals. *Journal Chromatography*, 1054:129-141p.

- Espinal, C. Martínez, H. y Ortiz, L. 2005. La cadena del cacao en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia.
- Evans, H. 1981. Pod rot of Cacao caused by *Moniliophthora roreri* (Monilia). Phytopathological. England. Commonwealth Mycological Institute 44 p.
- Evans, H. 1986. A reassessment of *Moniliophthora roreri* (Monilia) pod rot of cocoa. Cocoa Grower's. Bulletin 37:34-43 p.
- Evans, H. Holmes, K. y Reid, A. 2003. Phylogeny of the frosty pod pathogen of cocoa. Plant Pathology. 52: 476-485 p.
- Evans, H. Satlper, J. Samson, R. y Benny, G. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany. 56: 2528–2532 p.
- Evans, H. y Bastos, C. 1979. Una reevaluación del ciclo de vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) de cacao. Fitopatología Brasileira. 4:104 p.
- Farag, K. 1989. Enhancing ethephon effectiveness by modifying cuticular transport or stimulating ethylene production in cranberry fruit. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin - Madison. 216 p.
- Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO). 2010. Estadísticas de la producción nacional registrada de cacao en grano., <http://www.fedecacao.com.co/cw/index.php?secinfo=15>. 1 p.
- Fonnegra, R. y Villa, J. 2008. Uso de las plantas medicinales en algunas veredas del oriente cercano antioqueño, Colombia. Informe final de

investigación presentado a la Universidad de Antioquía y al Instituto Politécnico “Jaime Isaza Cadavid”, Medellín.

- Fuentes, C. Roque, M. y Tristan, M. 1998. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* c. p. smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación. 1(2)
- Galeano, M. y Bernal, G. 1993. Guía de Plantas del Parque Regional Natural de Ucumari. Tomo I, Editorial Carder. 26.
- García, E. Quezada, M. Moreno, J. Sánchez, G. Moreno. E, y Perez, M. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de Aflatoxinas en Nuez pecanera (*Caria illinoensis*). Revista mexicana de Fitopatología 24 (1):8-12 p.
- Gatti, R. Gioia, M. Di Pietra, A. y Cini, M. 2001. Determination of retinoids in galenicals by column liquid chromatography with fluorescence and diode-array detection. Journal of Chromatography. 905:345-350 p.
- Gattuso, G. Barreca, D. Gargiulli, C. Leuzzi, U. y Caristi, C. 2007. Flavonoid composition of citrus juices. Molecules 12 (8):1641–1673 p.
- George, M. Venkatraman, P. y Pandalai, K. 1947. Investigation on plant antibiotics: A search for antibiotic substances in some Indian medicinal plants. Journal Scientific Industrial Research. 2: 42-46 p.
- Gonzalez, A. Kafarov, V. y Guzmán, A. 2009. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Prospect, 7 (2): 53-60 p.

- Griffith, G. Nicholson, J. Nenninger, A. y Birch, R. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of Cacao. *New Zealand Journal of Botany*. 41:423-435 p.
- Güvenc, A. Armagan, M. Koyuncu, M. Gotfredsen, C. y Jensen, S. 2008. Secondary metabolites from *Eremostachys laciniata*. *Natural Products Communications*. (2):117-124 p.
- Hardy, F. 1961. *Manual de Cacao*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, Costa Rica. 380 p.
- Hebbar, P. K. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. *Phytopath*. 97:1658 – 1663 p.
- Hernández, L. Bautista, B. y Velázquez, V. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en Pos cosecha. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30 (2): 119-123 p.
- Herrera, H. Rosas, A. y Crescente, O. 2002. Biological Activity of "Sanguinaria" (*Justicia secunda* Vahl) Extracts. *Pharmaceutical Biology*. 40:206-212 p.
- Hsi, C. Jyh, W. Yu, T. Tzong, L. Shing, C. y Yueh, K. 2008. Triterpenoids and Aromatics from *Derris laxiflora*. *Journal of natural products*. 71(11):1829-1832 p.
- Izco, J. 2004. *Botánica*. McGraw-Hill Interamericana de España, 2a ed., Madrid.
- Jaimes, Y. y Aranzazu, F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Colombia. Informe a Corpoica. p. 90.

