



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

EFFECTO INHIBITORIO IN VITRO DE TANINOS DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa*) Y SAPONINAS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd) EN *RHIZOPUS SP.*

AUTORA

Corina Patricia Pérez Almeida

AÑO
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EFFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DE TANINOS DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa*) Y SAPONINAS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd) EN
RHIZOPUS SP.

Trabajo de Titulación en conformidad con los requisitos establecidos para optar
por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesora Guía
M. Sc. María Raquel Meléndez Jácome

Autora
Corina Patricia Pérez Almeida

Año
2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Efecto inhibitorio *in vitro* de taninos de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en *Rhizopus sp.*, a través de reuniones periódicas con la estudiante Corina Patricia Pérez Almeida, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Raquel Meléndez Jácome

Máster en Protección Vegetal y Fitofarmacia

CI: 1709384067

DECLARACIÓN PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Efecto inhibitorio *in vitro* de taninos de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en *Rhizopus sp.*, del estudiante Corina Patricia Pérez Almeida, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Wilson Arturo Vásquez Castillo

Philosophy Doctor in Plant Physiology

CI: 1001186210

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se representaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Corina Patricia Pérez Almeida

CI: 1722857305

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y la Virgen María por permitirme llegar hasta aquí con sus infinitas bendiciones. A mis padres y seres queridos quienes me han acompañado a lo largo de mi carrera.

A Universidad de las Américas, los docentes, compañeros y amigos con quienes aprendí y compartí gratos momentos.

Gracias LACBYQ (UDLA) por facilitar la realización de este trabajo, Ing. María Raquel Meléndez e Ing. Diego Proaño por su confianza, y guía oportuna.

DEDICATORIA

A mis padres, Elsa Margarita y Patricio por ser mi apoyo incondicional y mi inspiración.

A mí misma, por lo que significa alcanzar esta meta.

RESUMEN

El presente trabajo de titulación fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de taninos obtenidos de guarango (*Caesalpinia spinosa* Kuntze) y saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) sobre *Rhizopus sp.*, como alternativas de aprovechamiento de subproductos de especies vegetales y desechos industriales correspondientemente. Los resultados obtenidos muestran el potencial de los taninos presentes en el extracto acuoso obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango sobre un importante hongo postcosecha como es *Rhizopus*. El tratamiento que mostró efectividad y confiabilidad corresponde a una concentración de 400 ppm en las primeras 12 horas de crecimiento del hongo con un porcentaje de inhibición correspondiente a 4.14%. El efecto inhibitorio del extracto desaparece mientras el desarrollo del hongo en horas y días aumenta. Para el caso de las saponinas procedentes del agua de lavado de granos de quinua variedad Tunkahuan no se reportaron resultados que confirmen al extracto como alternativa de control biológico sobre el hongo postcosecha de *Rhizopus*.

ABSTRACT

This Project degree was carried out with the objective of evaluating the inhibitory effect *in vitro* of guarango's tannins (*Caesalpinia spinosa* Kuntze) and quinoa's saponins (*Chenopodium quinoa* Willd) on *Rhizopus sp.*, as an alternative of using sub-products of plant species and industrial wastes. The results indicate the potencial of the tannin which are contained in the aqueous extract obtained from guarango's flour dried pods on an important postharvest fungus as *Rhizopus*. The treatment that became effective and reliable corresponds to a concentration of 400 ppm in the first 12 hours of growth of the fungus with a percentage of inhibition corresponding to 4.14%. The inhibitory effect of the extract disappears while the development of the fungus in hours and days increases. In the case of the saponins, obtained from the quinoa grain of the Tunkahuan variety, no results were reported confirming the extract as an alternative to biological control over the *Rhizopus* postharvest fungus.

ÍNDICE

Introducción.....	1
1. Objetivos	3
1.1.Objetivo General.....	3
1.2.ObjetivosEspecíficos.....	3
2. Marco Teórico	4
2.1. Generalidades de enfermedades y agentes causales de frutos en postcosecha.	4
2.1.1. Morfología de hongos de importancia en postcosecha.....	4
2.1.2. Descripción morfológica del Género <i>Rhizopus</i>	7
2.1.3. Descripción de control convencional de hongos de importancia en postcosecha.....	8
2.2. Alternativas de control biológico para el control de microorganismos fitopatógenos.	10
2.2.1. Aplicación de microorganismos como control biológico sobre <i>Rhizopus stolonifer</i>	10
2.2.2. Aplicación de extractos vegetales como alternativas de control biológico.....	11
2.3. Generalidades de la Quinua	13
2.3.1. Quinua variedad INIAP Tunkahuan	13
2.3.2. Saponinas de la Quinua.....	14
2.4. Generalidades del Guarango	16
2.4.1. El Guarango en el Ecuador.....	16
2.4.2. Taninos de Guarango	17

3. Materiales y Métodos	19
3.1. Recolección, aislamiento y purificación del microorganismo	20
3.2. Obtención de extractos	20
3.2.1. Proceso de extracción en calor para obtención de compuestos activos a partir de harina de vainas secas del fruto de guarango	20
3.2.2. Proceso de extracción en frío para obtención de compuestos activos del agua de lavado de quinua.....	23
3.3. Análisis cualitativo de taninos y saponinas presentes en los extractos obtenidos a partir de guarango y quinua respectivamente	25
3.3.1. Análisis cualitativo de taninos	25
3.3.2. Análisis cualitativo de saponinas	26
3.4. Evaluación del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de granos de quinua y harina de vainas del fruto de guarango sobre <i>Rhizopus sp.</i>	26
3.4.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de granos de quinua y harina de vainas de guarango sobre <i>Rhizopus</i> .	28
3.5. Métodos estadísticos	29
4. Resultados y Discusión	32
4.1. Determinación de presencia de compuestos de interés en extractos obtenidos a partir de granos de quinua y harina de vainas de guarango	32
4.2. Identificación de <i>Rhizopus</i>	34
4.3. Evaluación del rendimiento de los extractos obtenidos a partir del lavado de granos de quinua y harina de vainas secas de guarango.	35

4.4. Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos obtenidos a partir del lavado de granos de quinua y harina de vainas secas de guarango sobre <i>Rhizopus</i>	37
4.4.1. Extracto obtenido a partir del lavado de granos de quinua	37
4.4.2. Extracto obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango	40
4.5. Evaluación económica de los extractos obtenidos a partir del lavado de granos de quinua y harina de vainas secas de guarango.	45
5. Conclusiones y Recomendaciones	47
5.1. Conclusiones	47
5.2. Recomendaciones	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del hongo de postcosecha, agente causal de pudrición blanda	6
Tabla 2. Carta colorimétrica para identificación de taninos	26
Tabla 3. Rendimiento y características físicas de los extractos obtenidos en el presente estudio	36
Tabla 4. ANOVA análisis de varianza inhibición de crecimiento del hongo <i>Rhizopus</i> extracto acuoso (quinua) concentraciones 300, 250, 200, 150, 50, 0.5 ppm con relación al crecimiento natural o testigo.....	38
Tabla 5. ANOVA análisis de varianza inhibición de crecimiento del hongo <i>Rhizopus</i> extracto acuoso (harina de vainas de guarango) concentraciones 400, 350, 250, 150, 100, 5 ppm con relación al crecimiento natural o testigo.	41
Tabla 6. Costo de producción por litro de los extractos obtenidos en laboratorio .	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Rhizopus sp.</i>	7
Figura 2. Proceso de extracción en caliente de compuestos de interés a partir de guarango	22
Figura 3. Proceso de extracción en frío de compuestos activos a partir de quinua	24
Figura 4. Evaluación de cambio de coloración en extracto madre de harina de vainas secas de guarango para determinar presencia de taninos.	32
Figura 5. Evaluación de presencia de espuma en extracto acuoso madre resultante del lavado de granos de quinua para comprobar presencia de saponinas.....	34
Figura 6. Esporas de hongo <i>Rhizopus sp.</i> , observadas en microscopio, lente 10x.....	35
Figura 7. Evaluación del efecto inhibitorio del extracto obtenido a partir de granos de quinua con diferentes concentraciones sobre <i>Rhizopus</i> con relación al crecimiento en condiciones óptimas del microorganismo.....	39
Figura 8. Evaluación del efecto inhibitorio del extracto obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango con diferentes concentraciones sobre <i>Rhizopus</i> con relación al crecimiento en condiciones óptimas del microorganismo.....	42
Figura 9. Comparación de medias en porcentaje de inhibición por el método LSD 95% de confianza para <i>Rhizopus</i> hora 12.....	43

Introducción

El aumento del comercio mundial de productos agrícolas junto con los problemas causados por plagas y enfermedades de plantas representan un desafío para la producción de alimentos y la seguridad alimentaria (FAO, 2012a). En países en desarrollo más del 40% de las pérdidas de alimentos se producen en las etapas de postcosecha y procesamiento (FAO, 2012b). El deterioro patológico de frutas, hojas, tallos y productos subterráneos como raíces y tubérculos se debe, con mayor frecuencia, a especies de hongos (Rivera, 2008).

Entre las especies más comunes se puede mencionar: *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor*. Estos microorganismos producen estructuras especializadas como esporas y conidias, que se depositan sobre el producto para que el patógeno pueda invadir y colonizar el tejido causando daños económicos (Rivera, 2008). Los hongos *Rhizopus sp.*, y *Botrytis sp.*, se mencionan como los principales causantes de pudriciones en postcosecha (Fraire, Yáñez, Nieto, y Vázquez, 2003).

En postcosecha, hongos como *Botrytis* y *Rhizopus* ocasiona pudriciones blandas secundarias de frutos y hortalizas, lo que afecta el almacenamiento, transporte y comercialización de los productos (Agrios, 2002). Las infecciones de frutos por parte de *Rhizopus* se producen principalmente en el campo (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008). *Rhizopus stolonifer* presenta un crecimiento rápido y su ataque se asocia a frutas maduras y en descomposición (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, y Vargas, 2012). Para minimizar el ataque de hongos en postcosecha, se utilizan programas de control que se basan en su gran mayoría en la aplicación de fungicidas en campo (Romanazzi y Droby, 2016).

Las estadísticas indican que en Ecuador el uso de agroquímicos está en aumento. En el año 2016, la aplicación de insumos de origen químico representó el 50.03% para cultivos permanentes y 78.24% para cultivos transitorios. Menos del 3% de la superficie cultivada para los dos tipos de cultivos aplicó insumos orgánicos (INEC, 2016). Por otro lado, alrededor del mundo, el uso de productos químicos sobre los cultivos ha generado una creciente preocupación por los consumidores y las autoridades de salud debido a los riesgos asociados con los residuos de estos compuestos en los alimentos (Romanazzi y Droby, 2016).

Como alternativas de control biológico, entre los extractos naturales, se encuentran los taninos y las saponinas. Los taninos tienen un potencial fungicida que contribuye a la resistencia de las plantas al ataque de hongos y otros microorganismos (Margueron, 2006). En cuanto a la capacidad antifúngica de las saponinas, hay estudios que comprueban su eficacia frente el ataque de hongos (Apaza, Smeltekop, Flores, Almanza, y Salcedo, 2016).

Una especie forestal propia de la región andina, que se caracteriza por tener un fruto rico en taninos, es el guarango, tara o taya (*Caesalpinia spinosa* Kuntze) según De la Cruz (2004) y Mancero (2008). La vaina que representa el 62% del peso total del fruto, contiene la mayor concentración de taninos, los mismos que se encuentran en un 40% y 60% en este órgano (De la Cruz, 2004).

Por otra parte, la quinua es una planta originaria de América del Sur, que contiene saponinas, las mismas que se encuentran en la cáscara de sus semillas (Ahumada, Ortega, Chito, y Benítez, 2016). Las saponinas son las responsables del sabor amargo de la quinua y se consideran como compuestos no nutricionales y no aptos para la alimentación humana (Ahumada, Ortega, Chito, y Benítez, 2016).

Frente a la preocupación del uso intensivo de agroquímicos, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto inhibitorio in vitro de extractos naturales que contienen taninos procedentes del guarango y saponinas de quinua como tratamientos alternativos sobre *Rhizopus* un hongo de postcosecha.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Evaluar el efecto inhibitorio de taninos obtenidos de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) sobre *Rhizopus sp.*

1.2. Objetivos Específicos

Evidenciar la presencia de taninos y saponinas en los extractos obtenidos a partir de guarango y quinua respectivamente.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de taninos de guarango y saponinas de quinua sobre *Rhizopus sp.*

Comparar costos de los extractos obtenidos a nivel de laboratorio de guarango y quinua como controladores biológicos sobre *Rhizopus sp.*

2. Marco Teórico

2.1. Generalidades de enfermedades y agentes causales de frutos en postcosecha.

2.1.1. Morfología de hongos de importancia en postcosecha.

El Reino Fungí engloba a organismos que se caracterizan por poseer membrana nuclear y otros organeros rodeados de una membrana celular, es decir son eucariotas (Prescott, Harley, y Klein, 2004). Los hongos son organismos inmóviles, de ciclo de vida simple o complejo, de reproducción asexual o sexual a través de esporas, que carecen de clorofila y viven en todo tipo de hábitat como saprobios, parásitos o simbioses (Ruíz, 2008).

Según su morfología, los hongos se pueden clasificar en filamentosos y unicelulares. Se consideran hongos filamentosos cuando su fase somática se constituye por filamentos tubulares o hifas, cuyo conjunto se denomina micelio. Mientras que los hongos unicelulares corresponden a levaduras (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, y Vargas, 2012). Los hongos requieren para su crecimiento sustancias químicas denominadas metabolitos primarios como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas para promover su crecimiento vegetativo (Soriano, 2015).