- Jentoft, F. 2004. Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft.
- Kobayakawa, J. Sato-Nishimori, F. Moriyasu, M. y Matsukawa, Y. G2-M arrest and antimutagenic activity mediated by casticin, a flavonoid isolated from *Vitex rotundifolia* Fructus (*Vitex rotundifolia* Linne fil.). 2004. Elsevier Ireland Ltd. 208:59–64 p.
- Koffia, E. Le-Guernevéc, C. Lozanoa, P. Meudecc, E. Adjéd, F. Bekrob, Y. y Lozanoa, Y. 2013. Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses. *Industrial Crops and Products* 49:682– 689 p.
- Krischik, V. y Denno, R. 1983. Individual, population, and geographic patterns in plant defense. In: Denno, R. F., M. McClure (eds.), *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. New York University Press. 463–512 p.
- Lastra, J. y Bachiller, LI. 1997. *Plantas medicinales en Asturias y la Cornisa Cantábrica*. Gijón: Ediciones Trea, 291 p.
- Lawrence, W. Price, J. Gertrude, R. y Robinson, R. 1939. The Distribution of Anthocyanins in Flowers, Fruits and Leaves. 1939. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 230 (567):149-178 p.
- León, J. 2000. *Botánica de los Cultivos Tropicales*. Costa Rica, San José, IICA. 678 p

- Lin, L. Gil, R. Cordell, G. Ramesh, M. Srilatha, B. Reddy, B. y Appa, A. 1995. Pregnane glycosides from *Caralluma umbellata*. *Phytochemistry*.35(6):1549-1553 p.
- Litter, M. 1998. Compendio de farmacología. Buenos Aires: Editorial El Ateneo, 932 p.
- Liu, G. Wu, J. Si, J. Wang, J. y Yang, M. 2008. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR data for three new arylnaphthalene lignan from *Justicia procumbens*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 46:283–286 p.
- López, M. y Enríquez, V. 1980. Presencia de *Monilia roreri* Cif y Par. en el cacao, *Theobroma cacao* L. en la frontera de Costa Rica, Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Managua, Nicaragua.
- Lozada, B. Herrera, L. Perea, A. Stashenko, E. y 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.). *Revista Acta Agronómica*. 61 (2):102-110 p.
- Malesev, D. y Kunti, V. 2007. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 72 (10):921–939 p.
- Marcano, M. Pugh, T. Cros, E. Morales, S. Páez, E. y Courtiois, B. 2007. Adding value to Cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm information with domestication history and admixture mapping. *Theoretical Applied Genetic* 114:877-884 p.

- Márquez, R. De la rosa, C. y Mercado, A. 2007. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L.Poit (Ultimorrial), revista Scientia et Técnica 8(33):155 p.
- Márquez, R. y Torres, C. 2005. Química toxicidad preliminar con Artemia salina y efecto del extracto acuoso de las hojas de *Justicia secunda* (Acanthaceae) sobre la germinación en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Revista Dugandia. 2(1) 257-258 p.
- McLaughlin, H. 1950. Observation on Cacao in Peru. Cacao Inform. Bulletin 2:3-4 p.
- Merchán, V. 1981. Avances de la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. El Cacaotero Colombiano. 16:26-41p.
- Montes, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista mexicana de micología 29: 73-82 p.
- Motamayor, J. Risterucci, A. Lopez, P. Ortiz, C. Moreno, A. y Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. Heredity 89:380-386 p.
- Mpiana, P. Ngbolua, K. Bokota, M. Kasonga, T. Atibu, E. Tshibangu, D. y Mudogo, V. 2010. In vitro effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. Blood Transfusion 8:248–254 p.