Por tal razón se consideran organismos quimiorganótrofos ya que requieren de sustancias orgánicas pre elaboradas como fuente de energía (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, y Vargas, 2012). La humedad en este caso es otro factor de gran importancia, ya que permite la entrada de nutrientes a las células y facilita la liberación de enzimas necesarias para la degradación de las sustancias orgánicas (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, y Vargas, 2012).

Para un crecimiento óptimo, los hongos necesitan factores físicos que promuevan su desarrollo como: temperatura en un rango variable de 0 a 65°C, al menos un 70% de humedad relativa en el ambiente, luz visible (380 -720 nm) y pH de 5- 7 para procesos de reproducción y diferenciación (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, y Vargas, 2012). Una temperatura comprendida dentro del rango de 10 a 35°C es un parámetro específico para los organismos mesófilos, grupo en el que se encuentra la mayoría de los representantes del Reino Fungi (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, y Vargas, 2012).

La mayoría de hongos miceliares dividen su ciclo de vida en asexual y en asexual – sexual. La reproducción asexual se realiza a partir de esporas especializadas que bajo las condiciones adecuadas germinan y producen un nuevo micelio vegetativo con forma y funciones diferentes a las esporas iniciales. Para cerrar el ciclo, en ciertos casos se produce micelio aéreo que da lugar a nuevas esporas (Ruíz, 2008).

El hongo de *Rhizopus sp.*, ataca principalmente al cultivo de tomate. Entre la sintomatología se encuentran lesiones húmedas y blandas que se extienden rápidamente sobre frutos maduros (Blancard, 2011). El micelio del hongo invade tejidos hasta que un moho blanquecino a grisáceo los recubre. Al final se forman fructificaciones aéreas, muy similares a cabezas de alfiler negras sobre los tejidos lesionados (Blancard, 2011). La fresa es otra especie altamente susceptible a patógenos y diversas enfermedades fungosas como por ejemplo la podredumbre causada por *Rhizopus stolonifer* (Cano, 2013). Las lesiones provocadas por éste patógeno con frecuencia tienden a romper la piel del fruto (Kader, 2011).

Rhizopus stolonifer, corresponde al agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda. Esta enfermedad se puede desarrollar en un amplio rango de temperaturas: de 10°C hasta los 33°C en presencia de humedad relativa variable (Plascencia *et al.*, 2012).

El hongo *Rhizopus stolonifer* habita en suelos ricos en materia orgánica que se encuentra en descomposición, y en suelos que mantienen condiciones de elevada humedad (Agustí, 2003).

Las condiciones ambientales para el desarrollo de este hongo corresponden a temperaturas de 10-12° C y humedad relativa de 70 – 80% (Agustí, 2003). Este hongo de postcosecha, se encuentra distribuido en la naturaleza sobreviviendo principalmente de manera saprófita (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008). A continuación, en la tabla 1 se describe su taxonomía.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del hongo de postcosecha, agente causal de pudrición blanda

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino	Fungi
Phylum	<i>Zygomycota</i>
Clase	<i>Zygomycetes</i>
Orden	<i>Mucorales</i>
Familia	<i>Mucoraceae</i>
Género	<i>Rhizopus</i>

Tomado de: (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas, y Vargas, 2012) y (Mier, Toriello, y Ulloa, 2002).

La presencia de heridas en los frutos y esporas en el ambiente es suficiente para que la infección inicie desde el campo, o incluso en los almacenes de recolección y almacenamiento (Agustí, 2003). *Rhizopus stolonifer* se reproduce de manera sexual y asexual por medio de estructuras de morfología similar.

El resultado es la formación de una zigospora (figura 1) que posee paredes gruesas que le dan resistencia y soporta condiciones de alta temperatura y escasez de agua para desarrollarse cuando encuentre las condiciones favorables (Plascencia *et al.*, 2012).

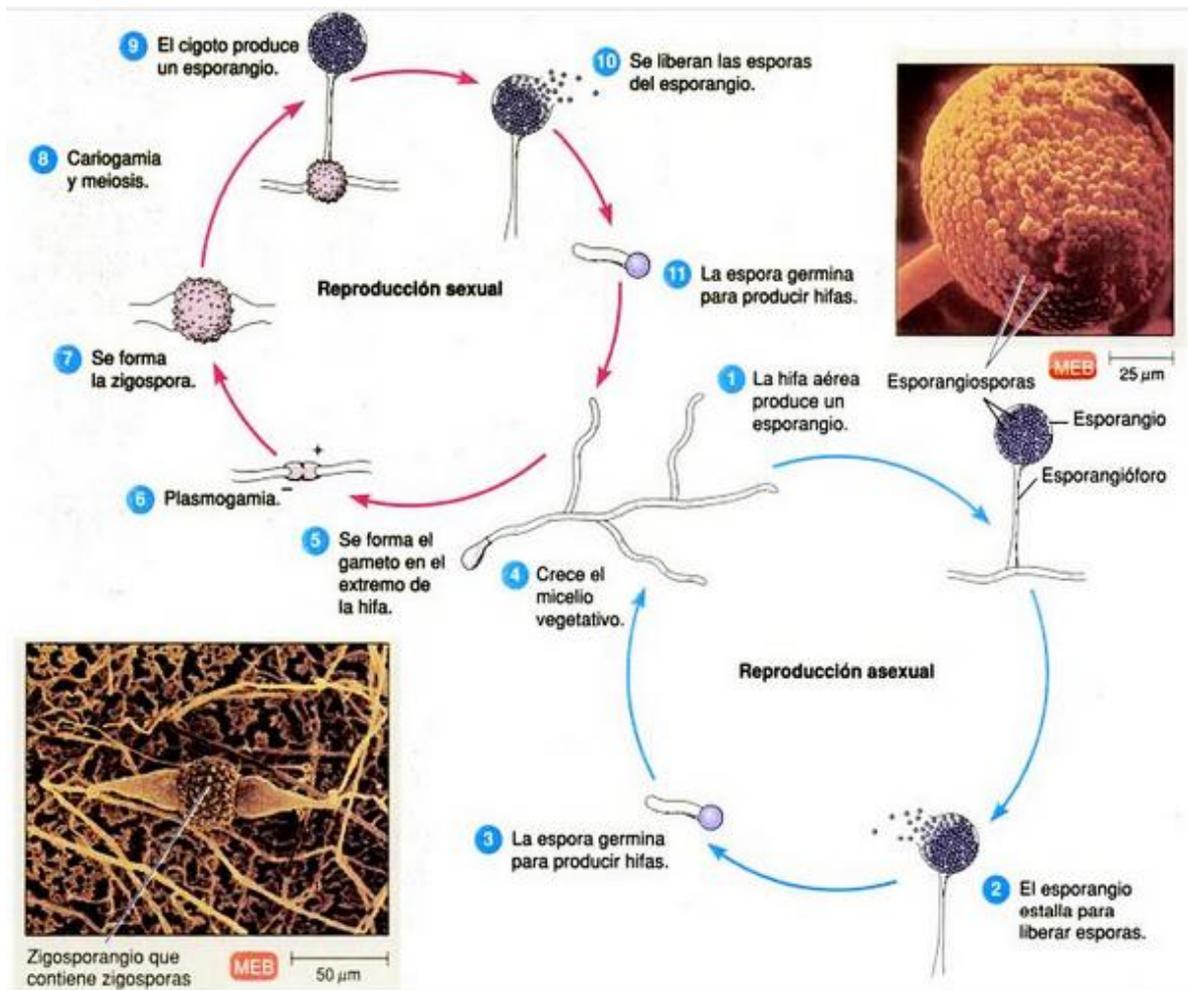


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhizopus sp.*

Tomado de: (Tortora, Funke, y Case, 2007)

2.1.2. Descripción morfológica del Género *Rhizopus*

La morfología macroscópica del hongo *Rhizopus* incluye micelio algodonoso, de rápido crecimiento y de color blanquecino que posteriormente cambia a un

color gris o café amarillento. El reverso de las colonias se identifica con una coloración blanco – grisáceo (Mier, Toriello, y Ulloa, 2002).

Como característica principal de *Rhizopus*, se tiene la formación de micelio aéreo carente de septos y la producción de esporangiosporas de diferentes formas ya que pueden ser globosas, elipsoidales y angulares, con superficies lisas o estrías distintivas (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008). El micelio presenta estolones que conecta grupos de esporangióforos no ramificados. En la base de los esporangióforos se forman hifas de apariencia similar a raíces que se denominan rizoides. El esporangióforo concluye en un esporangio redondo, oscuro, que contiene a muchas esporas ovales de color café claro y que al madurar oscurecen (Mier, Toriello, y Ulloa, 2002).

Las esporas de *Rhizopus stolonifer* tienen la capacidad de sobrevivir largos períodos sin agua y soportar altas temperaturas, de tal manera que germinan sobre tejidos vegetales dañados y promueven una rápida descomposición de los frutos infestados (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008). Al poco tiempo del ataque del hongo, se origina una podredumbre blanda, con pérdida de turgencia de los tejidos vegetales por efecto de la síntesis de enzimas que degradan el fruto. La corteza de los frutos infectados adquiere una coloración marrón que en presencia de condiciones ambientales adecuadas da paso a la presencia de abundante micelio blanquecino y textura algodonosa (Agustí, 2003). Posteriormente, la infección origina abundante micelio y presencia de hifas con esporangios oscuros (Agustí, 2003).

2.1.3. Descripción de control convencional de hongos de importancia en postcosecha

La dispersión de las esporas de hongos como *Rhizopus sp.*, ocurre a través de las corrientes de aire que agitan los follajes de las plantas y residuos vegetales,

por tanto el uso de cubiertas plásticas facilita la reducción de dispersión de infecciones (Fraire, Yáñez, Nieto, y Vázquez, 2003).

Las infecciones provocadas por hongos, genéricamente son promovidas por la alta humedad y la presencia de películas de agua en los órganos de las plantas susceptibles (Elad, 2016). Para el control de dichos factores, se aplica el uso de calefacción en invernaderos, uso de mantillos o calentamiento solar pasivo sin calefacción para controlar la humedad del cultivo y reducir el ataque de este tipo de patógenos (Elad, 2016). Se puede considerar también, la reducción de la densidad de siembra y la administración del dosel del cultivo para favorecer la aireación de los órganos susceptibles al ataque de hongos (Elad, 2016).

Otras opciones para el control de hongos incluyendo *Rhizopus* son: la aplicación de ferti-irrigación con altos niveles de potasio y calcio (Elad, 2016). El calcio tiene un efecto de barrera frente al ataque de hongos. Este elemento refuerza la cutícula foliar y la piel de los frutos, disminuyendo la transpiración y la pérdida de agua. De igual forma, estos elementos, inducen los mecanismos de defensa de las plantas (De Liñán, 2015). El potasio por su parte favorece la maduración de los frutos y protege a las plantas del estrés causado por condiciones climáticas (De Liñán, 2015).

Como parte del control cultural, se recomienda evitar cosechar en días lluviosos y se debe planificar la aplicación de fungicidas para la protección de heridas de cosechas frescas (Elad, 2016). Es imprescindible que la cosecha permanezca el menor tiempo posible húmeda para evitar el ataque de patógenos como otra medida de prevención (Elad, 2016).

Por último, en el caso del control químico, es importante verificar el producto a utilizarse y su límite máximo de residualidad (LMR). En nuestro país, comercialmente para el tratamiento de hongos como *Rhizopus* se recomienda

el uso de productos como iprodione 50PM (AGROSAD, 2018). Este producto químico consta en la lista de plaguicidas registrados en Agrocalidad para uso dentro de nuestro país (Agrocalidad, 2017). El compuesto activo de éste fungicida es la Iprodiona que tiene un límite máximo de residualidad (LMR) de hasta 30 mg/Kg (FAO) en frutas como moras, mientras que para el caso de la fresa el límite residual máximo corresponde a 10 mg/Kg (FAO).

2.2. Alternativas de control biológico para el control de microorganismos fitopatógenos.

2.2.1. Aplicación de microorganismos como control biológico sobre *Rhizopus stolonifer*

Para el control de las pudriciones en postcosecha ocasionadas por *Rhizopus stolonifer*, se aplican métodos alternativos naturales que incluyen el uso de compuestos inocuos y seguros para los consumidores (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008). Las nuevas tendencias incluyen productos de origen vegetal, antagonistas microbianos y quitosano (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008).

Estas alternativas se utilizan como tratamientos solos o en combinación para potenciar el efecto positivo sobre el hongo de postcosecha (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008).

Una alternativa para el control de *Rhizopus*, sin uso de fungicidas de síntesis, es el uso de biocontroladores como *Rhodotorula glutinis* (Zhang *et al.*, 2010). El uso de éstas levaduras resultó en un efecto positivo al aplicarlas solas o en combinación con ácido salicílico para controlar la pudrición en postcosecha (Zhang *et al.*, 2010). La combinación de *R. glutinis* (1×10^8 CFU/ml) con ácido salicílico (100 µg/ml) dió como resultado una reducción significativa en la

incidencia del ataque del hongo además de que redujo el diámetro de la lesión causada por *Rhizopus*. Dentro del mismo estudio se estableció que la aplicación de *R. glutinis* aumentó la actividad enzimática de defensa del huésped (Zhang *et al.*, 2010).

En otro estudio realizado por Xu *et al.* (2013) se determinó que la levadura *Pichia caribbica* tiene un alto potencial como agente de biocontrol sobre *Rhizopus* aplicado como tratamiento de postcosecha en duraznos. Cuanto mayor fue la concentración del inóculo antagonista, menor era la incidencia de la enfermedad y menor el diámetro de las lesiones (Xu *et al.*, 2013). Una concentración de 1×10^9 células/ml del inóculo, redujo la incidencia de la enfermedad y el diámetro de la lesión causada por *Rhizopus* en un 4.2% y 26,2 mm respectivamente. La incidencia de la enfermedad y el diámetro de la lesión causada por *Rhizopus* se redujo 100% y 58.4 mm respectivamente en las frutas utilizadas como control (Xu *et al.*, 2013). En el estudio se consideró como posibles modos de acción de *P. caribbica* la competencia por espacio y nutrientes, la capacidad de inducir enzimas asociadas con la defensa y la resistencia propia del fruto (Xu *et al.*, 2013).