- Muller. 1941. El reconocimiento de las enfermedades de las plantas cultivadas en Venezuela. Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales 8:99-113 p.
- N'guessan, K. Kouassi, K. Ouattara, D. 2010. Plants used to treat anaemia, in tradi-tional medicine, by Abbey and Krobou populations, in the South of Côte-d'Ivoire. Journal of Applied Sciences Research. 6 (8):1291–1297 p.
- Nakano, T. y Hasegawa, M. Isolation of erythrodiol 3–palmitate from *Bumelia obtusifolia*. Planta médica. 27(1):89-92 p.
- Navarro, V. Gonzalez, A. y Fuentes, M. 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. Journal Ethnopharmacol.87(1):85-88 p.
- Niño, J. Ospina, J. Correa, Y. y Mosquera, M. 2007. Determinación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Scientia Et Technica, Universidad Tecnológica de Pereira. (33) 425-426 p.
- Nychas G. 1995. Natural Antimicrobials from plants. In: New Methods of Food Preservation, Editorial Gould, Blackie Academic. 4: 58-89 pp.
- Nychas, J. 1995. Natural antimicrobials from plants. En: Gould G W. (Ed.), New Methods of Foo Preservation. London. Capítulo 4: 59-89 p.
- Parra, D. y Sanchez, L. 2005. El control de la moniliasis del cacao. INIA Divulga. Venezuela.
- Pérez, A. Jarén, M. y Mínguez, I. 2006. Processing of red pepper fruits (*Capsicum annum* L.) for production of paprika and paprika oleoresin en Hui,

Y. Barta, J. Cano, M. Gusek, T. Sidhu, J. y Sinha, N. (Eds.) Handbook of fruits and fruit processing 30, 565-579. Blackwell Pub., Oxford, UK.

- Perfil de Producto. Cacao. Corporación Colombia Internacional, sistema de inteligencia de mercados SIM, ministerio de agricultura y desarrollo rural boletín N° 16, ISSN 0124-1338.
- Phillips, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao*) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al., as determined using molecular, phytopathological and morphophysiological evidence. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Department of Agricultura Botany, School of Plant Science.
- Phillips, W. Aime, M. y Wilkinson, M. 2007. Biodiversity and biogeography of the Cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology* 56 (6):911-922 p.
- Phillips, W. y Wilkinson, M. 2007. Frosty pod of Cacao: A disease with limited geographic range but limited potential for damage. *Phytopathology* 97:1644-1647 p.
- Phillips-Mora, W. Coutiño, A. Ortiz, C. López, A. Hernández, J. y Aime, M. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of Cacao in Mexico. *Plant Pathology* 55:584 p.
- Pietta, P G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal Natural Product*.63(7): 1035-1042 p.
- Pius, M. KotoTe, N. Matthieu, B. Teddy, K. Emmanuel, A. Damien, T. y Virima, M. 2010. In vitro effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on

the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood Transfus* 8:248-54 p. DOI 10.2450/2009.0120-09.

- Ploetz, R. 2007. Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. *Phytopathology*. 97(12):1634-1639 p.
- Porras, V. y Enríquez, V. 1998. Spread of monilia pod rot of cococa through Central America. IICA, San José, Costa Rica.
- Quershi, S. Rai, M. y Agrawal, S. 1997. In vitro evaluation of inhibitory nature of extracts of 18-plant species of Chhindwara against 3-keratinophilic fungi. *Hindus Antibiot. Bull.* 39: 56-60 p.
- Quirantes, R. Funes, L. Micol, V. Segura, A. y Fernández. A. 2009. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A*, 1216: 5391–5397 p.
- Ramírez, G. 2008. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. *Tecnología en Marcha*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 21(1):97-110 p. ISSN 0379-3982.
- Ramos, G. Ramos, P. y Azocar, A. 2004. Manual del productor de cacao. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Fondo Intergubernamental para la Descentralización (FIDES). Venezuela. 78 p.
- Renee, E. Granger, E. Campbell, L. y Graham, A. 2005. Efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors. *Biochemical Pharmacology*. Australia. 69:1101–1111 p.

- Rey, M. Delgado, J. Rincón, A. Limón, M. y Benítez, T. 2006. Revista iberoamericana de micología.17: 31-36 p.
- Ribeiro, P. Cruz, y Guaré, F. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas de *Clusia burllemarxii*. 2011. Tesis de maestría, Universidad federal dabahia instituto de química Programa de Pós graduação em Química.
- Ríos, J. Recio, M. y Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2- 3):127-149 p.
- Rojas, A. 2011. Conceptos y prácticas de microbiología general. Universidad nacional de Colombia, sede Palmira. 111-112 p.
- Rojas, J. Ochoa, V. Ocampo, S. y Muñoz, J. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:2 doi:10.1186/1472-6882-6-2.
- Saldarriaga, Y. y Pineda, F. 2001. Aislamiento de Hongos Fitopatógenos. *Manual de Micología aplicada*. Medellín: Universidad de Antioquia. 65–74 p.
- Sánchez, F. Gamboa, E. y Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el Estado Barinas. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 20: 188-194 p.
- Scarpari, L. Meinhardt, L. Mazzafera, P. Pomella, A. Schiavinato, M. Cascardo, J. y Pereira, G. 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany*. 56(413):865-877 p.