2.2.2. Aplicación de extractos vegetales como alternativas de control biológico.

Se conoce que algunas plantas sintetizan una variedad de metabolitos secundarios como mecanismos de defensa contra ciertas plagas. El proceso de obtención de dichos metabolitos es variable, se pueden obtener extractos acuosos, polvos o se pueden utilizar disolventes para obtener diferentes compuestos según su polaridad (Hernández, Bautista, y Velázquez, 2007).

En un estudio realizado para determinar la actividad antifúngica de extractos de diferentes constituyentes de plantas junto con sus aceites esenciales; se estimó

que los aceites esenciales de mayor efecto sobre *Botrytis cinerea* corresponden a palmarosa (*Cymbopogon martini*); tomillo rojo (*Thymus zygis*); hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y brotes de clavo (*Eugenia caryophyllata*) (Wilson, Solar, El Ghaouth, y Wisniewski, 1997). Los compuestos activos más frecuentes en estos aceites esenciales son: D-limoneno, cineol, β -mirceno; α -pineno, β -pineno; y alcanfor como sustancias responsables del efecto antifúngico (Wilson, Solar, El Ghaouth, y Wisniewski, 1997).

Por otro lado, el aceite esencial de *Citrus sinensis* reveló una fuerte actividad inhibitoria tanto del crecimiento radial como del número de esporas de *Rhizopus stolonifer* (Narváez *et al.*, 2017). La aplicación del 4% de aceite esencial proveniente de hojas y pericarpio de *Citrus sinensis* inhibe en un 100% y en un 95.62% el crecimiento radial del hongo *R. stolonifer*, y el crecimiento de sus esporas. Este estudio se realizó para evaluar procesos de conservación de papaya variedad Maradol (Narváez *et al.*, 2017).

Otros aceites esenciales como los que se obtienen del orégano (*Origanum compactum* Benth) y del tomillo (*Thymus glandulosus* Lag. ex H. del Villar) en dosis de 100 μ g / mL inhiben completamente el crecimiento de *Botrytis cinerea*. El carvacrol y el timol son los componentes activos principales responsables del efecto antifúngico de dichos aceites esenciales respectivamente (Bouchra, Achouri, Idrissi , y Hmamouchi, 2003). Estos mismos aceites esenciales en otro estudio *in vitro* presentaron un efecto fungicida sobre el crecimiento del micelio y la germinación de esporas para el caso de *Rhizopus stolonifer* (Velázquez, Bautista, y Hernández, 2008).

La aplicación de hojas pulverizadas de *Cestrum nocturnum* inhibieron en un 10 a 44% el crecimiento de micelio de *Rhizopus stolonifer* (Barrera y Bautista, 2008). Se evaluó dentro del mismo estudio sub-fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *Cestrum nocturnum* y se concluyó que las fracciones

más polares mostraron mayor inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer*. Dentro de esas sub-fracciones con efectos positivos sobre *R. stolonifer* se identificaron saponinas esteroidales. Se ha reportado en la literatura al menos 16 saponinas esteroidales en hojas frescas de *Cestrum nocturnum* (Barrera y Bautista, 2008).

En un estudio realizado por Apaza, Smeltekop, Flores, Almanza, y Salcedo (2016), se evaluó el efecto de saponinas de quinua sobre el hongo *Cercospora beticola* Sacc., que ataca los cultivos de acelga y se determinó su eficacia en concentraciones desde los 5mg/ml.

2.3. Generalidades de la Quinua

2.3.1. Quinua variedad INIAP Tunkahuan

La variedad Tunkahuan se obtuvo por selección de una población de germoplasma que fue recolectada en la provincia del Carchi en Ecuador en el año 1985 (Peralta, Murillo, Mazón, Villacrés, y Rivera, 2013). Para el año 1986 se identificó como línea promisorio y se introdujo en el Banco de Germoplasma del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos del INIAP con el código de identificación ECU 0621 (Peralta, Murillo, Mazón, Villacrés, y Rivera, 2013).

Las variedades INIAP Tunkahuan y Pata de Venado se consideran variedades dulces, que se pueden desaponificar fácilmente vía seca mediante el escarificado o por vía húmeda utilizando 50% menos de agua que de la forma habitual (Peralta, Murillo, Mazón, Villacrés, y Rivera, 2013).

En 1992 se liberó las primeras variedades de quinua de bajo contenido de saponinas de las cuales solo la variedad INIAP Tunkahuan se mantiene vigente. Esta variedad se ha adaptado en muchas comunidades y ha sido

promocionada por fundaciones y organizaciones de desarrollo en las provincias de la Sierra (desde Carchi hasta Cañar) (Peralta, Murillo, Mazón, Villacrés, y Rivera, 2013). La semilla de esta variedad se purificó de tal manera que se produjo y distribuyó semilla de buena calidad. Se generaron adicionalmente otras actividades de capacitación y difusión de información sobre la producción, agroindustria, preparación y promoción del valor nutritivo de la quinua dentro de la alimentación humana. El contenido de saponinas en la variedad INIAP Tunkahuan corresponde a 0.06% (Peralta, Murillo, Mazón, Villacrés, y Rivera, 2013).

2.3.2. Saponinas de la Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), pertenece a la familia Amaranthaceae, plantas herbáceas nativas de la región andina (Fiallos *et al.*, 2016). Se encuentra distribuida en países como Ecuador, Perú y Bolivia (Ahumada, Ortega, Chito, y Benítez, 2016).

La quinua es un pseudocereal con alto valor nutricional y en sus semillas el contenido de proteínas corresponde al 15% y presenta una composición equilibrada de aminoácidos, minerales, vitaminas y otros nutraceuticos como polifenoles y flavonoides. (Fiallos *et al.*, 2016). En relación con el grano de trigo, la semilla de quinua tiene mayor contenido de proteína y un perfil de aminoácidos más favorable, así mismo presenta mayores niveles de energía, calcio, fósforo, hierro y fibra dietética (Ruiz *et al.*, 2017).

La capa externa de las semillas de quinua acumula saponinas, un factor no nutricional (Fiallos *et al.*, 2016) que además le atribuye un sabor amargo y astringente a los alimentos (Ruiz *et al.*, 2017). El contenido de saponinas permite clasificar las variedades de quinua como dulces, cuando el porcentaje

de composición es menor a 0.11% o amargas cuando el porcentaje de composición es superior a 0.11% (Ahumada, Ortega, Chito, y Benítez, 2016).

Entre los subproductos de la quinua, se considera a las saponinas como un producto de desecho que se tiene que eliminar antes del consumo (Ruiz *et al.*, 2017). Para eliminar las saponinas contenidas en la cáscara de quinua existen principalmente dos métodos: por lavado o por fricción (Wahli, 2012). El lavado de quinua requiere utilizar una proporción de 1:8 (quinua: agua) para las variedades amargas y una relación de 1:5 (quinua: agua) para las variedades semidulces. Una alternativa a nivel industrial para extraer saponinas consiste en pulir el grano para eliminar la cáscara (Wahli, 2012).

Las saponinas corresponden a metabolitos especializados producidos por algunas especies de plantas. Son compuestos anfipáticos estructurados por un triterpenoide hidrofóbico y fracciones de azúcar hidrofílicas (Fiallos *et al.*, 2016). Como señala Singh y Kaur (2018) las saponinas corresponden a glucósidos que derivan su nombre de sus propiedades similares al jabón. Las saponinas se clasifican en tres tipos de acuerdo a su estructura en la región de aglicona (estructuras triperpénicas o esteroídicas hidrofóbicas): triterpenoidal, esteroides y saponinas glucoalcaloides esteroides (Singh y Kaur, 2018).

Las saponinas muestran propiedades similares a los detergentes cuando se agitan con agua ya que forman micelas. La unión entre la aglicona soluble en grasa y las cadenas de oligosacáridos solubles en agua permite a las saponinas ser una molécula anfipática con características surfactantes que producen la interacción entre saponinas y membranas celulares (Singh y Kaur, 2018). Esta interacción muestra gran variedad de efectos biológicos en la vida de organismos como la permeabilidad de la membrana, hemólisis, acción insecticida, actividades alelopáticas y antifúngicas. Las saponinas afectan la ingesta de alimentos, la supervivencia, la tasa de crecimiento y reproducción

en algunos insectos, hongos, bacterias, virus, moluscos y animales (Singh y Kaur, 2018).

2.4. Generalidades del Guarango

2.4.1. El Guarango en el Ecuador

En Ecuador existe una diversidad de regiones en donde el árbol de guarango se puede desarrollar con un potencial productivo óptimo, sobre todo se lo encuentra en territorios de los valles bajos de la sierra: en provincias como Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja (Núñez, Quiala, de Feria, Mestanza, y Teanga, 2017). Las poblaciones silvestres del guarango son aprovechadas para delimitar o cercar terrenos, para generar sombra a otros cultivos y como fuente de leña y producción de carbón vegetal (Núñez, Quiala, de Feria, Mestanza, y Teanga, 2017).

CONAPROG (Consortio de Productores de Guarango) es una iniciativa de la Fundación Desde el Surco que agrupa productores de los valles bajos de la Sierra del Ecuador, dentro de una cadena agro-productiva de guarango. Este consorcio se planteó como meta sembrar al menos 5000 hectáreas en sistemas diversos y agrupar a los plantadores dentro de un emprendimiento para acopiar, procesar y exportar productos y subproductos del guarango (Narváez, Calvo, y Troya, 2009).

Cabe destacar que en Ecuador se ha estudiado a esta especie forestal cada vez con mayor interés. Hay investigaciones que han logrado propagar *in vitro* a la especie *Caesalpinia spinosa* a partir de yemas axilares. También se han desarrollado las bases de protocolos de propagación *in vitro* para guarango (Núñez *et al.*, 2017). Los taninos y gomas del guarango presentan alta

demanda mundial, esto se debería interpretar como una oportunidad para el aprovechamiento de la especie (Narváez, Calvo, y Troya, 2009).

2.4.2. Taninos de Guarango

El guarango es una especie forestal originaria de la región andina, cuya importancia se remonta a las culturas pre-incas e incas, donde tuvo fines de interés económico y medicinal, mostrando su gran potencial de aprovechamiento para usos no maderables (Mancero, 2008). Principalmente se utilizó esta especie para elaborar tintes de uso textil, decoración de cerámicas y para curtir pieles. En la actualidad es posible encontrar esta especie en zonas semiáridas en países como Venezuela, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y al norte de Chile (Mancero, 2008).

El árbol de guarango (*Caesalpinia spinosa* Kuntze) contiene gran cantidad de taninos hidrolizables. Estos compuestos se pueden obtener principalmente a partir de las vainas secas del guarango o tara (Dávalos, Romero, Sánchez, Chávez, y Valderrama, 2017). De este recurso forestal, en nuestros días, se comercializa tanto la vaina de su fruto de donde se extraen taninos para la industria de curtiembre y su semilla, de la que se aprovecha su endospermo para obtención de goma tara utilizada en la industria de alimentos como un aditivo (E417) de uso seguro (Bonilla, López, Carbajal, y Siles, 2016).

Los taninos se identifican como polifenoles de sabor astringente y que poseen la capacidad de convertir pieles de animales en cuero estable. Existen dos grupos de taninos identificados en las plantas, los hidrolizables y los condensados (Margueron, 2006). Las sustancias polifenólicas conocidas como taninos vegetales son fácilmente extraíbles con agua a partir de casi todas las plantas (dos Santos, Flôres, y Rodolfo, 2016). Los taninos pueden encontrarse

en estructuras vegetales tales como cortezas de madera, frutas, vianas de fruta, hojas, raíces, entre otros (dos Santos, Flôres, y Rodolfo, 2016).

Los taninos hidrolizables son solubles en agua, contienen ácidos fenólicos simples esterificados con una o más moléculas de azúcar y son hidrolizados por ácidos diluidos (Margueron, 2006). Estos compuestos se hidrolizan fácilmente por ácidos, álcalis o incluso enzimas como tannasas en un azúcar o un ácido polihídrico (poliol) y un ácido carboxílico fenólico (Chambi *et al.*, 2013). Según la naturaleza del ácido carboxílico fenólico los taninos hidrolizados se pueden dividir en galotaninos y elagitaninos fenólico (Chambi *et al.*, 2013).

De la hidrólisis de galotaninos se produce ácido gálico, mientras que de la hidrólisis de elagitaninos se produce ácido hexahidroxidifénico que se aísla como ácido elágico (Chambi *et al.*, 2013). Entre los compuestos fenólicos comunes de taninos hidrolizables tenemos los compuestos gálicos, digálicos y el ácido elágico (Margueron, 2006). Los taninos hidrolizables se consideran como uno de los más potentes antioxidantes de origen vegetal. Forman complejos con metales reactivos, evitando la generación de radicales libres que pueden provocar daño oxidativo en membranas celulares y el ADN, neutralizándolos dentro del cuerpo humano (Chambi *et al.*, 2013).

Los taninos condensados, por su parte, son polifenoles insolubles en agua, que en tratamientos con ácidos producen complejos productos conocidos como rojos de tanino o phlobaphenes (Margueron, 2006). Los taninos condensados son extremadamente difíciles de aislar. No hay una estructura completa de tanino condensado que se conozca con certeza. A los taninos hidrolizables se los encuentra en hojas, mientras que los taninos condensados se concentran en maderas (Margueron, 2006).