- Schnell, R. Olano, C. Brown, J. Meerow, A. Cervantes, C. 2005. Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L.) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. *Journal of the American Society Horticultural Science*. 130(2):181-190 p.
- Sherif, A. Badra, Mohamed, S. Yehya, M. Maher, H. Akila, S. Hamzaa, S. y Mounir, M. 2011. Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 25(16):1524-1539 p.
- Silva, C. Simeoni, L. y Silveira, D. 2009. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2a):501-509 p.
- Singh, U. Pandey, V. Singh, K. y Singh, R. Antifungal activity of some new flavones and flavone glycosides of *Echinops echinatus*. 1988. *Canadian Journal of Botany*. 66(9): 1901-1903 p.10.1139/b88-260.
- Situación actual y perspectivas del mercado de cacao en grano colombiano. Economic Research Service – ERS – ABCUSAID/MIDAS.
- Souza, P. Gasparotto, A. Crestania, S. Alves, M. Andrade, M. Silva, J. y Leite, C. 2011. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. *Phytomedicine*. 18:819– 825 p.
- Stepanovic, S. Antic, N. Dakic, I. y Svabic-Vlahovic, M. 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*.158(4): 353-357 p.
- Swain, T. 1973. *Chemistry in evolution and systematics*. Butterworth, Londres. 353-672 p.

- Tabanca, N. Kirimer, N. Demirci, B. Demirci, F. y Başer, K. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. *Journal Agricultural Food Chemical*. 49(9):4300–4303 p.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 317-343 p. *Theobroma cacao* L. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. International union for the protection of new varieties of plants. 2010.
- Tim, T. y Lamb, A. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26:343–356 p.
- Tuntiwachwuttikul, P. Pancharoen, O. y Taylor, W. 1998. *Phytochemistry*. Iridoid Glucosides of *Barleria Lupulina*. 49(1):163–166 p.
- Ukita, T. Nakamura, Y. Kubo, A. Yamamoto, Y. Takahashi, M. Kotera, J. y Ikeo, T. 1999. 1-Arylnaphthalene lignan: a novel scaffold for type 5 phosphodiesterase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 42:1293–1305 p.
- Upadhyaya, S. Khatiwora, E. y Saikia, R. 2010. Comparison of total phenol and flavonoid content in *Adhatodavastica* Nees. : Grown using different organic manure. *Journal of Pharmacy Research*. 10: 2408-2409 p.
- Vanaclocha, B. y Cañigüeral, S. 2006. Posible hepatotoxicidad del rizoma de cemicífuga. *Revista de Fitoterapia* 6(2): 129-135 p.
- Vasilev, N. y Lonkova, I. 2005. Cytotoxic activity of extracts nfrom *Linum cell* cultures. *Fitoterapia* 76: 50-53 p.

- Vergara, R. 1997. De la agricultura tradicional a la agricultura biológica. Memorias Seminario Regional. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Verpoorte, R. 2000. Secondary metabolism. In: Verpoorte, R. and Alfermann, A. W. (eds.). Metabolic engineering of plant secondary metabolism Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 1-29 p.
- Villagrán, C. Romo, M. y Castro, V. 2003. Etnobotánica del Sur de los Andes de la Primera Región de Chile: Un enlace entre las Culturas Altiplánicas y las de Quebradas Altas del Loa Superior. Revista de Antropología Chilena. 35(1):73-124 p.
- Viuda, M. Ruiz, Y. Fernández, J. y Pérez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control. 19:1130-1138 p.
- Wen, L. Cheng, Cui. Bing, C. Hai, W. y Xin, Y. 2005. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells, Journal of Asian Natural Products Research, 7:4, 615-626 p. DOI: 10.1080/10286020310001625085
- Wood, G. y Lass, R. 1985. Cacao. Longman Group Limited. New York Cuarta edición. 265-365 p.
- Woodall, G. y Stewart, G. 1998. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*? Journal of Experimental Botany. 49(325):1447–1450 p.