En un estudio realizado por Aguilar, Noratto, Chambi, Debaste, y Campos (2014), donde se evaluó el potencial de la tara (*Caesalpinia spinosa*), en específico galotaninos e hidrolizados como compuestos antibacterianos, los resultados mostraron que las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella enteritidis* presentaron mayor sensibilidad al extracto obtenido a partir de vainas secas de tara (harina de guarango) con un MIC (concentración mínima inhibitoria) de 0.53, 1.06 y 4.25 mg GAE / ml respectivamente.

3. Materiales y Métodos

El presente estudio se realizó en la ciudad de Quito, en los laboratorios multidisciplinarios de Ciencias Biológicas y Químicas (LACBYQ) de la Universidad de las Américas, ubicados en campus Queri y Granados.

Los extractos acuosos se obtuvieron a partir del agua de lavado de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) variedad dulce Tunkahuan y la harina de la vaina del fruto de guarango (*Caesalpinia spinosa* Kuntze). La variedad de quinua Tunkahuan, se obtuvo en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) estación Santa Catalina. La harina procedente de vainas de guarango se obtuvo directamente de un productor de árboles de guarango ubicado en el cantón: Pedro Moncayo, parroquia: Tocachi, sector: Chimburlo (zona rural agrícola), calle principal: Panamericana Norte.

El microorganismo en estudio se aisló a partir de frutillas que presentaron síntomas de la enfermedad.

3.1. Recolección, aislamiento y purificación del microorganismo

A partir de frutillas infectadas con *Rhizopus sp.* Se tomó parte del micelio algodonoso y se lo utilizó para realizar el aislamiento del hongo patógeno como lo describe Plascencia *et al.*, (2012). Se inoculó la muestra del hongo en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA) y se modificó el medio de cultivo al enriquecerlo con fructosa al 5%. A continuación se incubó a 25°C por 48 horas.

Una vez que el micelio se desarrolló, se tomó una muestra del mismo y se observó la morfología del hongo en microscopio óptico (marca OLYMPUS, modelo BX51). Para la purificación del hongo de interés se realizó repiques de inóculos hasta obtener la cepa de *Rhizopus sp* pura en cantidad suficiente para el estudio.

3.2. Obtención de extractos

3.2.1. Proceso de extracción en calor para obtención de compuestos activos a partir de harina de vainas secas del fruto de guarango

Para el proceso de extracción, se pesaron las equivalencias de los insumos requeridos (balanza: marca SHIMADZU, modelo TX3202L). Como se detalla en la figura 2. Se utilizó agua destilada en una proporción 1:100 (peso:volumen) para la extracción de taninos a partir de harina de guarango.

Una vez que se tuvo un primer extracto acuoso, la extracción de taninos se realizó con calor a 55°C por 30 minutos (plancha de calentamiento y agitación magnética: marca VELP SCIENTIFICA y termómetro digital) según la metodología de Aguilar, Noratto, Chambi, Debaste, y Campos (2014).

A continuación, se separó el extracto acuoso de los residuos sólidos de la harina de guarango mediante centrifugación en dos etapas (centrífuga: marca THERMO SCIENTIFIC, modelo SORVALL ST8). Por último, el extracto obtenido se filtró, primero con papel de 40 μm y luego se utilizó un filtro de membrana para jeringa de 0.22 μm de tamaño de poro (THERMO SCIENTIFIC 0.22 μm PES), para finalmente almacenar en refrigeración el producto resultante.

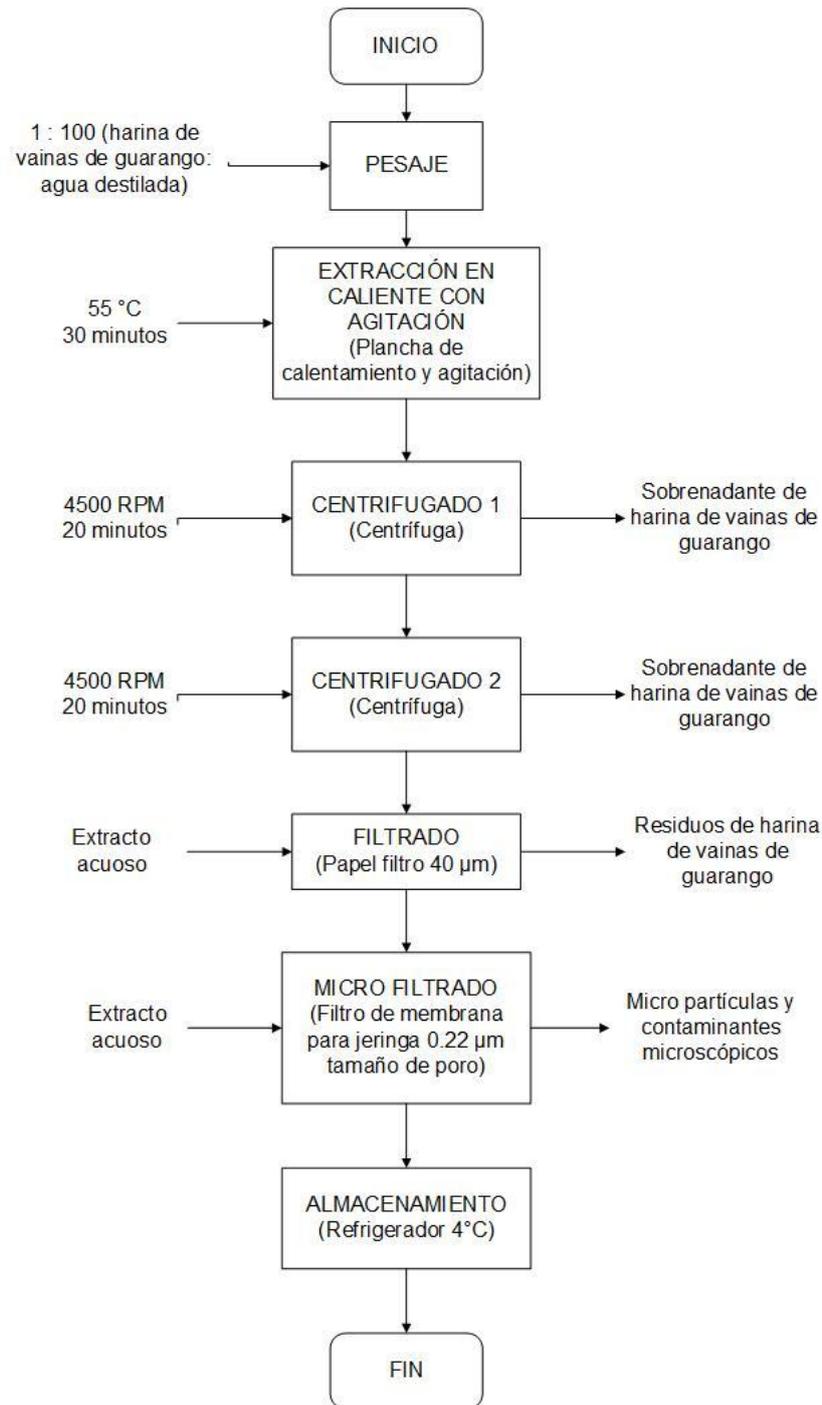


Figura 2. Proceso de extracción en caliente de compuestos de interés a partir de guarango

Adaptado de: (Aguilar, Noratto, Chambi, Debaste, y Campos, 2014)

3.2.2. Proceso de extracción en frío para obtención de compuestos activos del agua de lavado de quinua

Para el proceso de obtención del extracto acuoso, primeramente se pesó la cantidad requerida de insumos (balanza: marca Shimadzu, modelo TX3202L). En la figura 3 se describe la metodología de Guzmán, Cruz, Alvarado, y Mollinedo (2013). Se utilizó agua destilada como solvente y como método de extracción se empleó la agitación continua de las muestras a temperatura ambiente (agitador orbital: marca Boeco, modelo PSU-15i). El tiempo de agitación estimado fue de 24 horas, a 130 RPM, y la relación masa / volumen: 1/20. Se separó el extracto acuoso de los granos quinua y se filtró con papel filtro de 40 μm . Por último, se utilizó un filtro de membrana para jeringa de 0.22 μm de tamaño de poro (Thermo Scientific 0.22 μm PES) y se almacenó en refrigeración el extracto resultante.

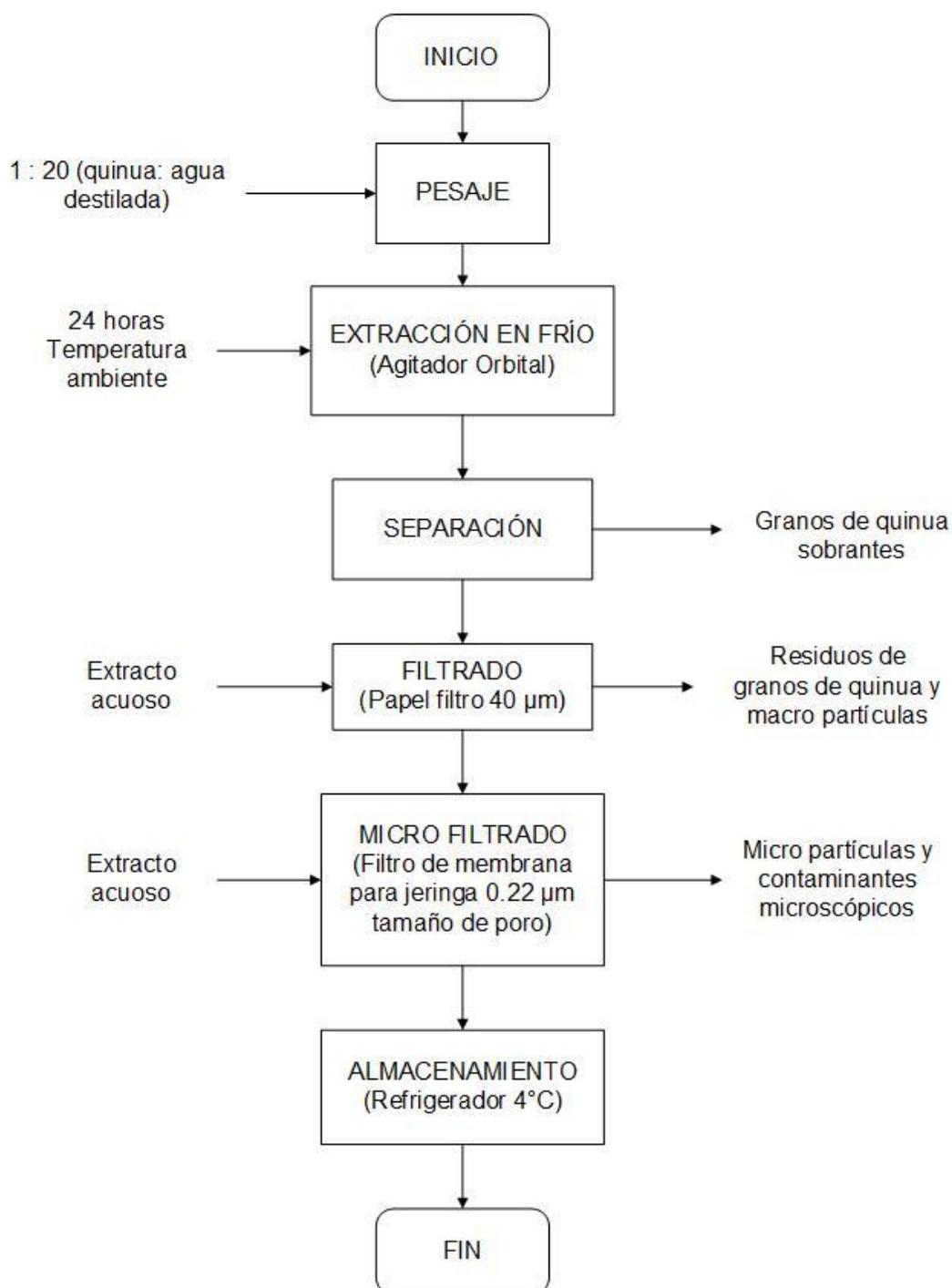


Figura 3. Proceso de extracción en frío de compuestos activos a partir de quinua

Adaptado de: (Guzmán, Cruz, Alvarado, y Mollinedo, 2013).

Luego de obtener los extractos acuosos correspondientemente, se determinó el rendimiento de cada uno al aplicar un método gravimétrico – volumétrico según la siguiente fórmula (Castro, 2008):

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{P.E. (g)}{P.muestra (g)} \times 100 \%$$

(Ecuación 1)

(Castro, 2008)

Donde:

P.E.: Peso del extracto resultante en gramos

P. muestra: Peso de la muestra a extraer en gramos

3.3. Análisis cualitativo de taninos y saponinas presentes en los extractos obtenidos a partir de guarango y quinua respectivamente

3.3.1. Análisis cualitativo de taninos

Se prepararon dos tubos de ensayo rotulados con “muestra” y “blanco”, en cada tubo de ensayo se agregó 10 gotas de extracto resultante a partir de harina de las vainas de guarango y 10 gotas de agua destilada, por último, se agregó 5 gotas de cloruro férrico (FeCl₃) en los tubos “muestra” y “blanco” (Velásquez, 2004).

En la tabla 2 se encuentra la clasificación de los taninos en la que se fundamenta el ensayo realizado.

Tabla 2.

Carta colorimétrica para identificación de taninos

COLOR	CONTENIDO	TIPO DE TANINO
<i>Amarillo</i>	Bajo o nulo contenidos de taninos	Ausencia
<i>Azul oscuro</i>	Contenido medio de taninos	Taninos pirogálicos (taninos hidrosolubles)
<i>Verde oscuro</i>	Alto contenidos de taninos	Taninos concentrados

Nota: se concluye que ha ocurrido un cambio en el color de la muestra cuando al comparar su coloración con la del blanco se encuentran diferencias.

Tomado de: (Velásquez, 2004)

3.3.2. Análisis cualitativo de saponinas

Se colocó en un tubo de ensayo un volumen de 10 ml de solución resultante del lavado de granos de quinua y se agitó el tubo de ensayo por 5 minutos (Mena *et al.*, 2015). Al término de este tiempo se dejó en reposo y se observó los cambios producidos en el extracto.

3.4. Evaluación del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de granos de quinua y harina de vainas del fruto de guarango sobre *Rhizopus sp.*

Los inóculos del patógeno en estudio se prepararon en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar (marca: Thermo Scientific, modelo 1395). Se siguió la metodología descrita por Kouassi *et al.*, (2012) y se realizó una modificación

al utilizar caldo de papa dextrosa enriquecido con 5% de fructosa que reemplazó al jugo de frutas. Se aisló el hongo patógeno en medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa) adicionado el 5% de fructosa, a 25°C de temperatura durante 2 días en cajas Petri. Se realizaron los repiques necesarios del cultivo puro para obtener suficiente cantidad de inóculo y recuperar una solución de esporas de madurez de 4 a 5 días.

Para la recuperación de esporas se agregó 4 ml de solución salina en una caja Petri con presencia de abundante micelio, y se desalojó los conidios al frotar la superficie de la caja Petri con una varilla de vidrio. Se filtró el producto resultante con gasa estéril y se removieron los micelios del hongo, dejando libres esporas en solución.

Para establecer la concentración de la solución de esporas dentro del ensayo, se utilizó una cámara de Neubauer (Marienfeld, profundidad: 0.100 mm, líneas claras) y se aplicó la siguiente fórmula para realizar el conteo:

(Ecuación 2)

células por μl

$$= \frac{\text{total células contadas}}{\text{superficie contada (mm}^2\text{)} * \text{profundidad de la cámara (mm)} * \text{dilución}}$$

(Marienfeld Superior, 2010)

Se ajustó una concentración de 10^5 esporas / ml (Gepp *et al.*, 2012) y se evaluó el crecimiento de los microorganismos, para esto se agregó un volumen de 200 μl (160 μl de caldo papa dextrosa con 5% de fructosa y 40 μl solución de esporas) en microplacas Elisa (CITOTEST 96 pocillos fondo cóncavo). Se realizaron mediciones de densidad óptica de los tratamientos en un lector de placas Elisa (marca SEAC RADIM, modelo Sirio S), siendo la unidad de medida la absorbancia (A).

Las lecturas de absorbancia se realizaron en intervalos de 12 horas a 492 nm de longitud de onda. Las microplacas se mantuvieron en incubación a 25°C durante todo el ensayo. Antes de efectuar la lectura de los datos, cada placa recibió una agitación constante de 15 segundos que se programó en el equipo antes descrito (Programación Modo 3).

3.4.1. Evaluación *in vitro* del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de granos de quinua y harina de vainas de guarango sobre *Rhizopus*

La evaluación *in vitro* del efecto biológico de los extractos resultantes se realizó con un diseño completamente al azar (DCA). Los tratamientos analizados fueron: un testigo absoluto y las correspondientes diluciones junto con un blanco para cada extracto: saponinas de quinua 300, 250, 200, 150, 50, 0.5 ppm y taninos de guarango 400, 350, 250, 150, 100, 5 ppm. Las diluciones de cada extracto se prepararon con agua destilada estéril aplicando la siguiente fórmula:

(Ecuación 3)

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

(Brezonik y Arnold, 2011)

Donde:

V1 N1: Volumen y concentración inicial

V2 N2: Volumen y concentración final

Se utilizó microplacas Elisa (CITOTEST) de 96 pocillos cóncavos donde se distribuyeron los tratamientos. Se estimaron 3 columnas por tratamiento, siendo la fila B el espacio designado para el blanco de cada dilución (medio de cultivo y dilución sin agregar esporas), mientras que en las filas C, D, E, F, y G se colocó las réplicas de las diluciones correspondientes desde la mayor a la

menor concentración para cada extracto (140 µl de medio de cultivo, 40 µl solución de esporas y 20 µl tratamiento de dilución correspondiente).

Se utilizó una concentración de 10^5 esporas / ml en cada unidad experimental y como medio de cultivo y fuente de alimento para las esporas, se utilizó agar papa dextrosa modificado con 5% de fructosa. En el perfil de las placas no se agregó nada para evitar contaminación de las placas entre sí y para facilitar el manejo de las mismas. Las microplacas se incubaron a 25°C en oscuridad y el crecimiento del micelio se determinó mediante mediciones a 492 nm de la densidad óptica. Las mediciones de los resultados se realizaron cada 12 horas. El porcentaje de inhibición del extracto sobre el hongo en estudio se realizó con ayuda de la siguiente fórmula:

(Ecuación 4)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{D.O. \text{ control} - D.O. \text{ tratamiento}}{D.O. \text{ control}} \times 100\%$$

(Kouassi *et al.*, 2012)

Donde:

D.O. control: Densidad óptica solución de esporas y medio de cultivo

D.O. tratamiento: Densidad óptica solución de esporas, medio de cultivo y tratamiento de dilución correspondiente

3.5. Métodos estadísticos

En el presente trabajo, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). El diseño seleccionado considera el error aleatorio y los tratamientos como fuentes de variabilidad como se muestra en la siguiente ecuación:

(Ecuación 5)

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

(Gutiérrez y de la Vara, 2012)

Donde:

μ_1 : media global

τ_i : efecto del tratamiento

i y e_{ij} : medición Y_{ij}

Estadísticamente se puede expresar como:

(Ecuación 6)

$$F_o = \frac{CM_T}{CM_E}$$

(Gutiérrez y de la Vara, 2012)

Se utilizó como software de apoyo Minitab 18 versión libre. Los datos obtenidos en la evaluación *in vitro*, se analizaron en orden aleatorio, de tal manera que los posibles efectos ambientales, o temporales se repartan equitativamente entre el total de los tratamientos (Gutiérrez y de la Vara, 2012). Para determinar la diferencia entre los extractos analizados con respecto al crecimiento del hongo de postcosecha *Rhizopus* se aplicó un ANOVA respondiendo a la siguiente hipótesis:

Hipótesis nula:

No existe diferencias significativas del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de guarango y quinua sobre el crecimiento del hongo *Rhizopus*

Hipótesis alternativa:

Existe diferencias significativas del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de guarango y quinua sobre el crecimiento del hongo *Rhizopus*

El objetivo fue probar la igualdad de los tratamientos con respecto a la media de la correspondiente variable respuesta, como se muestra a continuación:

(Ecuación 7)

$$H_o : \mu_1 = \mu_2 = \dots \mu_k = \mu$$

$$H_A : \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j$$

(Gutiérrez y de la Vara, 2012)

Donde:

 H_0 : hipótesis nula H_A : hipótesis alternativa μ_1 : media

En caso de encontrar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se aplicó un análisis funcional de comparación de medias (Fisher $\alpha = 5\%$) cumpliendo el estadístico de prueba de la ecuación 7. Para toda $i \neq j$ el diseño balanceado LSD se expresa:

(Ecuación 8)

$$\text{LSD} = t_{\frac{\alpha}{2}, N - k} \sqrt{\frac{2\text{CM}_E}{n}}$$

(Gutiérrez y de la Vara, 2012)

Para verificar el cumplimiento de supuestos de normalidad de los residuos en los datos analizados, se realizó la prueba de Shapiro – Wilks con la siguiente hipótesis:

H₀: Los datos proceden de una distribución normal**H_a**: Los datos no proceden de una distribución normal

Estadístico:

(Ecuación 9)

$$W = \frac{1}{(n-1)S^2} \left[\sum_{i=1}^k a_i (X_{(n-i+1)} - X_{(i)}) \right]^2$$

(Gutiérrez y de la Vara, 2012)

Donde:

S: varianza de la muestra

Cuando el valor de W es menor al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), se rechaza la normalidad (Delgado , 2004).

4. Resultados y Discusión

4.1. Determinación de presencia de compuestos de interés en extractos obtenidos a partir de granos de quinua y harina de vainas de guarango

En el caso del extracto acuoso obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango, se determinó positiva la presencia de taninos. El cambio de coloración en las muestras fue de amarillo claro a azul oscuro, lo que permitió identificar la presencia de taninos hidrosolubles. La reacción de cambio de color se produjo inmediatamente al contacto con el reactivo: cloruro férrico (FeCl_3), la diferencia se puede apreciar en la figura 4. Izquierda: blanco y muestra antes de agregar cloruro férrico. Derecha: blanco y muestra después de agregar cloruro férrico.

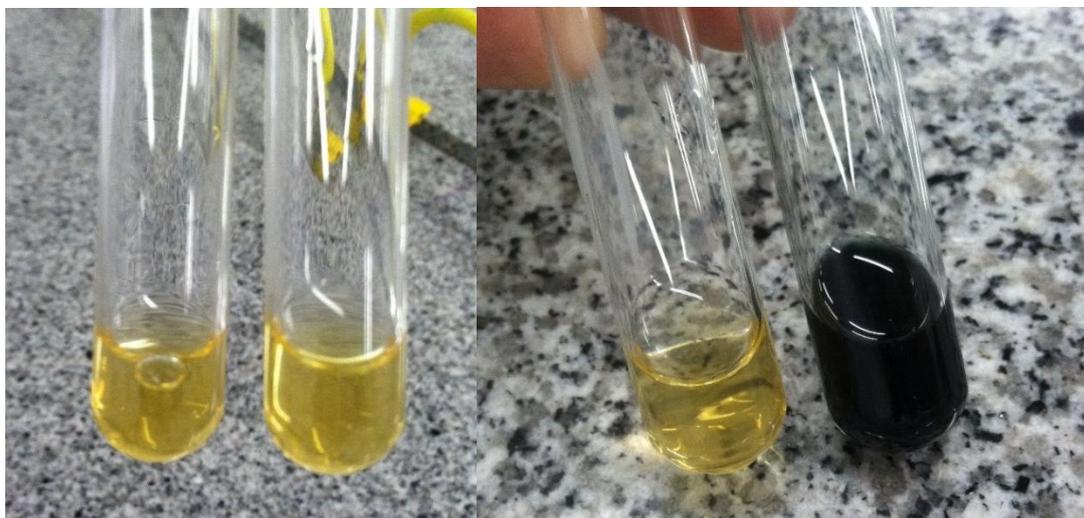


Figura 4. Evaluación de cambio de coloración en extracto madre de harina de vainas secas de guarango para determinar presencia de taninos.

La reacción y cambio de coloración se debe a la respuesta que produce la interacción del ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, lo que provoca una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro o formación de un complejo (Coy, Parra, y Cuca, 2014). Los taninos son polímeros de polifenoles con 1 a 2 % de hidróxidos fenólicos libres. Los taninos al igual que los compuestos fenólicos precipitan en presencia de cloruro férrico (Coy, Parra, y Cuca, 2014).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, coinciden con lo investigado por dos Santos, Flôres, y Rodolfo (2016), quienes evaluaron la presencia de taninos en extractos de varias especies vegetales incluyendo el guarango, y lo clasificaron dentro del grupo que presentó taninos hidrolizables. Aguilar, Noratto, Chambi, Debaste, y Campos (2014), comprobaron de igual forma la presencia de taninos hidrolizables en extractos de vainas secas del fruto de guarango en donde a partir de un extracto acuoso, mediante hidrólisis ácidos se obtienen galotaninos.

Por otro lado, el extracto acuoso obtenido a partir de granos de quinua, presentó espuma estable, este resultado coincide con lo descrito por Böttcher y Drusch (2017), ya que las saponinas de estructura triperpenoide tienen la capacidad de formar películas viscoelásticas, que producen espumas y emulsiones estables. De igual forma Wahli (2012), coincide en que cuando las saponinas se disuelven en agua y se agitan se forma espuma estable. Se estima como positiva la presencia de saponinas cuando la espuma permanece por más de 2 minutos (Mena *et al.*, 2015) como se muestra en la figura 5.

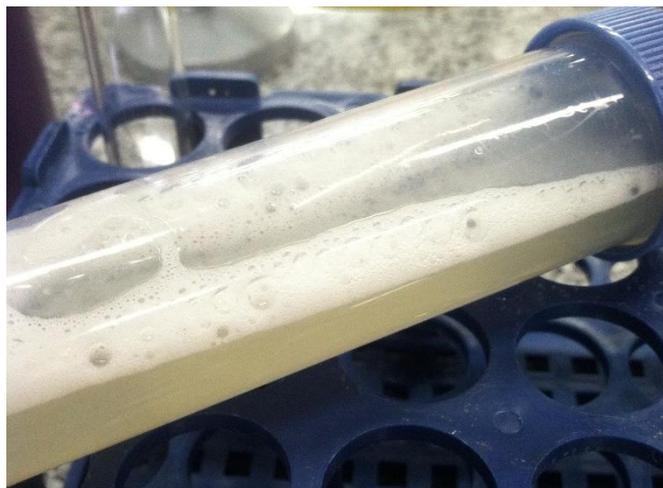


Figura 5. Evaluación de presencia de espuma en extracto acuoso madre resultante del lavado de granos de quinua para comprobar presencia de saponinas

A partir de plantas de quinua, se ha comprobado un total de más de 30 saponinas identificadas que poseen principalmente cinco diferentes agliconas triterpenoides (Ruiz *et al.*, 2017), estas estructuras se relacionan a la generación de espumas y emulsiones estables, por tanto la presencia de saponinas en el extracto resultante en el presente estudio se determinó como positiva.

4.2. Identificación de *Rhizopus*

En la figura 6 se observa la identificación del hongo *Rhizopus* con sus estructuras microscópicas, aislado a partir de frutillas con presencia de síntomas de pudrición y micelio algodonoso. La forma de las esporas corresponde a conidias ovaladas agrupadas en racimos de color café intenso. Izquierda: lente 10x sin tinción. Derecha: lente 10x con tinción en azul de lactofenol.

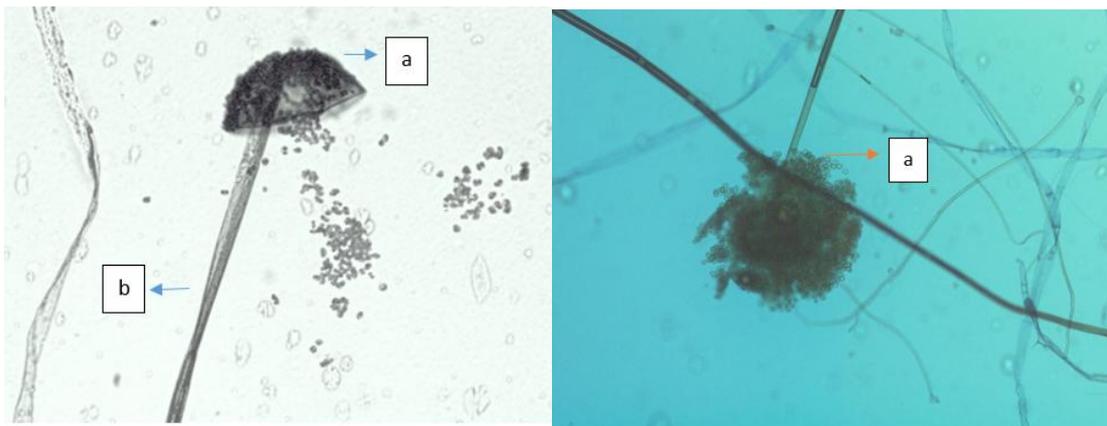


Figura 6. Esporas de hongo *Rhizopus sp.*, observadas en microscopio, lente 10x

Las estructuras observadas bajo el microscopio coinciden con lo descrito por Forbes, Sahm, y Weissfeld (2009) ya que las especies de *Rhizopus* se caracterizan por contener esporangios dentro de un gran esporangióforo (a) con origen en hifas no tabicadas (b). Los esporangióforos por lo general miden hasta 1000 μm y tienen la forma de una estructura cóncava (figura 6 izquierda) que se extiende hacia el interior del esporangio sacular (Koneman *et al.*, 2008).

4.3. Evaluación del rendimiento de los extractos obtenidos a partir del lavado de granos de quinua y harina de vainas secas de guarango.

El extracto acuoso obtenido a partir de granos de quinua, presentó un rendimiento de 83.65 %. Este resultado es considerablemente mayor a lo obtenido en un estudio realizado en México, donde se obtuvo extractos a partir de hojas secas de la planta de gobernadora (*Larrea tridentata*), con diferentes solventes, y se evaluó el rendimiento de los mismos. El extracto acuoso en dicho estudio presentó un rendimiento de 3.24% y un bajo contenido de saponinas (Peñuelas *et al.*, 2015).

En el caso del extracto obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango, los rendimientos obtenidos en cada fase del proceso fueron superiores a 95%, como se detalla en la tabla 3. Estos valores son significativamente mayores al compararlos con el 3.24% del extracto acuoso, los porcentajes de rendimiento siguen siendo mayores al comparar con los resultados de los solventes etanol y diclorometano de 4.71% y 18% correspondientemente (Peñuelas *et al.*, 2015).

Tabla 3.

Rendimiento y características físicas de los extractos obtenidos en el presente estudio

EXTRACTO	METODOLOGÍA POR FASE	% DE RENDIMIENTO	CARACTERÍSTICAS
Extracto acuoso obtenidos a partir de granos de quinua	Extracción por lavado de grano de quinua (agitación)	83.65	Solución acuosa opaca que al agitar produce espuma
Extracto acuoso obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango	Extracción en caliente	96.25	Solución acuosa de color café intenso con presencia de partículas de harina de guarango
	Filtrado de extracto (centrifugación 1)	95.75	Solución acuosa de color café - amarillo cobrizo brillante con poca presencia de partículas de harina de guarango

	Filtrado de extracto (centrifugación 2)	98.50	Solución acuosa de color café – amarillo cobrizo brillante sin presencia de partículas de harina de guarango
--	---	-------	--

Los extractos acuosos de quinua (rendimiento de 83.65) y de vainas secas de guarango (rendimiento de extracción 96.25) se pueden comparar con el extracto metanólico de Peñuelas *et al.* (2015) que posee el rendimiento más alto correspondiente a 95%, se podría decir que los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento de los extractos de interés se comprueban como beneficiosos y óptimos según la metodología aplicada de extracción, y además éstos extractos acuosos tienen la ventaja de que son considerablemente más económicos de obtener y por otro lado no representan factores de contaminación.

4.4. Evaluación *in vitro* de los extractos obtenidos a partir del lavado de granos de quinua y harina de vainas secas de guarango sobre *Rhizopus*

4.4.1. Extracto obtenido a partir del lavado de granos de quinua

El presente ANOVA (tabla 4) descompone las fuentes de variación en dos, los tratamientos establecidos a partir de diferentes concentraciones: 300, 250, 200, 150, 50, 0.5 ppm y el error existente entre los tratamientos, para los cuales se evaluó el valor p con un 95% de confianza. En las horas analizadas siendo: 12 horas, 24 horas y 36 horas las mediciones clave, en ninguno de los casos, el valor p es menor a 0,05. Con esto se deduce que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto obtenido a partir del lavado de granos de quinua sobre *Rhizopus*.

Tabla 4.

ANOVA análisis de varianza inhibición de crecimiento del hongo *Rhizopus extracto acuoso (quinua)* concentraciones 300, 250, 200, 150, 50, 0.5 ppm con relación al crecimiento natural o testigo.

Tiempo de evaluación: 12 horas					
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Total	77	17.086			
Tratamiento	5	1.288	0.2576	1.17	n.s.*
Error	72	15.798	0.2194		
Tiempo de evaluación: 24 horas					
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Total	77	964.41			
Tratamiento	5	42.74	8.548	0.67	n.s.*
Error	72	921.67	12.801		
Tiempo de evaluación: 36 horas					
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Total	77	1141.06			
Tratamiento	5	93.89	18.78	1.29	n.s.*
Error	72	1047.17	14.54		

Nota: * No significativo

Al comparar el crecimiento del microorganismo en condiciones óptimas (figura 7) con el comportamiento de crecimiento del microorganismo frente a diferentes concentraciones del extracto de interés, se observa que el crecimiento medido en densidad óptica es similar tanto en las primeras horas, como al final del tiempo de evaluación considerado.

Este resultado demostró que el contenido de saponinas en el extracto de interés no refleja un efecto biológico sobre el hongo *Rhizopus*.

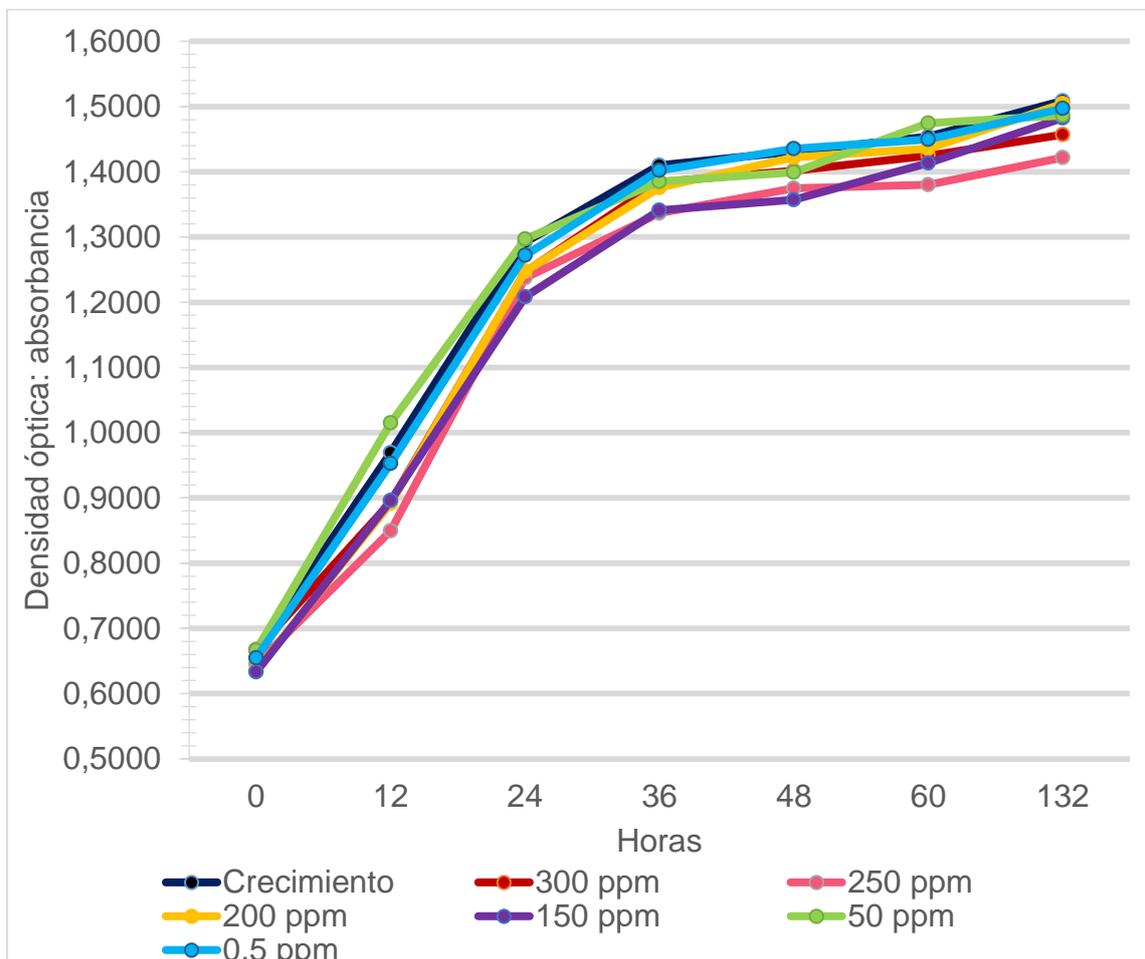


Figura 7. Evaluación del efecto inhibitorio del extracto obtenido a partir de granos de quinua con diferentes concentraciones sobre *Rhizopus* con relación al crecimiento en condiciones óptimas del microorganismo.

La quinua tiene un menor contenido de saponinas, en relación con otras especies vegetales similares. En un estudio realizado por Guzmán, Cruz, Alvarado, y Mollinedo (2013) se cuantificó saponinas en especies vegetales procedentes de Bolivia, y se determinó por análisis de espectrofotometría UV/VIS que el quentu (*Rumex acetosella*) presentó la mayor cantidad de

saponinas con valores de 121.6 mg/g, seguido de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A) con valores máximos de 43.2 mg/g y la quinua con el menor valor de todos con 36.1 mg/g.

Estos valores representan un contenido de saponinas superior al 0.1%, mientras que la variedad de quinua dulce ecuatoriana de interés comercial INIAP Tunkahuan de donde se obtuvo el extracto de interés tiene un 0.06% de contenido de saponinas (Peralta, Murillo, Mazón, Villacrés, y Rivera, 2013).

4.4.2. Extracto obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango

El presente ANOVA (tabla 5) descompone las fuentes de variación en dos, los tratamientos establecidos a partir de diferentes concentraciones: 400, 350, 250, 150, 100, 5 ppm y el error existente entre los tratamientos, para los cuales se evaluó el valor p con un 95% de confianza.

En la hora 12 el valor de p es menor a 0,05 con lo que se concluye que existe diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto obtenidos a partir de harina de vainas de guarango sobre *Rhizopus* en las primeras horas de desarrollo del hongo.

En las siguientes horas de evaluación no se encontraron diferencias significativas sobre *Rhizopus*.

Tabla 5.

ANOVA análisis de varianza inhibición de crecimiento del hongo Rhizopus extracto acuoso (harina de vainas de guarango) concentraciones 400, 350, 250, 150, 100, 5 ppm con relación al crecimiento natural o testigo.

Tiempo de evaluación: 12 horas					
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Total	77	1412.7			
Tratamiento	5	765.9	153.181	17.05	0.000
Error	72	646.8	8.983		
Tiempo de evaluación: 24 horas					
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Total	77	1454.6			
Tratamiento	5	202.2	40.44	2.33	n.s.*
Error	72	1252.4	17.39		
Tiempo de evaluación: 36 horas					
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Total	77	1348.7			
Tratamiento	5	125.7	25.14	1.48	n.s.*
Error	72	1223.0	16.99		

Nota: * No significativo

Al comparar el efecto del crecimiento del microorganismo en condiciones óptimas (figura 8) con el comportamiento de crecimiento del microorganismo frente a diferentes concentraciones del extracto de interés, se observa que el crecimiento medido en densidad óptica es bastante similar y se generan pocas diferencias marcadas.

Este resultado demostró que el contenido de taninos en el extracto de interés no refleja un efecto biológico prolongado sobre el hongo *Rhizopus*.

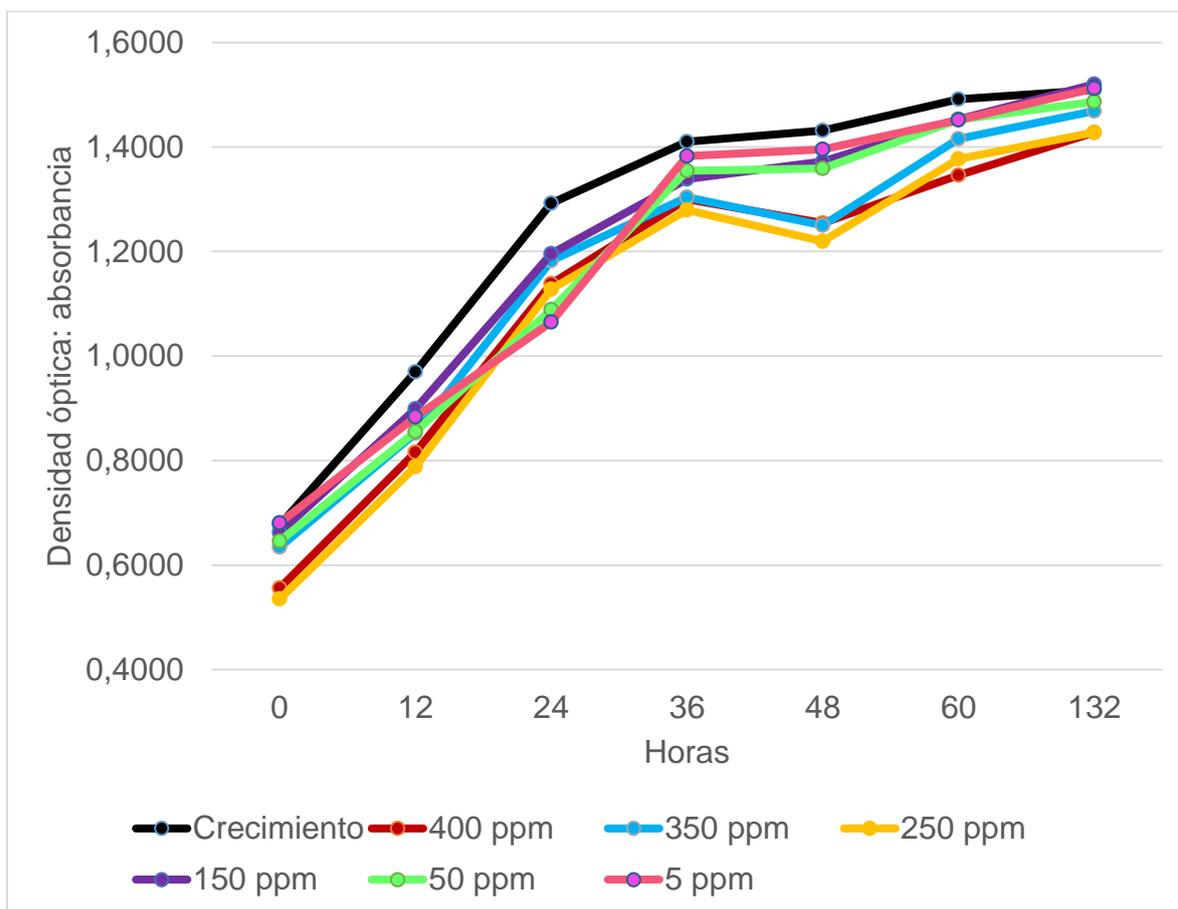
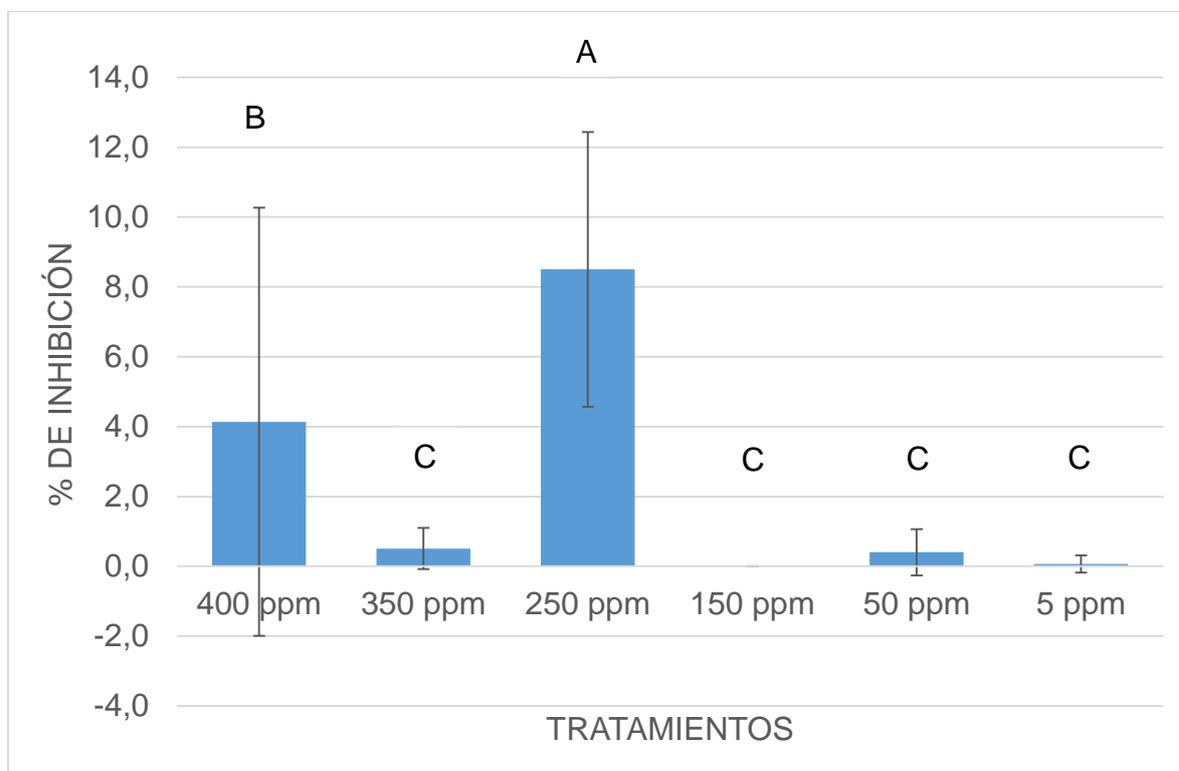


Figura 8. Evaluación del efecto inhibitorio del extracto obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango con diferentes concentraciones sobre *Rhizopus* con relación al crecimiento en condiciones óptimas del microorganismo.

En la figura 9 se comprueba que la concentración de 250 ppm y la concentración de 400 ppm presentan inhibición del crecimiento de *Rhizopus* en la hora 12 es decir, dentro de las primeras horas del ciclo de vida del microorganismo existe un efecto significativo, sin embargo en las siguientes horas, el efecto desaparece.

Bajo estas condiciones el porcentaje de inhibición corresponde a 8.50% para la concentración de 250 ppm y de 4.14% para la concentración de 400 ppm.



Concentración	400 ppm	350 ppm	250 ppm	150 ppm	50 ppm	5 ppm
Desviación (σ)	6,1	0,6	3,9	0,0	0,7	0,2
% de Inhibición	4,1	0,5	8,5	0,0	0,4	0,1

Figura 9. Comparación de medias en porcentaje de inhibición por el método LSD 95% de confianza para *Rhizopus* hora 12.

Para evaluar el limitado efecto del extracto de guarango sobre el hongo de *Rhizopus*, hay que considerar algunas características que le otorgan resistencia al hongo postcosecha en estudio, como su crecimiento rápido (Campbell y Reece, 2007). Adicionalmente los hongos de este grupo tienen la capacidad de producir enzimas pectolíticas (intervienen en la degradación de estructuras vegetales ricas en pectina) con las que disuelven con facilidad el sustrato al que tienen disponibilidad. Esta característica los convierte en

organismos eficientes en la desnaturalización de los tejidos que invaden (Ames, 1997).

Es fundamental identificar el origen y la concentración de los taninos para evaluar su efecto inhibitorio sobre microorganismos. En un estudio realizado por Veloz *et al.* (2012), se evaluó el efecto de extractos obtenidos a partir de especies vegetales ricas en taninos sobre microorganismos, y la concentración de 1% del extracto obtenido a partir de cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento micelial del 68.54% para el caso de *Fusarium sp.* Una concentración de 2% del mismo extracto inhibió en 100% el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Por otro lado, dentro del mismo estudio, el extracto procedente de quebracho (*Schinopsis balansae*), inhibió el 100 % de crecimiento micelial a concentraciones de 1% sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y concentraciones de 2 % sobre *Phytophthora citrophthor* (Veloz *et al.*, 2012).

En el presente estudio, la concentración de 400 ppm de extracto acuoso procedente de harina de guarango presentó un reducido efecto sobre el hongo *Rhizopus*. Esto se podría atribuir al tipo de taninos presentes en la especie vegetal y la concentración seleccionada. Veloz *et al.* (2012), obtuvo resultados de inhibición total en algunos casos con una concentración equivalente a 10 000 ppm, la aplicación de altas concentraciones tanto de taninos procedentes del guarango como de otros taninos han mostrado resultados atractivos como agentes de control biológico.

A pesar de las grandes diferencias encontradas a nivel de efecto inhibitorio, los resultados corroboran el potencial que tienen los taninos de guarango sobre microorganismos.

El solvente seleccionado para el presente estudio también influye en la cantidad extraída de compuestos de interés. En el ensayo realizado por Rodríguez, Ramírez, Bautista, Cruz, y Rivero (2012) se obtuvieron extractos de *Acacia farnesiana* y se evaluaron sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, se comprobó que el extracto hidroalcohólico al 30% contenía mayor cantidad de compuestos de interés entre ellos flavonoides, azúcares, taninos, fenoles, alcaloides y saponinas, que el extracto acuoso. En el presente estudio el solvente seleccionado corresponde a agua destilada, con lo que se podría interpretar que la cantidad de taninos presentes en el extracto resultante es menor, y por consiguiente su efecto inhibitorio dentro del ensayo es limitado.

Por último, los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran el potencial que tiene el extracto acuoso obtenido a partir de vainas secas de guarango como una alternativa para el control del hongo causante de pudrición blanda *Rhizopus* dentro de las primeras 12 horas de crecimiento del hongo. Sin embargo, estos resultados, no se pueden generalizar o inferir a poblaciones extensas de *Rhizopus*, ya que al realizar la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk con un 95% de confianza (Anexo 1), el resultado del valor $p < 0.010$, indica que los datos no proceden de una distribución normal.

4.5. Evaluación económica de los extractos obtenidos a partir del lavado de granos de quinua y harina de vainas secas de guarango.

En la tabla 6 se presentan los costos de producción a escala de laboratorio para los extractos de interés. El cálculo de costo por maquinaria se realizó en base a la depreciación de los equipos utilizados en cada caso y la energía consumida. Dentro de los materiales se consideró a instrumentos de vidrio, reactivos y materia prima que incluyen: agua destilada estéril como solvente, harina de guarango y quinua variedad Tunkahuan.

Tabla 6.

Costo de producción por litro de los extractos obtenidos en laboratorio

	Extracto acuoso obtenidos a partir de granos de quinua	Extracto acuoso obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango
Tiempo (horas)	25	2
Maquinaria (\$)	3.30	0.95
Materiales (\$)	0.20	0.20
Reactivos y materia prima (\$)	1.20	1.02
TOTAL COSTO DE PRODUCCIÓN	\$ 4.70	\$2.17

El extracto acuoso obtenido a partir de granos de quinua tiene un costo de producción en laboratorio estimado de \$4.70 por litro, considerando un tiempo de 25 horas para obtención del mismo. La maquinaria de mayor costo en el caso de este extracto corresponde al agitador orbital que se requiere funcione durante 24 horas continuas.

Por otro lado el extracto obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango tiene un costo de producción en laboratorio estimado de \$2.17 por litro, considerando un tiempo de 2 horas para su obtención. La maquinaria de mayor costo para el extracto procedente de guarango corresponde a la centrífuga y la plancha de calentamiento y agitación magnética.

Como se observa en los resultados los costos de producción son relativamente bajos y la metodología de obtención ha simplificado el uso de equipos.

Es importante recalcar que en el caso del extracto procedente de granos de quinua al ser una extracción en laboratorio se han obtenido costos estimados, ya que el objetivo sería utilizar un producto de desecho como es el agua de lavado de granos de quinua a nivel industrial. Para el caso del extracto procedente de estructuras vegetales de guarango pasa lo mismo al utilizarse maquinaria especializada de laboratorio como es la centrífuga para separación de componentes del extracto acuoso los costos varían.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo, permiten concluir que para el caso del extracto procedente de harina de vainas secas de guarango (*Caesalpinia spinosa*) existe un efecto inhibitorio sobre las primeras fases de crecimiento del hongo *Rhizopus sp.*

Para el caso del extracto acuoso procedente de granos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) variedad Tunkahuan no existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos analizados a lo largo del tiempo de evaluación estimado sobre el hongo en estudio.

Los análisis cualitativos realizados mostraron como positivo el contenido de saponinas y taninos en los extractos acuosos resultantes. En el primer caso, a través de la presencia estable y prolonga de espuma en el extracto procedente de agua de lavado de granos de quinua variedad Tunkahuan.

La presencia de taninos se estimó como positiva debido al cambio de coloración y la reacción química que se genera al agregar cloruro férrico al extracto acuoso derivado de guarango.

Los resultados sugieren que una dosis de 250 ppm con un porcentaje de inhibición corresponde a 8.50% sería efectiva en las primeras 12 horas de crecimiento del hongo de postcosecha y se podría considerar como la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el caso del extracto acuoso obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango. Sin embargo, se podría también seleccionar la concentración más alta de 400 ppm ya que el costo de obtención no se altera y a mayor concentración de taninos se espera una mayor inhibición del microorganismo.

En el caso del extracto acuoso procedente del lavado de granos de quinua, no se estableció ninguna concentración efectiva sobre el crecimiento de hongo, debido a que no existió diferencia significativa entre las concentraciones y se estima que el contenido de saponinas en los extractos es muy bajo.

El costo de producción por litro de extracto acuoso procedente de granos de quinua corresponde a \$4.70 con un rendimiento de 83.65 %, y un tiempo de obtención de 24 horas.

Cabe recalcar que tanto el tiempo de operación como el costo son elevados ya que la metodología simula a escala laboratorio el proceso de lavado de granos de quinua a nivel industrial. En el caso del extracto acuoso obtenido a partir de harina de vainas secas de guarango, se estimó un costo de producción por litro de \$2.17 con un rendimiento general superior a 95%, y un tiempo de operación de 2 horas para su obtención.

Tanto los rendimientos como los costos de producción convierten al extracto acuoso derivado del guarango en una buena alternativa para desarrollar de manera industrial.

5.2. Recomendaciones

Los resultados expuestos anteriormente, permiten realizar las siguientes recomendaciones:

Aplicar metodologías analíticas y cuantitativas precisas como HPLC en futuras investigaciones. Si bien implican una mayor inversión económica y de tiempo los resultados podrían generar información valiosa sobre los compuestos químicos de interés en extractos vegetales y posibles aplicaciones.

Realizar más investigaciones en relación a la concentración de taninos presentes en la harina de vainas secas de guarango y la aplicación de diferentes solventes y metodologías de obtención de los compuestos de interés para aplicarlos adecuadamente.

Extraer compuestos derivados de los taninos antes descritos y evaluar su potencial sobre otros microorganismos de diferente morfología.

Para evaluar el efecto de los taninos presentes en la harina de vainas secas de guarango, bajo metodologías similares, se debería aplicar una escala de concentraciones que inicie a partir de 400 ppm. Ampliar las posibilidades de extracción de taninos con otros solventes.

Para el caso de las saponinas presentes en los granos de quinua se podría evaluar otros solventes para extracción óptima, y considerar otras escalas de concentraciones. Probar la extracción de saponinas o compuestos de interés de diferentes partes de la planta de quinua y trabajar con más variedades.

REFERENCIAS

- Agrios, G. (2002). *Fitopatología* (2a ed.). México: Limusa.
- Agrocalidad. (Mayo de 2017). *REPORTE DE PRODUCTOS DE INSUMOS AGRICOLAS*. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/plaguicidas-registrados-19-05-2017.pdf>
- AGROSAD. (2018). *AGROSAD*. Recuperado el 5 de junio de 2018, de <https://www.agrosad.com.ec/index.php/productos/agroquimicos/fungicidas/iprodione-50pm-detail>
- Aguilar, A., Noratto, G., Chambi, F., Debaste, F., y Campos, D. (2014). *Potential of tara (Caesalpinia spinosa) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds*. *Food Chemistry*, 156, 301-304. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.110>
- Agustí, M. (2003). *Citricultura*. Mundi-Prensa.
- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., y Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 45(3), 438-469. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v45n3/v45n3a06.pdf>
- Ames, T. (1997). *Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos*. International Potato Center.
- Apaza, R., Smeltekop, H., Flores, Y., Almanza, G., y Salcedo, L. (2016). Efecto de saponinas de *Chenopodium quinoa* Willd contra el fitopatógeno *Cercospora beticola* Sacc. *Protección Vegetal*, 31(1), 63-69.
- Barrera, L., y Bautista, S. (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 FITOPATOLOGIA*, 26(1), 27-31 .
- Blancard, D. (2011). *ENFERMEDADES DEL TOMATE*. Mundi-Prensa Libros.
- Bonilla, H., López, A., Carbajal, Y., y Siles, M. (2016). Análisis de variables morfométricas de frutos de “tara” provenientes de Yauyos y

- Ayacucho para identificar caracteres agromorfológicos de interés. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 157 – 164.
- Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi, L., y Hmamouchi, M. (2003). *Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against Botrytis cinerea Pers: Fr. Journal of Ethnopharmacology*, 89, 165–169.
- Böttcher, S., y Drusch, S. (2017). *Saponins — Self-assembly and behavior at aqueous interfaces. Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 105 - 113.
- Brezonik, P., y Arnold, W. (2011). *Water Chemistry: An Introduction to the Chemistry of Natural and Engineered Aquatic Systems*. Oxford University Press.
- Campbell, N., y Reece, J. (2007). *Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- Cano, M. (2013). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria spp.*). *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS*, 7(2), 263-276. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v7n2/v7n2a11.pdf>
- Castro, A. (2008). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. (Tesis Doctoral). Lima Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Chambi, F., Chirinos, R., Pedreschi, R., Betalleluz, I., Debaste, F., y Campos, D. (2013). *Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (Caesalpinia spinosa) pods. Industrial Crops and Products*, 47, 168 - 175.
- Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas, M., y Vargas, N. (2012). *Biología de Hongos*. Universidad de los Andes.
- Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). *Revista Elementos*(4), 31 - 39.

- Dávalos, J., Romero, V., Sánchez, J., Chávez, J., y Valderrama, A. (2017). CARACTERIZACIÓN, MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN MALDI/FT-ICR, DE TANINOS HIDROLIZABLES DE LA TARA (*Caesalpinia spinosa*). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(1), 106 - 114.
- De la Cruz, P. (2004). APROVECHAMIENTO INTEGRAL Y RACIONAL DE LA TARA *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 7(14), 64-73.
- Delgado, R. (2004). *Iniciación a la probabilidad y la estadística*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- De Liñán, C. (2015). *EcoVad 2015: Productos e insumos para agricultura orgánica*. Ediciones Agrotecnicas Sl.
- dos Santos, F., Flôres, M., y Rodolfo, C. (2016). *Ultraviolet spectroscopy and chemometrics for the identification of vegetable tannins*. *Industrial Crops and Products*, 91, 279–285.
- Elad, Y. (2016). *Cultural and Integrated Control of Botrytis spp.* En S. Fillinger, y Y. Elad (Edits.), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Cham.
- FAO. (s.f.). *Codex Alimentarius. Índice de plaguicidas: producto Iprodiona*. Recuperado el 14 de mayo de 2018, de http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=111
- FAO. (2012a). *El pacto mundial contra las plagas de las plantas conmemora sus 60 años de actividades*. Recuperado el 26 de octubre de 2017, de <http://www.fao.org/news/story/es/item/131978/icode/>
- FAO. (2012b). *Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i2697s.pdf>
- Fiallos, J., Pollier, J., Moses, T., Arendt, P., Barriga, N., Morillo, E., . . . Leon, A. (2016). *Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in Chenopodium quinoa leaves*. *Plant Science*, 250, 188–197.

- Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). *Diagnostico Microbiologico*. Ed. Médica Panamericana.
- Fraire, M., Yáñez, M., Nieto, D., y Vázquez, G. (2003). Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 285-291.
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M., Romero, G., Silvera, E., González, P., . . . Bentancur, O. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 16(1), 97-107.
- Gutiérrez, H., y de la Vara, R. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos*. Mc Graw Hill.
- Guzmán, B., Cruz, D., Alvarado, J., y Mollinedo, P. (2013). CUANTIFICACION DE SAPONINAS EN MUESTRAS DE CAÑIHUA CHENOPODIUM PALLIDICAULE AELLEN. *REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA* , 30(2), 131-136. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/4263/426339680004.pdf>
- Hernández, A., Bautista, S., y Velázquez, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 119 – 123. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61030202>
- INEC. (2016). *Ecuador en Cifras*. Obtenido de Información Ambiental en la Agricultura 2016: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/PRESENTACION_AGRO_AMBIENTE_2016.pdf
- Kader, A. (2011). *Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas* (Tercera ed.). UCANR Publications.
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P., y Woods, G. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana.
- Kouassi, H., Bajji, M., Brostaux, Y., Zhiri, A., Samb, A., Lepoivre, P., y Jijakli, M. (2012). *Development and application of a microplate method to evaluate the efficacy of essential oils against Penicillium italicum*

- Wehmer, *Penicillium digitatum* Sacc. and *Colletotrichum musea* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, three postharvest fungal pathogens of fruits. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16(3), 325-336.
- Mancero, L. (2008). *La Tara (Caesalpinia spinosa) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región*. Quito: Programa Regional ECOBONA - INTERCOOPERATION.
- Margueron, D. (2006). *MEDICINAL PLANTS: CHEMISTRY AND PROPERTIES*. Science Publishers.
- Marienfeld Superior. (2010). Cámara de recuento. *Laboratory Glassware*.
- Mena, L., Tamargo, B., Salas, E., Plaza, L., Blanco, Y., Otero, A., y Sierra, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 106-116 .
- Mier, T., Toriello, C., y Ulloa, M. (2002). Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. UNAM.
- Narváez, A., Calvo, A., y Troya, A. (2009). *Las poblaciones naturales de la tara (Caesalpinia spinosa) al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos por medio de estudios moleculares y bioquímicos*. Quito: Serie Investigación y Sistematización No. 7. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION, Laboratorio de Biotecnología Vegetal Escuela de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE.
- Narváez, F., Barzola, S., Vásquez, F., Martínez, M., Neira, J., y Sánchez, S. (2017). Potencial antifúngico de *Citrus sinensis* y *Citrus nobilis* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya. *Revista Ciencia y Tecnología - UTEQ*, 10(1), 41 - 46.
- Núñez, J., Quiala, E., de Feria, M., Mestanza, S., y Teanga, S. (2017). Propagación in vitro de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles plus seleccionados. *Biotecnología*

- Vegetal*, 17(2), 67 - 75. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/543/pdf>
- Núñez, J., Quiala, E., de Feria, M., Mestanza, S., Gómez, R., Cuadrado, F., y Leiva, M. (2017). Establecimiento de un banco clonal de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz mediante selección de árboles plus e injerto. *Bioteconología Vegetal*, 17(1), 41- 49. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/536/1286>
- Peralta, E., Murillo, Á., Mazón, N., Villacrés, E., y Rivera, M. (2013). Catálogo de variedades mejoradas de granos andinos: chocho, quinua y amaranto, para la sierra del Ecuador. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP.
- Plascencia, R., Olalde, V., Mena, H., Ceja, L., Venegas, J., Oyoque, G., y Angoa, M. (2012). ANTAGONISMO IN VITRO DE AISLADOS BACTERIANOS DE FRESA COMERCIAL Y SILVESTRE VS. *Botrytis cinerea* Y *Rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai. Universidad Autónoma Indígena de México*, 8(3), 103-110. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/461/46125176009.pdf>
- Peñuelas, O., Arellano, M., Vargas, I., Lares, F., Cantú, E., Hernández, S., . . . Mungarro, C. (2015). BIOACTIVIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE GOBERNADORA (LARREA TRIDENTATA) SOBRE LA INHIBICIÓN DE HONGOS POSCOSECHA: ALTERNARIA TENUISSIMA, ASPERGILLUS NIGER, PENICILLIUM POLONICUM Y RHIZOPUS ORYZAE. *Polibotánica*(40), 183-198. doi:DOI: 10.18387/polibotanica.40.12
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2004). *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana.
- Rivera, J. (2008). *Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias*. FHIA, Departamento de Protección Vegetal. Recuperado el 23 de octubre de 2017, de http://www.fhia.org.hn/downloads/proteccion_veg_pdfs/hojatecnica1de trioroposcosecha%20.pdf

- Rodríguez, A., Ramírez, M., Bautista, S., Cruz, A., y Rivero, D. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1), 91-96.
- Romanazzi, G., y Droby, S. (2016). *Control Strategies for Postharvest Grey Mould on Fruit Crops*. En *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (págs. 217-228). Springer, Cham.
- Ruíz, J. (2008). *Viaje al asombroso mundo de los hongos*. FCE - Fondo de Cultura Económica.
- Ruiz, K., Khakimov, B., Engelsen, S., Bak, S., Biondi, S., y Jacobsen, S. (2017). *Quinoa seed coats as an expanding and sustainable source of bioactive compounds: An investigation of genotypic diversity in saponin profiles*. *Industrial Crops & Products*, 104, 156–163.
- Singh, B., y Kaur, A. (2018). *Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review*. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 93 - 101.
- Soriano, J. (2015). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Velásquez, Á. (2004). Extracción de taninos presentes en el banano verde. *REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN*, 1(2), 17-22. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69510203>
- Velázquez, M., Bautista, S., y Hernández, A. (2008). Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.)Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 26(1), 49-55.
- Veloz, R., Marín, R., López, M., Veloz Rodríguez, R., Guevara, L., Muñoz, C., . . . Guevara, R. (2012). Evaluación del Efecto de Concentrados de taninos sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos. *Instituto Tecnológico de Celaya*.
- Wahli, C. (2012). *Quinoa hacia su cultivo comercial*. Imprenta Mariscal, Quito.

- Wilson, C., Solar, J., El Ghaouth, A., y Wisniewski, M. (1997). *Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81(2), 204-210. doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.204>
- Xu, B., Zhang, H., Chen, K., Xu, Q., Yao, Y., & Gao, H. (2013). Biocontrol of Postharvest Rhizopus Decay of Peaches with *Pichia caribbica*. *Current Microbiology*, 67, 255–261. doi:DOI 10.1007/s00284-013-0359-9
- Zhang, H., Ma, L., Turner, M., Xu, H., Zheng, X., Dong, Y., y Jiang, S. (2010). *Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of Rhodotorula glutinis against postharvest Rhizopus rot of strawberries and the possible mechanisms involved*. *Food Chemistry*, 122(3), 577-583. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.013>

ANEXOS

ANEXO 1: Gráfica de probabilidad Normal de los Residuos para extracto acuoso procedente de harina de vainas secas de guarango (*Caesalpinia spinosa*) hora 12 sobre *Rhizopus*

